



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



Purificación y caracterización estructural de dos proteínas
de 10 kDa del veneno del caracol marino *Conus spurius*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)

P R E S E N T A

Hidrobiól. Mayra Pamela Becerra Amezcua

Director de Tesis: Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Comité tutorial: Dra. Alejandra Rojas Molina

Dr. José Estuardo López Vera

Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

México D.F., Mayo 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis, así como la experimentación para la obtención de resultados plasmados en ella, se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro; bajo la dirección del Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante una beca con número de CVU/becario: 351898/240459 y el proyecto 43754 (MBAR).

AGRADECIMIENTOS

Principalmente al CONACyT, por el otorgamiento de beca para la realización de la maestría en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi director de tesis, el Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez por todas sus enseñanzas, correcciones y apoyo durante la realización de esta tesis, cuya dedicación, paciencia, memoria, así como la pasión que transmite hacia la ciencia, son motivos de admiración.

Al comité tutelar, conformado por la Dra. Alejandra Rojas Molina, el Dr. José Estuardo López Vera, el Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera y la Dra. Judith Sánchez Rodríguez, por el tiempo y dedicación para las correcciones de esta tesis, que fueron muy valiosas para mí.

Al Biól. Exp. Andrés Falcón Alcántara, sin el cual, el entendimiento de las técnicas llevadas a cabo en esta tesis hubiera sido muy difícil, además de todo el apoyo y las pláticas interesantes que tuvimos.

Al Dr. César Batista, de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Cuernavaca, Morelos, por los análisis por espectrometría de masas de las proteínas y de los fragmentos, los cuales complementaron este trabajo; y por la explicación detallada del funcionamiento de esta metodología durante mi visita a esta Unidad.

A la Dra. Eréndira Gorrostieta Hurtado, por las correcciones a mi tesis que de igual manera fueron muy valiosas por la gran experiencia que tiene en el tema.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurofarmacología marina, Arte, Tere, Lucy, Chucho, Regis, Ernesto, Yuli y Daniel, por su compañía; en especial a Daniel por el apoyo en el entendimiento de la neurobiología celular y molecular que me cuesta trabajo entender.

A los amigos que conocí en el posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, que estoy segura que a partir de ahora serán mis amigos para toda la vida, Lily, Hoil, Dal, Esme, e Iza; gracias por su amistad, apoyo y risas que hicieron de mi estancia durante este posgrado muy satisfactoria.

A mi mejor amiga Rox, por el apoyo y los dibujos para algunos esquemas de mis presentaciones, así como, a Saúl por ser mi mejor amigo, por recordarme que nunca debo de rendirme, por escucharme, por aguantarme, por apoyarme y hacer que todas las ideas que pasaban por mi cabeza, por difíciles que parecieran, pudieran ser plamadas en la computadora de una manera sencilla por todo el conocimiento que tienes.

A la Dra. Xochitl Guzman García, por escucharme y apoyarme en este camino; siempre tus consejos son muy acertados. Así como a los chicos del laboratorio de Ecotoxicología de la UAM-I, Mirelle, Vero, Román, Roberto, Ingrid, Emilio, así como también a la Dra. Guadalupe Barrera y Dra. Patricia Ramírez, por la amistad, los consejos y el apoyo que me han brindado siempre dentro y fuera de la UAM-I.

Al Dr. Humberto González, por su asesoría en el formato de la tesis, y su disposición a siempre ayudarme cuando lo necesitara.

Finalmente, sin ser menos importante, a mi familia, por todo el apoyo, en especial a mi hermana Mara porque nunca permitiste que me rindiera por muy difícil que parecieran algunas circunstancias, gracias por tus grandes enseñanzas y tu compañía en diferentes etapas de mi vida; sin dejar a un lado a mi hermanito Said que con sus pocos años de vida me ha enseñado que siempre hay que mirar la vida con una sonrisa, y a mis padres que a pesar de que son poco expresivos, sé que les da mucho gusto que haga lo que me apasiona, siempre impulsándome a que logre mis metas.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a quienes como yo, emplean, emplearon o emplearán parte de su vida a realizar lo que les apasiona, que en mi caso son las toxinas marinas y el mar, el cual es mi lugar sagrado, siempre recordando que:

“El romper de una ola no puede explicar todo el mar”

Vladimir Nabokov

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

“Lo que ahora no alcanza la perfección, lo alcanzará en un intento posterior o reiterado; nada de lo que abrazó la historia es pasajero, y a través de transformaciones innumerables renace de nuevo en formas siempre más ricas”

Novalis

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
CARACTERÍSTICAS DE GASTERÓPODOS	13
CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>CONUS</i>	16
CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE <i>CONUS SPURIUS</i>	18
CONOTOXINAS	20
Conotoxinas con efecto en canales iónicos activados por voltaje	25
Conotoxinas con efecto en canales iónicos activados por ligando	29
Conotoxinas con actividad en transportadores	32
Conotoxinas activados con efecto en receptores acoplados a proteínas G	33
MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES	33
SIGNOS, SÍNTOMAS Y TRATAMIENTO DE PICADURAS DE <i>CONUS</i>	34
SIGNOS, SÍNTOMAS Y TRATAMIENTO DE PICADURAS DE <i>CONUS SPURIUS</i>	35
ANTECEDENTES	35
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	40
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
HIPÓTESIS.....	41
JUSTIFICACIÓN.....	41
METODOLOGÍA.....	43
PURIFICACIÓN	43
CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS	45
DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR	45
DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	46
DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA POR EL PRINCIPIO DE DEGRADACIÓN DE EDMAN	48
BÚSQUEDA DE SIMILITUDES EN BASES DE DATOS Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS	49
RESULTADOS	50
REPURIFICACIÓN DE SPIVD	50
REPURIFICACIÓN DE SPIVC.....	50
CUANTIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS	51

DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR	51
DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA CONOTOXINA SPIVD POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	52
DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS POR EL PRINCIPIO DE DEGRADACIÓN DE EDMAN.....	53
DETERMINACIÓN DE MASA MOLECULAR DE FRAGMENTOS DEL PÉPTIDO SPIVD.....	58
BÚSQUEDA DE SIMILITUDES EN BASES DE DATOS Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS	59
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	76
REFERENCIAS.....	77
ANEXOS.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	SUPERFAMILIAS GENÉTICAS DE CONOTOXINAS.....	21
TABLA 2.	PATRONES DE CISTEÍNAS.....	22
TABLA 3.	PRINCIPALES FAMILIAS FARMACOLÓGICAS.....	24
TABLA 4.	SECUENCIAS OBTENIDAS A PARTIR DE LA DIGESTIÓN DE SPIVD CON TRIPSINA.	56
TABLA 5.	DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LOS FRAGMENTOS OBTENIDOS CON TRIPSINA A PARTIR DE SPIVD PIRIDILETILADO.	59
TABLA 6.	RESULTADOS DEL PROGRAMA BLASTP PARA SPIVD Y SPIVC.	60
TABLA 7.	SIMILITUD DEL PÉPTIDO SPIVD (SECUENCIA PARCIAL) CON PROTEÍNAS DE MOLUSCOS.	61
TABLA 8.	SIMILITUD DEL PÉPTIDO SPIVC (SECUENCIA PARCIAL) CON PROTEÍNAS DE MOLUSCOS.	63
TABLA 9.	SIMILITUD DE LOS PÉPTIDOS SPIVC Y SPIVD (SECUENCIAS PARCIALES) CON PROTEÍNAS DE <i>CONUS</i>	65
TABLA 10.	SIMILITUD DEL FRAGMENTO LGFETNSFDCTIFK CON PROTEÍNAS DE <i>CONUS</i>	67
TABLA 11.	SIMILITUD DEL FRAGMENTO CYAVCTTEIAK CON PROTEÍNAS DE <i>CONUS</i>	68
TABLA 12.	SIMILITUD DEL FRAGMENTO TCYYR CON PROTEÍNAS DE <i>CONUS</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	SISTEMA CIRCULATORIO DE LOS GASTERÓPODOS	14
FIGURA 2.	RESPIRACIÓN EN GASTERÓPODOS Y BRANQUIAS DELANTE DEL CORAZÓN REPRESENTATIVAS DE LOS PROSOBRANQUIOS	15
FIGURA 3.	APARATO REPRODUCTOR DE LOS GASTERÓPODOS: FEMENINO Y MASCULINO.....	16
FIGURA 4.	REPRESENTACIÓN DE LOS DIFERENTES HÁBITATS DEL GÉNERO <i>CONUS</i>	18
FIGURA 5.	APARATO GENERADOR DE VENENO DEL GÉNERO <i>CONUS</i>	18
FIGURA 6.	REPRESENTACIÓN DEL HÁBITAT DE <i>CONUS SPURIUS</i>	19
FIGURA 7.	DIENTE RADULAR DE <i>CONUS SPURIUS</i>	20
FIGURA 8.	CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO OBTENIDO DE LA REPURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO SPIVD DE <i>CONUS SPURIUS</i>	50
FIGURA 9.	CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO OBTENIDO DE LA REPURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO SPIVC DE <i>CONUS SPURIUS</i>	51
FIGURA 10.	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA CONOTOXINA SPIVC.	52
FIGURA 11.	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA CONOTOXINA SPIVD.	52
FIGURA 12.	SECUENCIA OBTENIDA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS A PARTIR DE SPIVD REDUCIDA Y ALQUILADA CON YODOACETAMIDA Y CORTADA CON TRIPSINA.	53
FIGURA 13.	CROMATOGRAMA DE LA REPURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO SPIVD PIRIDILETILADO.	54
FIGURA 14.	SPIVD PIRIDILETILADA DIGERIDA CON TRIPSINA.	55
FIGURA 15.	CROMATOGRAMA DE LA REPURIFICACIÓN DE SPIVC PIRIDILETILADO.	57
FIGURA 16.	CROMATOGRAMA DE SPIVC PIRIDILETILADO DIGERIDO CON PROTEASA V8.....	57
FIGURA 17.	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA CONOTOXINA SPIVD PIRIDILETILADA.	58

RESUMEN

La especie *Conus spurius* es un molusco gasterópodo marino que se distribuye en Florida y el Golfo de México, habita arrecifes de coral en aguas someras y profundas, y puede llegar a medir hasta 76 milímetros de largo y 38 milímetros de ancho. *Conus spurius* produce una gran diversidad de péptidos, entre ellos dos péptidos de aproximadamente 10 kilodaltones (kDa) a: SpIVC y SpIVD; es necesario evaluar su posible uso en investigación básica (herramientas moleculares) o en la industria farmacéutica o agro-veterinaria, que tiene como primer paso caracterizar las conotoxinas. El objetivo general de este trabajo fue caracterizar estas dos proteínas de 10 kDa desde el punto de vista bioquímico, determinando su estructura primaria mediante degradación de Edman automática y espectrometría de masas, ya que estas metodologías se complementan, tratando de identificar mediante comparación con secuencias en bases de datos, el blanco molecular de las proteínas. Los resultados de este trabajo fueron que aparentemente, las conotoxinas SpIVD y SpIVC difieren en el aminoácido de la posición 8; consisten en una sola cadena de aminoácidos con por lo menos 7 cisteínas y posiblemente 11; hasta el momento no se han encontrado cisteínas adyacentes; no tienen parecido significativo con ninguna proteína de moluscos ni con conotoxinas reportadas hasta el momento, por lo que no se puede saber el efecto biológico que pudieran tener. Las secuencias determinadas en este trabajo podrían servir para diseñar oligonucleótidos para clonar las secuencias codificantes y deducir las secuencias completas de SpIVC y SpIVD.

INTRODUCCIÓN

Los organismos que viven en el mar se encuentran constantemente en una lucha por la supervivencia, por lo que están dotados de mecanismos complejos que les permiten reaccionar rápidamente a estímulos externos para poder llevar a cabo necesidades vitales como lo son alimentarse, reproducirse, sobrevivir a los depredadores y proteger su territorio. Las especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de movimientos lentos y primitivos desde el punto de vista filogenético, generan una serie de productos químicos, resultado del metabolismo, que utilizan para el ataque y defensa frente a otras especies. Dentro de los mecanismos más sofisticados para defenderse y alimentarse están las toxinas, que debido a su naturaleza para un propósito específico, tienen propiedades farmacológicas; estas propiedades hacen de las toxinas un instrumento molecular para diferentes investigaciones fisiológicas (Jiménez *et al.*, 2007; Garateix, 1997).

Diversas toxinas marinas, dentro de las que destaca la más estudiada, la tetrodotoxina, han sido de gran valor en el estudio de receptores y canales iónicos de la membrana de diferentes células excitables. La tetrodotoxina es un compuesto termoestable presente en por lo menos seis filos del reino Animalia, incluyendo al Chordata, Mollusca, Echinodermata, Chaetognatha, Arthropoda y Platyhelminthes; no está claro cómo o porqué se encuentra en una variedad de organismos filogenéticamente no relacionados, sin embargo, una hipótesis señala que puede ser debido a una bacteria simbiótica o comensal que vive dentro de estos organismos y es la responsable de la producción de tetrodotoxina (Brodie, 2009; Chau *et al.*, 2011).

Otras de las toxinas importantes de origen marino son las denominadas mareas rojas provocadas por dinoflagelados, que generan un problema importante en la industria pesquera, debido a que provocan diferentes intoxicaciones alimentarias en diversas zonas

geográficas, incluyendo México. La intoxicación en el ser humano causa ardor en labios, lengua y cara que se extiende rápidamente en el cuello, brazos y piernas; ocurre también pérdida del tono muscular y movimiento; además de que en casos más graves se presenta salivación abundante, dolores de cabeza, sed, náuseas y vómitos. La muerte se presenta debido a parálisis respiratoria. Estos dinoflagelados producen varias sustancias tóxicas, como la saxitoxina que es la más característica, y que tiene efecto biológico casi idéntico a la tetrodotoxina; es decir, bloquea selectivamente los canales de Na^+ a nivel de las membranas excitables impidiendo la propagación del impulso nervioso (Garateix, 1997).

La principal toxina presente en peces tropicales y subtropicales es la ciguatoxina, que produce envenenamiento alimentario conocido como ciguatera, caracterizado por desórdenes neurológicos, gastrointestinales y en algunos casos, hasta cardiovasculares; esta toxina también la originan dinoflagelados como *Gambierdiscus toxicus* y *Ostreopsis ovata*; y se transfiere a través de la cadena alimenticia a los peces tropicales y subtropicales (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

Las toxinas de cnidarios pueden ser de naturaleza peptídica, como las neurotoxinas que actúan en canales de sodio y como las proteínas citolíticas que crean poros en la membrana celular; entre las que no son peptídicas se encuentra un enorme grupo de diterpenos cíclicos que producen algunos corales y se unen irreversiblemente a receptores nicotínicos de acetilcolina; están asociadas con la presencia de nematocistos, orgánulos que contienen veneno para la defensa y alimentación; los síntomas de envenenamiento varían dependiendo de la especie, zona afectada y sensibilidad individual (Turk y Kem, 2009).

Finalmente, otra fuente importante de toxinas son los caracoles marinos, específicamente los conos, moluscos gasterópodos, muy atractivos debido al brillo, color y forma de su concha. El veneno extraído a partir de estas especies ejerce acciones muy específicas

sobre receptores o canales de las membranas celulares. Debido a lo anterior, las toxinas de estas especies se han convertido en una herramienta muy importante para estudios moleculares; por lo tanto es de gran importancia e interés en este estudio caracterizar dos conotoxinas aisladas a partir de *Conus spurius*, una especie que se encuentra en nuestro país (Garateix, 1997).

Características de gasterópodos

A la clase gastropoda pertenecen más de 30,000 especies que habitan en una gran variedad de nichos ecológicos, desde la línea de costa hasta el mar profundo; a diferencia de los moluscos primitivos, la evolución de los gasterópodos está marcada por dos características: la primera es la transformación de la concha de una placa a una estructura espiral y la segunda es que hay una torsión de 180° a la izquierda sobre el plano horizontal de la masa visceral (Gabbi, 2006).

Los gasterópodos presentan, con algunas excepciones, un sistema circulatorio que suele estar compuesto por un corazón, con un ventrículo y una aurícula (que se denominan monotocardias), situado en el interior de una cavidad denominada pericardio. Del ventrículo parte una aorta posterior y otra anterior, que irrigan a la masa visceral y la región cabeza-pie-manto respectivamente (Figura 1). La hemolinfa baña el cuerpo en una serie de vasos, por lo que los gasterópodos presentan un sistema circulatorio abierto. En los tejidos se produce el intercambio entre el líquido circulante y las células, de tal modo que las células recogen el oxígeno y los nutrientes y le ceden los productos de desecho y el CO₂. Después, la hemolinfa es recogida por vasos que la llevan al nefridio donde es absorbida una parte, en un proceso de filtración para eliminar los productos de desecho. Finalmente, la hemolinfa se incorpora a la circulación branquial, donde se oxigena para retornar al corazón. Una parte de la sangre filtrada pasa directamente del nefridio al corazón sin entrar en la circulación branquial (Brusca y Brusca, 2003; Gabbi, 2006).

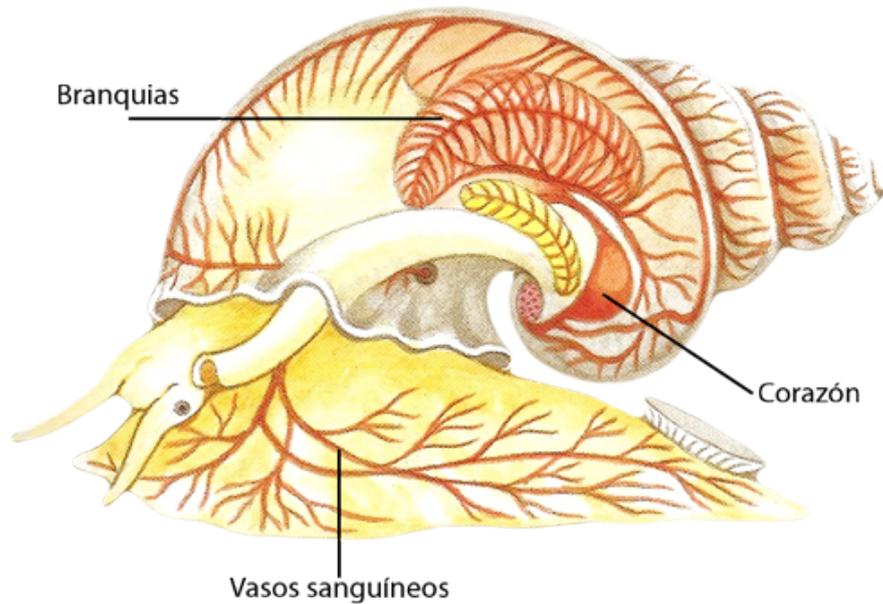


Figura 1. Sistema circulatorio de los gasterópodos (imagen tomada de Gabbi,2006).

El proceso respiratorio de los gasterópodos se produce en el interior de la cavidad paleal donde se alojan los ctenidios, que es el nombre por el que se conocen a las branquias de los moluscos. Los ctenidios son estructuras plumosas formadas por un raquis central y con numerosas ramificaciones a ambos lados, las cuales presentan un epitelio muy fino y están ricamente vascularizadas. Ambas características favorecen el intercambio de gases entre la hemolinfa y el agua. Los gasterópodos marinos, prácticamente todos, respiran por branquias alojadas en la cavidad paleal. Debido a la torsión de algunos gasterópodos, la masa visceral gira, situando a las branquias delante del corazón; a los gasterópodos con esta disposición de sus órganos se les llama Prosobranquios (Figura 2)(Brusca y Brusca, 2003; Gabbi, 2006).

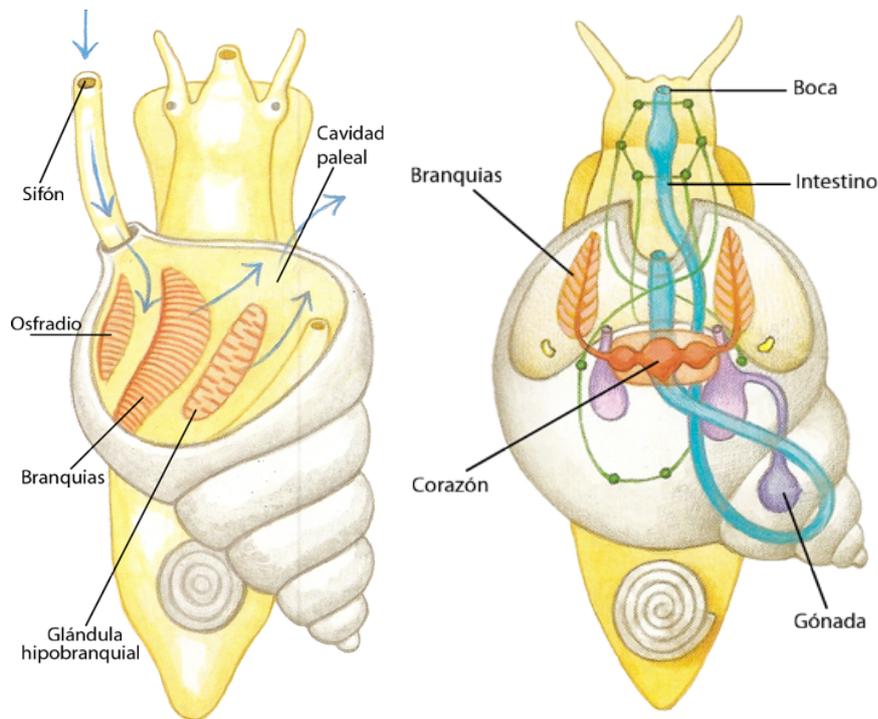


Figura 2. Respiración en gasterópodos (izquierda) y branquias delante del corazón representativas de los Prosobranquios (derecha)(imagen tomada de Gabbi, 2006).

El aparato reproductor de los gasterópodos se suele componer de una sola gónada, tanto si pertenece a un sexo como a otro, la cual generalmente se localiza en el interior de las vueltas iniciales de la concha. A partir de la gónada se extiende el gonoducto, que puede variar desde un simple conducto hasta alcanzar altos niveles de complejidad (Figura 3)(Brusca y Brusca, 2003; Gabbi, 2006).

El sistema digestivo lo constituye el bulbo bucal y la rádula. El bulbo bucal suele tener numerosas glándulas salivales, en la que produce saliva rica en celulasas y quitinasas; el saco radular contiene los dientes radulares y consiste en una vaina bilobulada con un brazo dorsal largo y un brazo ventral corto (Brusca y Brusca, 2003).

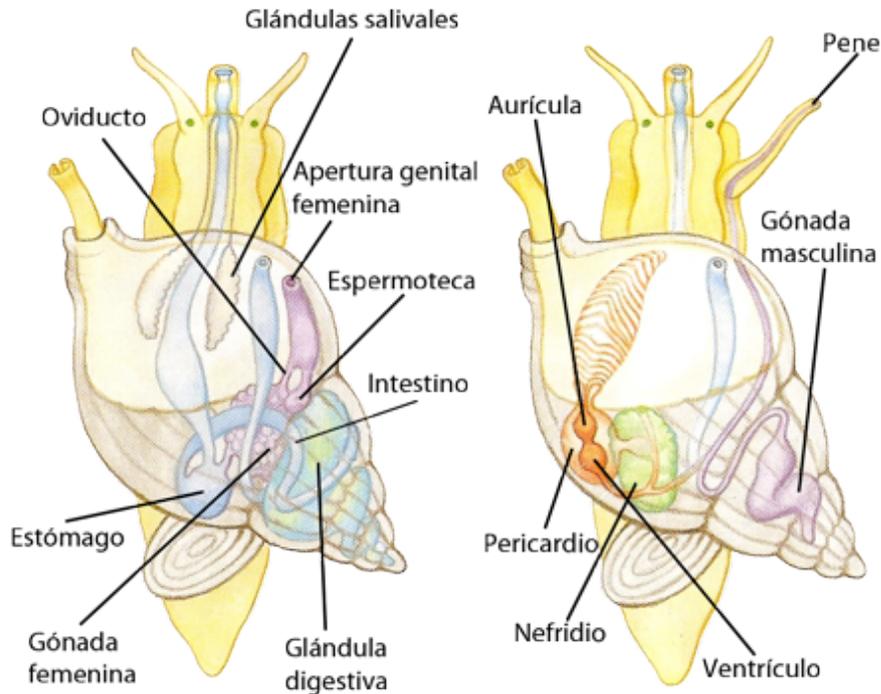


Figura 3. Aparato reproductor de los gasterópodos: femenino (izquierda) y masculino (derecha)(imagen tomada de Gabbi, 2006).

Características del género *Conus*

Dentro del grupo de los gasterópodos prosobranquios marinos, se ubica a la familia Conidae. Los ejemplares típicos de ésta familia son llamados conos (género *Conus*) por su concha cónica; la abertura de la concha es típicamente larga y estrecha. El opérculo se encuentra sobre la parte dorsal del pie extendido; sin embargo, es demasiado pequeño para sellar la abertura cuando se retira el pie; esta estructura puede ser una estructura vestigial. El sifón es corto pero prominente y en algunas especies muestra un patrón de bandas coloridas; la región de la cabeza es pequeña como en la mayoría de los gasterópodos. La boca verdadera está localizada en la punta de la probóscide extendible (Kohn y Perron, 1994).

El género *Conus*, con alrededor de 700 especies, habita principalmente ambientes marinos tropicales y diferentes tipos de fondos, incluyendo zonas rocosas, planos de arena o lodo, arrecifes de corales y praderas de pastos marinos; se encuentran desde la zona

intermareal hasta profundidades mayores a 1000 m (Figura 4)(Terlau y Olivera, 2004).

Los conos son animales carnívoros que se alimentan principalmente durante la noche. En función de las presas que consumen han sido divididos en tres grupos: los miembros del grupo más grande (vermívoros) se especializan en consumir diversos tipos de gusanos, principalmente poliquetos; un segundo grupo se alimenta de otros moluscos gasterópodos (molusquívoros), y finalmente están los que consumen peces (piscívoros). Por otra parte, se sabe que algunos *Conus* spp. también se alimentan de hemicordados, ofiúridos y moluscos bivalvos. Algunas especies de *Conus* spp., tales como *C. californicus*, que ha colonizado hábitats de aguas frías, no tienen que competir con otras especies y por lo tanto son generalistas (Kohn y Waters, 1966). Se caracterizan por tener un aparato generador de veneno muy especializado, el cual está compuesto por la probóscide, un ducto tubular venenoso y el bulbo venenoso; la probóscide es una estructura que se comunica con el esófago y la rádula; los componentes del veneno son sintetizados en las células epiteliales alineadas en el ducto tubular de veneno y el contenido de este ducto es transportado dentro de la probóscide (Figura 5)(Gabbi, 2006; Halai y Craik, 2009; Kohn *et al.*, 1960; Songdahl, 1973; Terlau y Olivera, 2004).

Los *Conus* spp. tienen sexos separados y la fertilización es interna como en la mayoría de los miembros del orden neogastropoda, al cual pertenecen estas especies; la copulación es raramente observada; la hembra presenta un receptáculo seminal pero no se sabe qué es lo que pasa en el periodo comprendido entre el apareamiento y el desove, ni cuantos espermias son depositados, ni tampoco si hay apareamientos múltiples o si la paternidad en las crías es mezclada (Kohn y Perron, 1994).

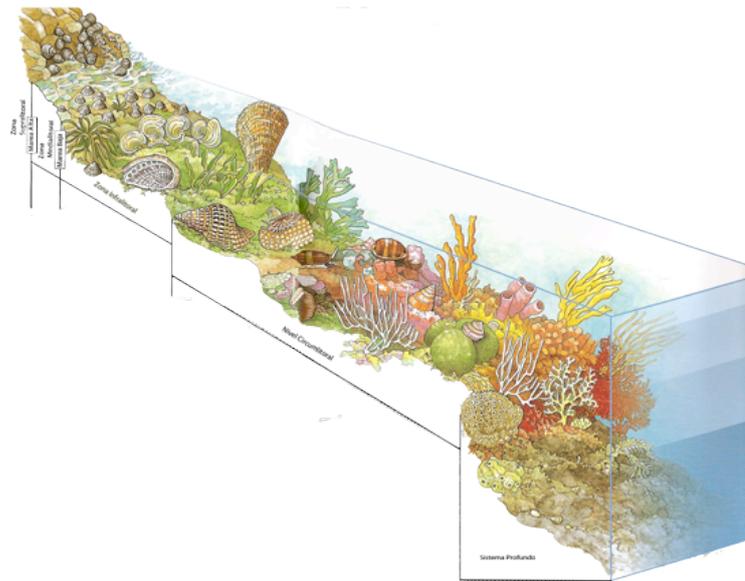


Figura 4. Representación de los diferentes hábitats del género *Conus* (imagen tomada de Gabbi, 2006).

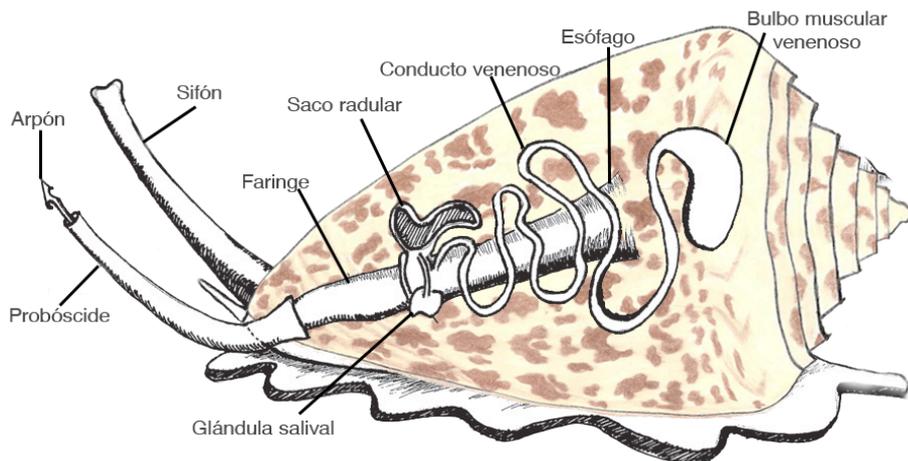


Figura 5. Aparato generador de veneno del género *Conus* (imagen modificada de Halai y Craik, 2009).

Características de la especie *Conus spurius*

Hablando de la especie de interés, *Conus spurius* (Figura 6), se sabe que se distribuye en Florida y el Golfo de México, y habita arrecifes de coral en aguas someras y profundas (100-400 m) (Figura 6) (Kohn *et al.*, 1960; Sygo, 1999). Las características anatómicas

principales de *C. spurius* son: una sola concha enrollada en espiral segregada por la superficie del manto y compuesta por carbonato de calcio y minerales, es color crema con hileras de rombos colocados en espirales o en manchas moteadas; puede llegar a medir 76 mm de largo y 38 mm de ancho; presenta de 9 a 10 espiras, las tres primeras forman una espira aplanada y la abertura es larga y estrecha; el cuerpo está constituido básicamente por una cabeza diferenciada, un bulbo bucal, una cavidad paleal donde se alojan las branquias alrededor del ano, y un pie musculoso; el canal sifonal forma sólo una muesca; el labio exterior es fino; su opérculo es córneo y pequeño (Brusca y Brusca, 2003; Galera *et al.*, 1989).

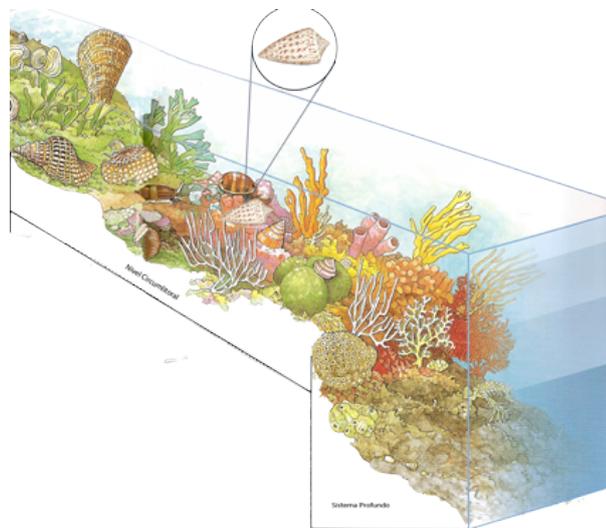


Figura 6. Representación del hábitat de *Conus spurius* (imagen tomada de Gabbi,2006).

El lóbulo grande del saco radular contiene 15-30 dientes orientados en dirección de la sección terminal de la vaina; el lóbulo pequeño contiene de 7-10 dientes, que apuntan a la faringe o a la dirección opuesta a los del lóbulo grande. La vaina radular es traslúcida y los dientes se pueden observar a través de ésta. Los dientes radulares son movidos individualmente dentro de la probóscide, y les sirven de arpón y aguja hipodérmica; los dientes son

de 2.1 a 3.0 mm de longitud en animales maduros, con una punta que tiene picos filosos en ambos lados, y con serraduras pequeñas aproximadamente desde el pico filoso anterior a la mitad del diente (Figura 7)(Brusca y Brusca, 2003; Songdahl, 1973). El ducto tubular venenoso es de 2 a 6 veces el largo de la concha, aproximadamente de 1 mm de diámetro en animales grandes y 0.5 mm en pequeños; el bulbo venenoso es de 4-22 mm de largo y con un diámetro de 2-5 mm dependiendo de la talla del animal (Songdahl, 1973).

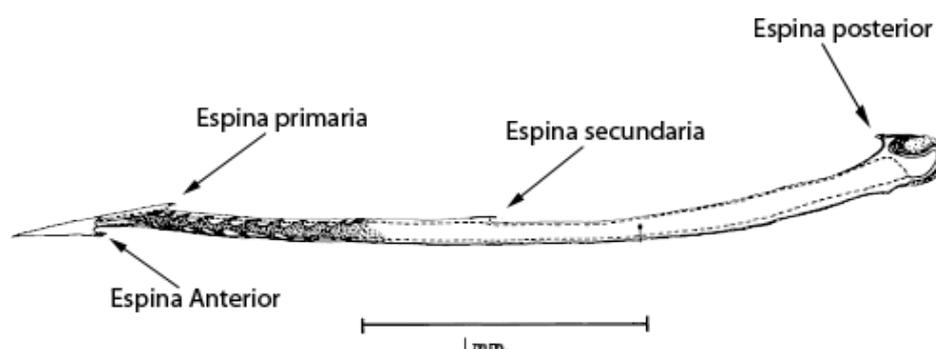


Figura 7. Diente radular de *Conus spurius*(imagen tomada de Songdahl, 1973).

Conotoxinas

La actividad biológica del veneno de cada especie de *Conus* se debe a un gran complemento de pequeños péptidos muy bien estructurados. Cada *Conus* spp. tiene de 100 a 200 diferentes péptidos en su veneno (Olivera, 1997; Olivera y Cruz, 2001).

Cada conopéptido es el producto final de un gen funcional y, como otras proteínas, tienen una conformación específica esencial para su gran afinidad e interacción con alta especificidad con una proteína blanco. La innovación bioquímica en los péptidos de los venenos de *Conus* surge a partir de la inusual característica de ser pequeños pero bien estructurados; con principalmente de 10 a 30 aminoácidos, incluyendo frecuentemente residuos de cisteína (Cys) que forman enlaces disulfuro. En este rango de tamaño, los enlaces

disulfuro juegan un papel muy importante ya que le brindan estabilidad a la molécula. En la mayoría de los casos los miembros de una superfamilia genética de conotoxinas se pueden definir por dos elementos de la secuencia del precursor: la secuencia del péptido señal, y el patrón característico o disposición de residuos de Cys (Tabla 1). Cada superfamilia genética de conopéptidos tiene uno o dos patrones característicos de residuos de Cys y enlaces disulfuros (Tabla 2). La mayoría de los péptidos de *Conus* se caracterizan por dos o tres enlaces disulfuro; sin embargo, existen también péptidos con cuatro a cinco enlaces y con 30 a 50 aminoácidos (Olivera, 2002).

Tabla 1. Superfamilias genéticas de conotoxinas (información tomada de Kaas *et al.*, 2010)

Superfamilia genética	Patrón de Cisteínas
A	I, II, IV, XIV
D	XX
I1	VI/VII, XI
I2	XI, XII
I3	VI/VII, XI
J	XIV
L	XIV
M	III, IV, VI/VII, IX, XVI
O1	VI/VII, XII
O2	VI/VII, XV
O3	VI/VII
P	IX
S	VIII
T	I, V, X, XVI
V	XV
Y	XVII

Tabla 2. Patrones de cisteínas (información tomada de Kaas *et al.*, 2010)

Número del patrón	Patrón de Cisteínas	Número de Cisteínas	Conectividad
I	CC-C-C	4	I-III, II-IV
II	CCC-C-C-C	6	
III	CC-C-C-CC	6	
IV	CC-C-C-C-C	6	I-V,II-III,IV-VI
V	CC-CC	4	I-III, II-IV
VI/VII	C-C-CC-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI
VIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10	
IX	C-C-C-C-C-C	6	I-IV, II-V,III-VI
X	CC-C.[PO]C	4	I-IV, II-III
XI	C-C-CC-CC-C-C	8	I-IV, II-VII, III-VII, VIII
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8	
XIII	C-C-C-CC-C-C-C	8	
XIV	C-C-C-C	4	I-III, II-IV
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8	
XVI	C-C-CC	4	
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8	
XVIII	C-C-CC-CC	6	
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10	
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10	
XXI	C-C-C-C-C-C-C-C	8	
XXII	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10	

La producción de una gran cantidad de péptidos pequeños biológicamente activos es una adaptación evolutiva de depredadores con movimientos lentos y carentes de aditamentos mecánicos para

capturar a sus presas o defenderse de los depredadores. Para un depredador venenoso, como lo son los conos, una alta especificidad de las toxinas puede ser una ventaja, particularmente si la velocidad del proceso de parálisis de la presa es un factor importante. Una especificidad limitada a uno o pocos blancos moleculares permite un uso más rápido y eficiente de un menor número de moléculas de toxina. Restringir la unión de una toxina al subtipo de receptor más relevante para determinado mecanismo fisiológico evita el desperdicio del ligando. Este hecho no excluye la posibilidad de que dos o más toxinas actúen sobre diferentes blancos moleculares y ejerzan su efecto de manera paralela con el fin de inmovilizar a la presa de manera más eficiente. Por ejemplo, el veneno del cono púrpura *Conus purpurascens* contiene múltiples neurotoxinas que tienen un efecto mediante dos mecanismos fisiológicos importantes: el bloqueo neuromuscular y el choque excitotóxico (Salceda y Ortega, 2009). Por otra parte, el pequeño tamaño de los conopeptidos hace posible su síntesis química en cantidades suficientes para hacer investigación bioquímica, farmacológica y fisiológica; gracias a esto la actividad biológica de varias decenas de toxinas se conoce, al igual que sus interacciones moleculares; así, el extenso análisis molecular se resume en la formación de una base de datos de más de 1,000 genes de 70 diferentes especies de *Conus*, lo que proporciona una visión de patrones generales de la divergencia interespecífica de las familias representadas. La diferencia química entre las familias farmacológicas de conotoxinas (Tabla 3) más estudiadas se describe a continuación (Olivera, 2002).

Tabla 3. Principales familias farmacológicas (información tomada de Kaas *et al.*, 2010).

Familia	Sitio de acción
α (alfa)	Receptores nicotínicos de acetilcolina (rACh-N)
γ (gamma)	Corrientes neuronales de cationes (hacia dentro)
δ (delta)	Canales de Na^+ activados por voltaje (agonistas, retrasan la inactivación)
ϵ (épsilon)	Canales presinápticos de Ca^{2+} o receptores presinápticos acoplados a proteínas G
ι (iota)	Canales de Na^+ activados por voltaje (agonistas, no retrasan la inactivación)
κ (kappa)	Canales de K^+ activados por voltaje (bloqueador)
μ (mu)	Canales de Na^+ activados por voltaje (antagonista, bloqueador)
ρ (rho)	Receptores adrenérgicos alfa 1 (GPCR)
σ (sigma)	Canales iónicos activados por serotonina
χ (chi)	Transportadores neuronales de noradrenalina
ω (omega)	Canales de Ca^{2+} activados por voltaje (bloqueadores)

Conotoxinas con efecto en canales iónicos activados por voltaje

μ-conotoxinas

Estas conotoxinas son una de las tres familias farmacológicas que tienen efecto sobre canales de sodio, causando su inhibición (μ y μ O-conotoxinas) o retrasando la inactivación (δ -conotoxinas); tienen una elevada especificidad y selectividad por los diferentes subtipos de canales, llegando a discriminar entre las diferentes isoformas de los poros permeables al ión sodio ubicados en el músculo, neuronas o corazón. Tales características han hecho de ellas una herramienta imprescindible en el estudio de este tipo de canales. Sólo se ha obtenido una comprensión detallada de las interacciones con estos canales de las μ -conotoxinas, que contienen de 22 a 25 residuos de aminoácidos, y seis residuos de Cys con un arreglo clase III de Cys, y pertenecen a la superfamilia M; algunas de estas conotoxinas (GIIIA, GIIB, and GIIC) se unen al sitio 1 de canales de Na⁺ (Arias, 2006; Cestele y Catterall, 2000; Norton y Olivera, 2006).

La toxina PIIIA del caracol *C. purpurascens* tiene una fuerte preferencia por el subtipo del músculo esquelético, pero puede bloquear otros subtipos sensibles a tetrodotoxina (TTX), aunque con menor afinidad (Nielsen *et al.*, 2002; Safo *et al.*, 2000; Shon *et al.*, 1998). La conotoxina SmIIIA, de *C. stercusmuscarum*, bloquea canales iónicos resistentes a TTX en la rana, pero tiene poco efecto sobre las corrientes sensibles a la TTX de neuronas (West *et al.*, 2002). SmIIIA representa el primer antagonista específico que actúa sobre canales de Na⁺ resistentes a TTX (Norton y Olivera, 2006; Terlau y Olivera, 2004).

μO y δ conotoxinas

Las μ O y δ -conotoxinas son péptidos extraordinariamente hidrofóbicos. Las μ O-conotoxinas inhiben la conductancia del canal de Na⁺, pero no interactúan con el sitio 1 (Terlau *et al.*, 1996). μ O-MrVIA y μ O-MrVIB fueron aisladas de *C. marmoreus*, y ambas tienen 31 residuos peptídicos (McIntosh *et al.*, 1995b); μ O-MrVIA bloquea los

canales Nav1.2 expresados en ovocitos de *Xenopus*, así como las corrientes de Na⁺ en las neuronas piramidales del hipocampo en cultivo (Terlau *et al.*, 1996). Daly y colaboradores (2004) confirmaron que μ O-MrVIB tiene una estructura con un lazo inusualmente desordenada; esta flexibilidad aparente puede contribuir a la capacidad de esta conotoxina de unirse a canales de Na⁺ y de Ca²⁺. Mediante el uso de la estrategia de intercambio de dominio entre el subtipo Nav1.2 y Nav1.4 de canales de Na⁺, se demostró que las μ O-conotoxinas tienen interacción con el poro de la parte C-terminal del dominio-3 de los canales (Zorn *et al.*, 2006). MrVIB inhibe el subtipo Nav1.8 de canales de sodio resistentes a TTX, teniendo actividad analgésica potente y de larga duración en ratas (Bulaj *et al.*, 2006).

Las δ -conotoxinas bloquean la inactivación de las corrientes de Na⁺; esto se traduce en un estado de hiperexcitación que afecta a las células, lo que eventualmente puede llevar a una masiva hiperexcitación eléctrica del organismo completo. La unión extracelular de estas toxinas parece afectar eventos en la parte intracelular del canal de Na⁺ importante para la inactivación rápida. La δ -TxVIA de *C. textile* prolonga las corrientes de Na⁺ en las membranas neuronales en moluscos pero no en los sistemas de vertebrados, en los que se une a canales de Na⁺ sin efectos tóxicos. δ -PVIA, de *C. purpurascens*, provoca síntomas de excitación en ratones y peces, pero es inactiva en los moluscos, incluso en dosis 100 veces mayores; también retrasa la inactivación rápida de corrientes en canales Nav1.2, así como corrientes de Na⁺ registradas en neuronas del hipocampo en cultivo (Terlau *et al.*, 1996). δ -EVIA de *C. ermineus* afecta varios subtipos neuronales de canales de Na⁺ (Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6), pero no los subtipos del músculo (Nav1.4 y Nav1.5) (Barbier *et al.*, 2004). δ -PVIA es uno de los principales componentes del veneno de *C. purpurascens*, cuyos efectos excitatorios actúan sinérgicamente con la conotoxina κ -PVIIA que bloquea canales de K⁺, provocando la inmovilización casi inmediata de la presa. δ -GmVIA de *C. gloriamaris*

causa la ampliación del potencial de acción en las neuronas de *Aplysia* (Hasson *et al.*, 1995; Shon *et al.*, 1994). Las conotoxinas δ -PVIA y δ -SVIE tienen efectos en el retraso de la inactivación en las corrientes de Na⁺, pero en el caso de δ -SVIE el efecto es irreversible (West *et al.*, 2005). δ -TxVIA tiene una parte hidrofóbica en una cara de la molécula que puede ser importante para vincularse en el canal de Na⁺, mientras que δ -EVIA contiene una parte hidrofílica en la superficie de la molécula, mostrando efectos sobre canales sódicos neuronales, pero no sobre musculares, por lo que se considera que su potencial está en el tratamiento contra enfermedades caracterizadas por una defectuosa conducción nerviosa (Barbier *et al.*, 2004; Norton y Olivera, 2006; Terlau y Olivera, 2004; Volpon *et al.*, 2004).

κ , $\kappa\mathcal{A}$ y $\kappa\mathcal{M}$ -conotoxinas

Los canales de K⁺ son importantes no sólo en la fase de repolarización de los potenciales de acción, sino también para establecer el potencial de la membrana en reposo, y tienen una gran variedad de propósitos especializados en una amplia gama de tipos celulares. Varias familias de canales de K⁺ se conocen (Kv1.x, Kv2.x, etc.), cada una con una subunidad α que contiene seis dominios transmembranales. La región entre el segmento transmembranal quinto y sexto forma la vía de conducción de iones, que contiene cuatro subunidades que se unen para formar un canal funcional, que podrá ser homomérico (cuatro subunidades idénticas) o heteromérico (dos o más diferentes subunidades α). La primera conotoxina con objetivo en canales de K⁺ conocida es la κ -PVIIA, aislada a partir de *C. purpurascens* (Shonet *et al.*, 1998; Terlau *et al.*, 1996) la cual parece ser muy selectiva. Ferber y colaboradores (2004) han demostrado que $\kappa\mathcal{M}$ -RIIIK tiene baja afinidad por Kv1.2. Este péptido es también cardioprotector en modelos animales, donde los protege de isquemia debida a infarto en el miocardio (Lubbers *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003).

La primera conotoxina κ A es la κ A-SIVA, aislada de *C. striatus*, que causa parálisis en ratones. La κ A-SIVA puede activar potenciales neuronales dependientes de canales de Na^+ en reposo (Le Gall *et al.*, 1999).

Dentro de las κ M-conotoxinas se encuentra la κ M-RIIIK, aislada a partir de *C. radiatus*, que bloquea canales de K^+ teniendo gran afinidad por el tipo TSha1 (Norton y Olivera, 2006; Terlau y Olivera, 2004).

ω -conotoxinas

Estas conotoxinas actúan inhibiendo canales de Ca^{2+} , los cuales controlan varios procesos fisiológicos, tales como la liberación de neurotransmisores y la contracción muscular; este tipo de canales es de los más heterogéneos y poseen al menos seis tipos llamados L, N, P, Q, R y T, cada uno de ellos con diferentes subtipos (Augustine *et al.*, 1987; Randall, 1998). Estas toxinas han demostrado ser valiosas, no sólo como herramientas de investigación sino como nuevas alternativas para el tratamiento del dolor en enfermedades crónicas, ya que tienen actividad sobre canales de calcio tipo N. La inhibición selectiva de canales de Ca^{2+} en diferentes terminaciones presinápticas fue posible usando ω -conotoxinas. Existen múltiples isoformas de ω -conotoxinas, teniendo grandes diferencias en las secuencias de aminoácidos. De *C. magus* se obtuvo ω -MVIIA que es altamente específica para los canales de Ca^{2+} tipo N (Cav2.2), mientras que ω -MVIIC tiene preferencia en los canales P/Q (Cav2.1) (Hillyard *et al.*, 1992; Olivera *et al.*, 1987). ω -CVID, aislada de *C. catus*, actualmente se encuentra en la fase II de estudios clínicos, mientras que un análogo sintético del MVIIA (Ziconotide), aislado de *C. magus*, fue aprobado a finales de 2004 para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer. ω -GVIA es probablemente la conotoxina más usada en neurociencias como herramienta farmacológica, principalmente porque inhibe la transmisión sináptica; el grupo hidroxilo sobre la Tyr13, seguido del grupo amino en la Lys2, el grupo hidroxilo de la

Tyr22 y el grupo amino en el N-terminal, desempeñan un papel muy importante para la actividad de esta conotoxina (Flinn *et al.*, 1999; Lew *et al.*, 1997; Miljanich, 2004; Terlau y Olivera, 2004; Norton y Olivera, 2006).

γ-conotoxinas

Se sabe que estas toxinas tienen acción sobre canales iónicos inespecíficos. PnVIIA, aislada a partir de *C. pennaceus*, actúa sobre canales marcapasos en moluscos (Fainzilber *et al.*, 1995; Norton y Olivera, 2006).

Conotoxinas con efecto en canales iónicos activados por ligando

α-conotoxinas

Las α -conotoxinas son de los primeros conopeptidos caracterizados (McIntosh *et al.*, 1999a; McIntosh *et al.*, 1999b). Son antagonistas de los receptores nicotínicos de la acetilcolina (rACh-N), los cuales son canales iónicos dependientes de ligando que juegan un papel muy importante en la transmisión sináptica a lo largo del sistema nervioso central (Nicke *et al.*, 2004). Existen dos subclases de α -conotoxinas, capaces de discriminar entre rACh-N ubicados en el músculo y en las neuronas (Marshall y Harvey, 1990). Estos péptidos sólo actúan sobre un subtipo de receptor; por ejemplo, la toxina GID, aislada de *C. geographus*, tiene actividad sólo sobre los receptores subtipo $\alpha 3\beta 2$, mientras que AuIB, aislada de *C. aulicus*, es activa frente a los subtipos $\alpha 3\beta 4$ (Luo *et al.*, 1998; Nicke *et al.*, 2003). Tal especificidad sobre los subtipos de receptores convierte a este tipo de toxinas en una herramienta valiosa para el estudio de los subtipos de rACh-N. Por otro lado, otras α -conotoxinas pueden llegar a tener implicaciones en el desarrollo de agentes terapéuticos; por ejemplo, el péptido Vc1.1 de *C. victoriae* mostró resultados positivos que pueden conducir al desarrollo de fármacos analgésicos, ya que ha sido demostrado que esta toxina disminuye la respuesta vascular al dolor en ratas (Sandall *et al.*, 2003). El descubrimiento de estas toxinas permite asimismo el modelado computacional de las interacciones de

ligandos que tienen acción sobre los rACh-N neuronales, y estos modelos derivados de la similitud tridimensional de las proteínas que se unen a la acetilcolina permiten identificar las interacciones precisas de este tipo de toxinas con los diferentes subtipos de receptores. Los receptores nicotínicos funcionales son complejos pentaméricos. Las subunidades pueden ensamblarse dentro de receptores homopentaméricos funcionales (por ejemplo, subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$). La mayoría de los receptores nicotínicos en vertebrados son heteropentaméricos, que por lo general consisten en dos subunidades α y tres no- α , con 2-4 diferentes tipos de subunidades. El sitio de unión de la acetilcolina (ACh) se encuentra entre la subunidad α y la no- α , y dos ACh se deben unir al canal para que este pueda abrirse (McIntosh *et al.*, 1999a; McIntosh *et al.*, 1999b).

La subfamilia $\alpha 3/5$, es el mayor grupo de las α -conotoxinas presentes en venenos de *Conus* que cazan peces; tienen el patrón -CCX3CX5C-, y todas se unen a un subtipo de receptor nicotínico muscular. Múltiples conotoxinas $\alpha 3/5$, codificadas por diferentes genes, paralizan peces y generalmente pueden encontrarse en un solo veneno. La subfamilia $\alpha 4/3$, con un patrón -CCX4CX3C-, se limita a un grupo de especies que consumen anfinómidos (poliquetos marinos). Las más estudiadas de esta subfamilia son α -ImI y α -ImII de *C. imperialis*, donde ambas inhiben el receptor homomérico compuesto por subunidades $\alpha 7$ (Ellison *et al.*, 2004; Ellison *et al.*, 2003). Un miembro de la subfamilia $\alpha 4/3$ de *C. regius*, α -RgIA, es un antagonista altamente específico de receptores $\alpha 9/\alpha 10$ (Ellison *et al.*, 2006).

La subfamilia $\alpha 4/7$, con el patrón-CCX4CX7C-, se liga a diversos receptores nicotínicos, incluyendo el subtipo del músculo (por ejemplo, α -EI), receptores homoméricos como el subtipo $\alpha 7$ (α -PnIB), y subtipos neuronales heteroméricos (α -MII y α -AuIB). Su “versatilidad” depende en gran medida de su secuencia de aminoácidos, con sólo unas pocas sustituciones provocando un

cambio en la orientación y afinidad (McIntosh *et al.*, 2005; Norton y Olivera, 2006; Terlau y Olivera, 2004).

ψ-conotoxinas

Son las conotoxinas más grandes en cuanto al número de residuos de aminoácidos que tienen un efecto antagónico no competitivo en receptores nicotínicos de acetilcolina en músculo; estudios electrofisiológicos sobre receptores nicotínicos de acetilcolina clonados a partir del músculo esquelético de rata y el órgano eléctrico del pez *Torpedo* sp. demuestran que las corrientes normales producidas por acetilcolina son antagonizadas por estas toxinas y la inhibición no es competitiva (López-Vera *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 1998; Shon *et al.*, 1997).

σ-conotoxinas

La GVIIIa es el único conopéptido, representante de este grupo, que desplaza competitivamente al antagonista Zacopride de los receptores de serotonina, particularmente del subtipo 5-HT₃ (England *et al.*, 1998; López-Vera, 2005; Norton y Olivera, 2006).

Conantokinas

Son antagonistas de receptores de glutamato, específicamente de los receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) (Olivera y Cruz, 2001). El conopéptido mejor caracterizado de este grupo es la conantokina-G, que tiene 17 residuos de aminoácidos sin puentes disulfuro, y cinco residuos de γ -carboxiglutamato (Gla o γ); en este momento se encuentra en un estudio clínico como medicamento contra la epilepsia. Esta toxina produjo hiperactividad cuando fue inyectada en el cerebro de ratones adultos; así mismo, demostró ser un potente bloqueador de las actividades del NMDA en porciones cerebrales extraídas de rata; tal bloqueo es no competitivo. También se ha demostrado que esta conotoxina es neuroprotectora en el modelo de isquemia cerebral transitoria en ratas, y también fue activo en un modelo de enfermedad de Parkinson (McIntosh *et al.*, 1984; Norton y Olivera, 2006; Williams *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002).

Otras conantokinas de diferentes caracoles piscívoros son: conantokina-T (Haack *et al.*, 1990), conantokina-R (White *et al.*, 2000) y conantokina-L (Jimenez *et al.*, 2002). La Conantokina-R muestra una actividad anticonvulsiónante potente, acompañada de una toxicidad baja que afecta el comportamiento de ratones (White *et al.*, 2000). Curiosamente, la conantokina-L, que tiene una secuencia casi idéntica a la conantokina-R, excepto en el extremo carboxilo, muestra una menor potencia en la actividad anticonvulsiónante, a pesar de que también es un antagonista del receptor NMDA (Jimenez *et al.*, 2002).

ε-conotoxina

Uno de los péptidos aislados perteneciente a la superfamilia T es ϵ -TxIX, a partir de *C. textile*; este péptido tiene un patrón de enlaces disulfuro de cuatro residuos de cisteínas y tiene varias modificaciones postraduccionales que incluyen bromación, hidroxilación y glicosilación, lo cual define a una familia de conotoxinas que pueden actuar en canales presinápticos de calcio; sin embargo, este péptido podría actuar en receptores presinápticos acoplados a proteínas G a través de otro mecanismo, que reduce el flujo de Ca^{+2} en la terminales presinápticas en *Aplysia* sp. ya que disminuye selectivamente la liberación del neurotransmisor que se libera en estas terminales (Rigby *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999).

Conotoxinas con actividad en transportadores

χ-conotoxinas

MrIA y MrIB pertenecen a este grupo y fueron aisladas a partir de *C. marmoreus*; inhiben a los transportadores de noradrenalina y son muy parecidas estructuralmente a las α -conotoxinas, pero la diferencia radica en la conectividad de puentes disulfuro 1-4 y 2-3 (López-Vera, 2005; McIntosh *et al.*, 2000).

λ-conotoxinas

Los blancos de este grupo de conotoxinas se desconocen pero debido a que λ -CMrVIB es idéntica a χ -MrIA se cree que podrían

actuar en los transportadores de noradrenalina (Balaji *et al.*, 2000; López Vera, 2005).

Conotoxinas con efecto en receptores acoplados a proteínas G

Conopresinas

La actividad biológica observada de las conopresinas al ser inyectadas intercranealmente en ratones es muy similar a la provocada por la hormona vasopresina de vertebrados. Las secuencias de péptidos purificados revelan características únicas no observables en vertebrados, más específicamente una carga positiva adicional (Cruz *et al.*, 1987).

Contulakinas

La contulakina-G tiene efecto en el receptor de neurotensina humano tipo 1 y en el tipo de 2 de ratas, antagonizando estos receptores (Craig *et al.*, 1999).

ρ-conotoxinas

Están implicadas en mecanismos de acción noradrenérgicos; se ha purificado ρ-TIA a partir de *C. tulipa*, la cual presenta el mismo patrón que la subfamilia α4/7, con la misma conectividad de puentes disulfuro pero inhibe a los α1-adrenoreceptores (López-Vera, 2005; Norton y Olivera, 2006; Sharpe *et al.*, 2001).

Modificaciones postraduccionales

Una característica que tienen las toxinas de venenos de *Conus* spp. es una alta frecuencia de modificaciones postraduccionales como lo son: formación de puentes disulfuro, hidroxilación de la prolina, amidación del carboxilo terminal, carboxilación del ácido glutámico, bromación del triptofano, isomerización del triptofano, ciclización del N-terminal (glutamina), sulfatación de tirosina, O-glicosilación de serina, entre otras. Una de las modificaciones más estudiadas es la conversión de glutamato a γ-carboxiglutamato por una enzima utilizada para otros fines metabólicos, la γ-glutamil carboxilasa, estrechamente relacionada con enzimas homólogas presentes en vertebrados y animales de otros filos como lo son insectos y tunicados,

lo que sugiere que proviene de un antiguo linaje (Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Buczek *et al.*, 2005; Olivera, 2002). Estudios sobre esta enzima indican que la unión al substrato es mediada a través del reconocimiento de una secuencia señal en la región propéptido, una región que se corta a medida que el péptido maduro se genera. Se ha encontrado que los genes de los péptidos tienen señales codificadas generalmente en la región “pro” del precursor que se unen a las distintas enzimas encargadas de las diferentes modificaciones post-traduccionales; estas enzimas actúan sobre un aminoácido estándar particular en la región de la toxina madura para convertirlo en un aminoácido con grupos funcionales no presentes en los aminoácidos que se incorporan durante la síntesis de proteínas (Olivera, 2002).

Signos, síntomas y tratamiento de picaduras de *Conus*

Cuando existe incidentes con picaduras de *Conus* spp. se presentan generalmente los siguientes síntomas: la zona de la picadura se hincha, con una coloración pálida o azul, con la sensación de un dolor agudo inicialmente seguido de entumecimiento que puede durar varios días o semanas después de la picadura. También se pueden presentar signos de trastornos neurológicos como son debilidad, falta de coordinación y perturbaciones en el habla, visión y audición. Los síntomas menos comunes incluyen náuseas y purito generalizado. Un envenenamiento grave puede causar la muerte debido a una parálisis respiratoria que ocurre en pocas horas, e incluso minutos.

No existe antídoto ni tratamiento específico para picaduras de caracoles cono, sin embargo, los primeros auxilios que se aplican son presionar el área afectada e inmovilizarla. La herida se considera que puede ser fácilmente infectada por lo que se utiliza la vacuna contra el tétanos (Nimorakiotakis y Winkel, 2002).

Signos, síntomas y tratamiento de picaduras de *Conus spurius*.

La picadura del diente radular es muy dolorosa; los síntomas iniciales son isquemia, cianosis y adormecimiento alrededor de la herida, se puede registrar también una fuerte sensación de quemadura parecida al piquete de una avispa y hay quienes afirman que el piquete es sumamente doloroso; alrededor del piquete suele presentarse inflamación. El adormecimiento u hormigueo se irradian del lugar de la herida a todo el cuerpo, también se presenta el adormecimiento en labios y boca. En casos severos puede presentarse una parálisis general de los músculos voluntarios, afonía, dificultad para tragar saliva, visión borrosa o doble, y náuseas. El periodo de recuperación varía desde una hora hasta varios días. Durante este lapso el paciente se siente débil.

El tratamiento que se recomienda es lavar la herida con agua corriente y jabón, desinfectar con tintura de yodo, aplicar compresas de hielo, bicarbonato de sodio y vinagre; también, aplicar pomadas con benzocaína u otros analgésicos locales como xilocaína al 5 %. Se recomienda el uso de neostigmina y oxígeno (Galera *et al.*, 1989).

ANTECEDENTES

La investigación sobre los productos de origen marino para la fabricación de fármacos se inicia aproximadamente en 1920 con organismos provenientes de zonas poco profundas del océano; en la década de 1960 al iniciarse el desarrollo del buceo SCUBA, que se utiliza como una herramienta de investigación, aumenta la exploración del océano y el estudio de organismos de zonas más profundas (Venugopal, 2009).

De *C. geographus*, hay aproximadamente tres docenas de víctimas de muerte reportadas en la literatura médica; a pesar de esto no fue hasta 1956 que Kohn comenzó a investigar la ecología de los caracoles cono, y descubrió que algunas especies eran especialistas

envenenando y capturando peces para alimentarse (Kohn, 1956; Olivera, 2002). La letalidad de *C. geographus* envenenando seres humanos atrajo la atención de la comunidad dedicada a la toxicología, y se llevó a cabo una caracterización fisiológica y farmacológica de los venenos de unos pocos caracoles cono. El primer estudio exhaustivo de los efectos de diferentes venenos de *Conus* spp. demostró que existen diferencias notables en la potencia de estos venenos; en particular, los conos que cazan peces tienen mayor letalidad en humanos, que los demás grupos (Kohn *et al.*, 1960).

La farmacología de compuestos marinos se inicia en 1969; en este año fueron aislados alrededor de 10,000 compuestos de organismos marinos, muchos de ellos de esponjas y de otros invertebrados que habitan el arrecife coralino. Para los venenos de conos los primeros trabajos elaborados por Endean y colaboradores sugirieron que tienen propiedades farmacológicas inusuales no observables en otros venenos (Endean *et al.*, 1977a; 1979; Endean e Izatt, 1965; Endean *et al.*, 1974; Endean *et al.*, 1977b; Endean *et al.*, 1976; Venugopal, 2009).

El primer bioquímico que intentó caracterizar componentes activos a partir de venenos de caracoles conos fue Spence, quien de *C. geographus* purificó una toxina que paralizaba el músculo inhibiendo los potenciales de acción en éste; con su trabajo determinó la composición de aminoácidos pero no completamente (Spence *et al.*, 1977); sin embargo, fue el primero en purificar un péptido a partir de venenos de *Conus*, el cual pertenece a un grupo que actualmente se conoce como μ -conotoxinas, las cuales bloquean canales de sodio, al igual que la tetrodotoxina y saxitoxina, pero con una alta selectividad.

El primer péptido del cual se estableció su secuencia y su síntesis química fue la α -conotoxina GI, un péptido de 13 aminoácidos con dos enlaces disulfuros, obtenido a partir de *C. geographus* en el año de 1978 y analizado completamente en 1981 (Cruz *et al.*, 1978; Gray *et al.*, 1981).

La investigación de biotoxinas de origen marino se centra principalmente en la constitución química de las sustancias y su potencial bioquímico, que se volvió evidente durante 1980, y se convirtió en el centro de atención de químicos y farmacólogos. Los primeros análisis sistemáticos bioquímicos de los venenos *Conus* spp. se centraron sólo en especies como son: *C. geographus*, *C. striatus* y *C. magus*. Olivera *et al.* (1985) demostraron que los principales componentes activos presentes en los venenos de *Conus* suelen ser péptidos pequeños, con una función en canales iónicos (Nagabhushanam, 2004; Olivera, 2002). La idea de que las fracciones del veneno de *Conus* fueran inyectadas directamente en el sistema nervioso de mamíferos surge de un estudiante de 18 años de la Universidad de Utah llamado Craig Clark en el año de 1981; a partir de este momento se iniciaron estudios sobre los posibles efectos en el sistema nervioso central de este tipo de toxinas (Clark *et al.*, 1981); el interés por el efecto biológico de las conotoxinas da inicio por un estudio en ratones elaborado por Olivera y colaboradores en el año de 1990 en donde se observaron diversos efectos biológicos de las conotoxinas (Anexo 1) (Olivera *et al.*, 1990).

Durante 1990, con el avance la farmacología molecular, además de la tecnología recombinante del ADN, hubo un crecimiento en el uso de productos de origen marino para la fabricación de medicamentos. Con el estudio realizado por Olivera y colaboradores (1990) se descubrió que algunos péptidos del veneno de *Conus* tienen propiedades farmacológicas únicas, y a partir de este momento se incrementó la caracterización de los componentes del veneno; reconociendo que este veneno es extraordinariamente complejo y que una sola especie puede expresar de 100 a 200 péptidos diferentes (Nagabhushanam, 2004; Venugopal, 2009). En este mismo año Woodward y colaboradores reportaron el primer análisis molecular para este género, donde obtuvieron cADN del caracol *Conus textile* a partir del ARN mensajero del ducto venenoso; descubrieron que estos péptidos son traducidos inicialmente como prepropéptidos con una

fragmentación proteolítica específica necesaria para la generación del péptido maduro; algunos elementos de estos precursores son conservados, en particular la secuencia señal del extremo amino (Woodward *et al.*, 1990).

En el año de 1994, después de la tetrodoxina, la ω -conotoxina GIVA se convirtió en la toxina más utilizada en la neurociencia, por sus propiedades de inhibición sináptica y por su efecto en corrientes de Ca^{2+} (Olivera *et al.*, 1994).

El primer fármaco obtenido a partir de conopéptidos es ziconotide; un péptido sintético idéntico a la ω -conotoxina MVIIA, del veneno de la especie *C. magus*, que bloquea canales de calcio (Cav2.2) en mamíferos; ha sido aprobado en Estados Unidos y otros países, y es utilizado para el tratamiento de dolor crónico. También tiene potencial para la prevención de isquemia neurodegenerativa debida a un fuerte golpe en el cerebro; este segundo uso se encuentra en la fase II de tratamiento clínico en humanos. Entre los efectos secundarios de este medicamento se encuentran depresión y alucinaciones. El ziconotide fue descubierto en el año 1982 por Michael McIntosh; el fármaco fue desarrollado en su forma sintética por Elan Corporation y fue aprobado por la Agencia de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration, FDA) de Estados Unidos en diciembre de 2004 bajo el nombre de "Prialt" para su administración en el fluido cerebroespinal. La Comisión Europea aprobó su uso el 22 de febrero de 2005 (Livett *et al.*, 2006; McIntosh *et al.*, 1982; Watters y Stommel, 2004).

De la especie *C. spurius* se ha purificado, por ejemplo sr5a, la cual mostró un patrón de la familia T-conotoxinas y causa depresión en la actividad de ratones (Aguilar *et al.*, 2006); CNF-Sr1 que es el primer péptido perteneciente a la familia RFamida aislado de algún veneno con 12 aminoácidos presenta la siguiente secuencia GPMGWVPVYRF-NH₂, (Maillo, 2002), posteriormente se aisló CNF-Sr2, la cual contiene 12 aminoácidos sin residuos de Cys y causa

hiperactividad en el caracol *Pomacea paludosa* y en ratón (Aguilar *et al.*, 2008); sr11a que muestra ocho residuos de Cys dispuestos en un patrón que define a las I-conotoxinas la cual produce rigidez en cuerpo, extremidades y cola, en ratones (Aguilar *et al.*, 2007); sr7a presenta 32 aminoácidos y contiene seis cisteínas dispuestas en el patrón (C-C-CC-C-C) que caracteriza a la superfamilia O, que se dirigen a canales de Ca²⁺, K⁺, y Na⁺; este péptido provoca parálisis en el músculo pedal de caracoles *P. paludosa* (Luna-Ramirez *et al.*, 2007); α -SrIA/B bloquean receptores nicotínicos musculares y neuronales ($\alpha 4\beta 2$) (López-Vera *et al.*, 2007).

Específicamente, es de interés continuar el estudio de dos proteínas de 10 kDa caracterizadas parcialmente a partir del veneno de *C. spurius* (Maillo Peñalver, 2001), ya que hasta el momento sólo se conocen pocas conotoxinas de masas moleculares similares. La primera descrita es una conotoxina aislada a partir de *C. geographus* con un peso molecular de 13 kDa que produce convulsiones; sin embargo, no está totalmente descrita su estructura molecular (Clark *et al.*, 1981). En el rango de pesos moleculares altos está también la Conodipina-M, aislada a partir del veneno de *C. magus*, que contiene 137 aminoácidos; es una fosfolipasa A2 con una masa molecular de 13.6 kDa y está compuesta por dos cadenas de polipéptidos unidas por uno o más enlaces disulfuros (McIntosh *et al.*, 1995a). Con 84 aminoácidos (8.8 kDa) está la conofisina-R aislada de *C. radiatus* la cual tiene una configuración C-C-C-CC-C-C-C-C-CC-C-C con 7 enlaces disulfuro, que muestra una secuencia similar a péptidos de la familia de las neurofisinas (Lizaran *et al.*, 2002). En un estudio realizado por Loughnan y colaboradores en el 2006, se describen los conopéptidos α D-VxXIIA, α D-VxXIIB y α D-VxXIIC, purificados a partir de *C. vexillum*, de aproximadamente 11 kDa; son pseudo homodímeros con 47-50 residuos en cada monómero, el cual tiene 10 residuos de cisteína y modificaciones post-traduccionales que contribuyen a su heterogeneidad; estos péptidos son inhibidores de

receptores nicotínicos de Acetilcolina, con selectividad en las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ de los receptores (Loughnan *et al.*, 2006). En un estudio más reciente se descubrió un polipéptido llamado con-ikot-ikot, aislado a partir de *C. striatus*, con 86 aminoácidos incluyendo 13 cisteínas y un peso molecular de 9.432 kDa; el precursor de este polipéptido tiene además 18 aminoácidos del péptido señal y 19 aminoácidos de la región propeptídica; este péptido causa la interrupción de la desactivación de los receptores de AMPA (Walker *et al.*, 2009).

Como se mencionó, *C. spurius* produce dos péptidos de aproximadamente 10 kDa: SpIVC tiene una masa de 10,069.7 Da y una secuencia parcial GEVSDNLMHCWLPEFRGCLLDCWNVFSRY; SpIVD tiene una masa de 10,037.8 Da y la secuencia parcial GEVSDNLLHCWLPEFRGCLLDCWN. Los nombres SpIVC y SpIVD fueron asignados de manera provisional y se derivaron del nombre de la especie, Sp por *C. spurius*; los números romanos provienen de la fracción cromatográfica estudiada y finalmente, "C" y "D" surgen del orden de aparición en la cuarta fracción. Un estudio preliminar sugiere que estos péptidos tiene efectos biológicos en ratones de 13 días de edad, inyectados intracranealmente: SpIVC (0.82 nmol/g) causa movimientos circulares, aumentando la velocidad conforme el tiempo desde la inyección, deteniéndose solamente con ruidos o al ser tocados; SpIVD (0.93 nmol/g) produce disminución en el movimiento (Maillo Peñalver, 2001). Una comparación preliminar entre conotoxinas conocidas hasta 2001 no indicó similitud significativa.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es la secuencia de aminoácidos de dos conotoxinas de 10 kDa del veneno del caracol marino *Conus spurius*?

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar dos proteínas de 10 kDa del veneno del caracol marino *Conus spurius* desde el punto de vista bioquímico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar, mediante técnicas cromatográficas, dos proteínas de 10 kDa del veneno del caracol marino *Conus spurius*.
- Determinar, mediante técnicas de espectrometría de masas, la masa molecular de las proteínas.
- Determinar, mediante degradación de Edman automática y espectrometría de masas, la estructura primaria de las proteínas.
- Tratar de identificar, mediante comparación con secuencias en bases de datos, el blanco molecular de las proteínas.

HIPÓTESIS

- Las proteínas de 10 kDa de *Conus spurius* tienen estructuras bioquímicas muy similares y distintas de otras conotoxinas.

JUSTIFICACIÓN

El océano es un ecosistema muy rico en cuanto a diversidad de organismos y se mantiene relativamente inexplorado, cuando hablamos de componentes que pueden ser utilizados como nuevos fármacos o como herramientas para estudios moleculares. Considerando que las especies marinas comprenden aproximadamente la mitad del total de la biodiversidad mundial, el ambiente marino ofrece un recurso enorme de compuestos nuevos; México es uno de los países más ricos en biodiversidad marina, debido a sus extensos litorales en los océanos Pacífico y Atlántico.

El estudio de las toxinas marinas como una opción de Biotecnología representa un campo de investigación relativamente nuevo. En los últimos años muchas toxinas han sido aisladas de

organismos marinos, las que se han estudiado con técnicas novedosas en química, farmacología y fisiología; se ha podido describir a qué grupo bioquímico pertenecen, su actividad biológica y, de algunos, su estructura y mecanismo de acción. La Biotecnología Marina representa un papel fundamental en el descubrimiento y desarrollo de productos naturales; utilizando, además de las técnicas ya mencionadas, la manipulación genética y las técnicas proteómicas.

De los caracoles predadores cono existen aproximadamente 700 especies alrededor del mundo, de los cuales se han purificado y/o clonado neurotoxinas de su veneno; a pesar de que el veneno de algunas especies han causado la muerte en humanos, las toxinas de estas especies contienen un gran potencial para la fabricación de fármacos; algunas de estas toxinas se utilizan, o se podrían utilizar, para disminuir el dolor y para tratamientos contra la epilepsia, entre otros usos farmacéuticos. Las conotoxinas se utilizan para estudiar canales iónicos y receptores, ya que bloquean principalmente canales que regulan el flujo de potasio, calcio o sodio a través de células nerviosas y musculares. Los péptidos activos más estudiados hasta la fecha muestran una alta especificidad por canales iónicos, siendo así una herramienta valiosa para el diagnóstico en la caracterización de patrones neuronales, como agentes terapéuticos en medicina y potencialmente como tóxicos biodegradables de agentes patógenos para aplicaciones en agro-veterinaria (Nagabhushanam, 2004; Terlau y Olivera, 2004; Venugopal, 2009).

Con este estudio se espera contribuir a la caracterización de conotoxinas de masa molecular más alta que la mayoría de las reportadas, como un primer paso para evaluar su posible uso en investigación básica (herramientas moleculares) o en la industria farmacéutica o agro-veterinaria. En la actualidad, varios de los fármacos fabricados a partir de toxinas contienen compuestos con un peso molecular mucho más alto o parecido con respecto a las conotoxinas de alto peso molecular, lo que hace factible su utilización;

por ejemplo, la toxina botulínica aislada a partir de *Clostridium botulinum*, tiene un peso molecular aproximado de 150 kDa (Carruthers y Carruthers, 2006); otro ejemplo se encuentra en el veneno del Alacrán Azul *Rhopalurus junceus* tiene efecto sobre canales de sodio y potasio, además de que tiene propiedades contra el cáncer; el componente principal tiene 65 aminoácidos y cuatro puentes disulfuros (García-Gomez *et al.*, 2011). Para la utilización de estas conotoxinas como cualquiera de estas herramientas se requiere previamente de su aislamiento y caracterización química, así como de bioensayos en animales de laboratorio. Si se encuentra alguna propiedad interesante, se podría seguir con las fases de pruebas clínicas (Fase I: tolerancia, fase II: interés terapéutico, y fase III: bioensayos a larga escala); esto podría permitir a nuestro país elaborar patentes que pueden ser utilizadas en todo el mundo.

METODOLOGÍA

Purificación

La purificación de las proteínas SpIVD y SpIVC se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) a temperatura ambiente, debido a que esta técnica sirve para la separación de diferentes moléculas termolábiles como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, terpenoides, plaguicidas, etc.

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen generalmente con un tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. En este caso se utilizó una columna C18 analítica (Vydac, 218TP54; tamaño de partícula 5 μm , 250 mm x 4.6 mm, con 300Å de tamaño de poro). Generalmente, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes; la composición del relleno de la precolumna debe ser semejante a la de la columna

analítica, por lo que se utilizó una precolumna C18 (Vydac, 218GK54; tamaño de partícula de 5 μm ; 10 mm x 4.6 mm, y 300Å de tamaño de poro).

En cromatografía de líquidos se han utilizado dos tipos básicos de rellenos, pelicular y de partícula porosa. Se le conoce como de fase reversa debido a que el relleno de la columna tiene un recubrimiento químico no polar. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C8 (n-octilo) o una cadena C18 (n-octadecilo). En estas preparaciones, los grupos de hidrocarburo de cadena larga se alinean el uno junto al otro y en perpendicular a la superficie de la partícula, dando una estructura semejante a una brocha. Las columnas analíticas C18 utilizadas tienen relleno de aglomerados de micropartículas porosas de sílice esféricas, con tipo de fase polimérica. Esta columna nos permite separar péptidos pequeños, como digestiones tríplicas y de otras enzimas.

En este tipo de cromatografía, la fase móvil es relativamente polar (como el agua, el metanol o el acetonitrilo); los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución. Por lo tanto, se utilizó una solución A preparada con 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) acuoso y una solución B con 0.085% (v/v) de TFA en 90% (v/v) de acetonitrilo (MeCN) acuoso. Se usó un paso isocrático de 33 % de solución B durante 5 min y un gradiente lineal de 33 a 53% de solución B en 80 minutos, con un flujo de 1 ml/min.

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la disolución que responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por otro lado están los detectores basados en una propiedad del soluto que responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, la fluorescencia, o la dispersión de luz, que no son propias de la fase móvil. El detector que

tiene el HPLC utilizado es de absorción UV; este tipo de detector se utiliza de forma restringida para aquellos solutos que absorben a algunas longitudes de onda que reconocen ciertos grupos funcionales orgánicos. En este caso se midió la absorción de los efluentes a 220 nm que es en dónde se puede detectar el enlace peptídico.

Cuantificación de las proteínas purificadas

Se llevó a cabo mediante el secuenciador automatizado, tomando como base el área de cantidades conocidas de los estándares de PTH-aminoácidos que normalmente se someten a cromatografía con cada muestra, con el fin de calibrar el equipo en cuanto al tiempo de retención de estos compuestos.

Determinación de la masa molecular

Este análisis se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Los péptidos SpIVC y SpIVD fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo de líquidos de micro-flujo Accela (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA) con “splitter” (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permite determinaciones con exactitudes mayores que 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solución B (Solución A = ác. acético 0.1%/agua; solución B = ác. acético 0.1%/acetonitrilo) en 120 minutos sobre una columna capilar PicoFrit Proteopep 2 C18 75 μm ID \times 50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nanolitros/minuto. Los valores de m/z producidos fueron desconvolucionados con el auxilio del programa Xtract (Thermo-Fisher Co.) para la determinación de las masas moleculares.

A los fragmentos obtenidos del péptido SpIVD con tripsina se les realizó una determinación de su masa molecular para conocer si los resultados obtenidos por secuenciación (residuos de aminoácidos y número de residuos) corresponden con su masa molecular.

Determinación de la estructura primaria por espectrometría de masas.

Una parte de la secuencia de la conotoxina SpIVD se determinó por el siguiente procedimiento: La proteína se separó por electroforesis unidimensional (TRIS-TRICINE-SDS-PAGE) siguiendo el protocolo elaborado por Schagger y von Jagow (1987) para la elaboración del gel, utilizando un voltaje inicial de 70 volts seguido de 90 volts, tiñendo con azul de Coomassie G-250; se cortaron dos bandas y se colocaron en un tubo de polipropileno de 1.5 ml, para procesar las muestras.

El primer paso para el análisis es la reducción de los puentes de disulfuro y la alquilación de las cisteínas, lo cual tiene como objetivos desnaturalizar las proteínas permitiendo que se expongan los sitios para el corte enzimático y, a la vez, evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares; estos últimos darían lugar a agregados covalentes, por ejemplo, dímeros. Estas modificaciones químicas son fundamentales, ya que para el análisis por espectrometría de masas se requiere que las proteínas sean digeridas a péptidos con masas moleculares menores que 3 kDa. Eso se debe a que las tecnologías de fragmentación de proteínas en espectrómetros de masas (para obtención de secuencias) aún son limitadas y péptidos con mayores masas moleculares producen informaciones estructurales no interpretables. La muestra, reducida y alquilada, generalmente se digiere con tripsina (enzima que corta específicamente en los C-terminales de lisina y arginina, excepto cuando éstas son seguidas de prolina); la elección de esta endoproteasa como enzima de corte no es casual. En su mayoría, los cortes trípticos generan péptidos con masas moleculares entre 1 y 2 kDa; además, permite la diferenciación entre los amino ácidos lisina y

glutamina (masas promedio de 128.2 y 128.1 Da, respectivamente), ya que todas las lisinas estarán posicionadas en el C-terminal de los péptidos trípticos; finalmente, propicia la presencia de por lo menos dos cargas positivas en el péptido (N-terminal y C-terminal con K o R) que posibilitarán la transferencia de carga a través de las ligaciones amídicas facilitando la fragmentación.

El análisis por espectrometría de masas involucra la ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa, la separación de las especies iónicas resultantes de acuerdo a la relación de su masa con su carga eléctrica (m/z), utilizando campos electromagnéticos en el vacío. Los espectrómetros de masas poseen tres componentes básicos: un sistema de ionización, un analizador de masas y un detector de iones. Este análisis se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Las muestras fueron reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida y digeridas "in gel" con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en el sistema LC-MS descrito en la sección anterior. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2^+ y 3^+ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron descartados los iones con cargas 1^+ , superiores a 4^+ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizadas de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas (z^{2+} y z^{3+}) en el método de adquisición, ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizada la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15

segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron analizados manualmente para la obtención de datos estructurales y también sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI nr a través del programa Mascot Search Result (Matrix Science Inc., Boston, MA) y ProteinProspector (Universidad de California, San Francisco).

Determinación de la estructura primaria por el principio de degradación de Edman

Debido al tamaño de las proteínas, fue necesario fragmentarlas; primero reduciendo los puentes disulfuro y alquilando las Cisteínas resultantes, y realizando una digestión mediante el uso de proteasas específicas. La presencia de residuos de Arginina y Lisina en el péptido SpIVD indicó que podría ser usada tripsina, ya que esta enzima corta en el lado carboxilo de estos aminoácidos.

Para la reducción, la proteína SpIVD se disolvió en 180 μ l del amortiguador 0.1 M de TRIS-HCl, pH 8.0, con 6 M de clorhidrato de guanidina. Se añadieron 45 μ l de 50 mM de ditioneol acuoso, mezclándose; la muestra se incubó a 65 °C durante 25 min. Para la alquilación y poder detectar los residuos de Cys durante la secuenciación, se añadió como agente alquilante 4 μ l de 4-vinilpiridina (4-VP), mezclando y quitando el aire de la muestra con N₂; la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 16 h en la oscuridad. La proteína piridiletalada fue purificada con la columna analítica C18 Vydac y las mismas soluciones utilizadas para la repurificación de las proteínas. Después de un paso isocrático con 10% de solución B durante 10 minutos, se desarrolló un gradiente lineal de 10 a 45% de la solución B en 35 minutos, a un flujo de 1 ml/min. Para cuantificar los picos resultantes se disolvieron con 20 μ l de Solución B, mezclando por dos minutos; posteriormente se le agregaron 40 μ l de la misma solución, repitiendo el proceso, hasta obtener un volumen final de 100 μ l; de esto se tomaron 3 μ l para secuenciar por degradación de Edman automatizada en un equipo

modelo Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) utilizando el método de pulsos de líquidos.

La digestión se llevó a cabo disolviendo la proteína piridiletilada en 200 μ l de solución de 0.1 M de NH_4HCO_3 , pH= 8.3, agregando 2 μ l de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de tripsina, mezclando bien, e incubando a 37 °C por 2 h. Los fragmentos obtenidos se separaron por HPLC-RP utilizando la columna C18 analítica con un gradiente de 0 a 100 % de solución B por 100 min.

Para la proteína SpIVC se realizó el mismo proceso anteriormente descrito para la reducción y la alquilación pero se digirió con la enzima proteasa V8 aislada a partir de *Staphylococcus aureus*, que tiene preferencia por hidrolizar el lado carboxilo de los aminoácidos ácidos (aspártico y glutámico). Para esto se disolvió la proteína piridiletilada en 200 μ l de solución 50 mM de KHPO_4 , pH=7.8, agregando 2 μ l de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteasa V8, mezclando bien; se incubó a 37 °C por 72 h. Los fragmentos obtenidos se separaron con HPLC-RP con las especificaciones anteriormente descritas.

Los fragmentos obtenidos con tripsina y con proteasa V8 se secuenciaron por degradación de Edman automatizada.

Búsqueda de similitudes en bases de datos y comparación de secuencias

Para buscar similitudes entre las proteínas SpIVD y SpIVC y otras proteínas depositadas en bases de datos se usó el programa BLASTP, en el servidor del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Uno de los programas más usados para la alineación múltiple de secuencias, es el CLUSTAL W2 y se empleó para comparar secuencias, usando el servidor del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute y la configuración predeterminada (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

RESULTADOS

Repurificación de SpIVD

Se repurificaron 6 muestras de la proteína SpIVD purificadas parcialmente con anterioridad a partir de 4 especímenes de *C. spurius* obtenidos del Mar Caribe, alrededor de Puerto Morelos, Quintana Roo; estos ejemplares fueron colectados por arrastre entre 37 y 100 m de profundidad en el año de 1999. De cada muestra se hicieron dos cromatografías, obteniéndose el cromatograma representativo mostrado en la figura 8; el componente mayoritario tuvo un tiempo de retención promedio de 36.56 min.

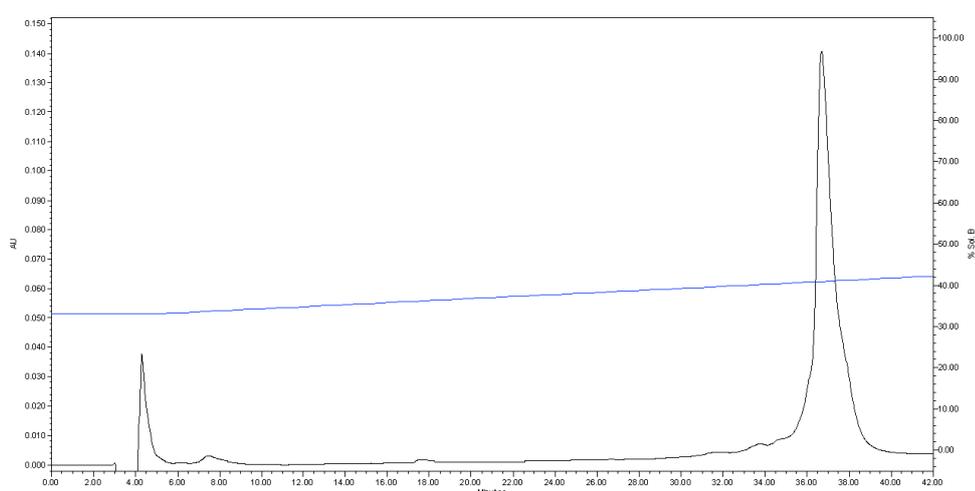


Figura 8. Cromatograma representativo obtenido de la repurificación del péptido SpIVD de *Conus spurius*.

Repurificación de SpIVC

Se repurificaron 6 muestras de la proteína SpIVC purificadas parcialmente con anterioridad a partir de 4 especímenes de *C. spurius* obtenidos del lugar y el año anteriormente descritos. De cada muestra se hicieron dos cromatografías, obteniéndose el cromatograma representativo mostrado en la figura 9; el componente mayoritario tuvo un tiempo de retención promedio de 33.20 min

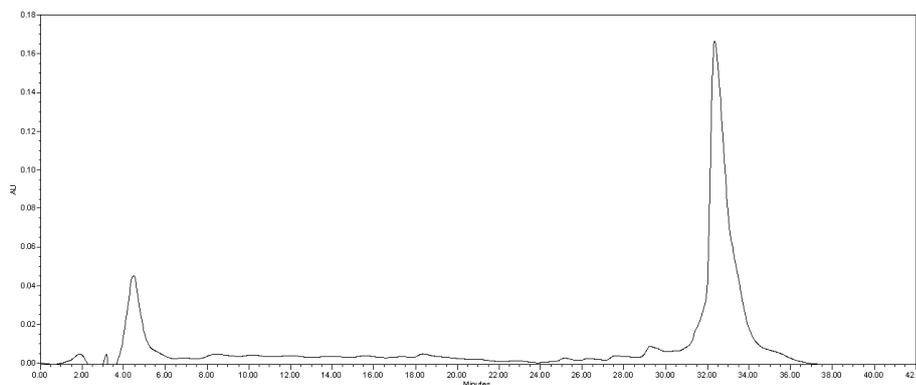


Figura 9. Cromatograma representativo obtenido de la repurificación del péptido SpIVC de *Conus spurius*.

Cuantificación de los péptidos

La sumatoria del área bajo la curva de todas las muestras colectadas en la repurificación del péptido SpIVD fue de $57,527,604 \mu\text{V}\cdot\text{seg}$, mientras que una alícuota de un péptido de referencia ($0.35 \mu\text{g}$) tuvo un área de $1,052,997 \mu\text{V}\cdot\text{seg}$. Por lo tanto, el material colectado corresponde aproximadamente a $19.29 \mu\text{g}$; tomando en cuenta la masa molecular determinada anteriormente ($10,037.8 \text{ Da}$), esto corresponde a aproximadamente 1921 pmol . Para SpIVC ($10,069.7 \text{ Da}$), el área bajo la curva total fue de $40,094,632 \mu\text{V}\cdot\text{seg}$, y un cálculo similar indicó que se obtuvieron $13.44 \mu\text{g}$ que corresponden a 1330 pmol .

La cuantificación de los péptidos que se llevó a cabo mediante secuenciación automatizada (2 ciclos) dio una cantidad ligeramente mayor de la calculada con base en comparación a la cuantificación anteriormente descrita para SpIVC (1500 pmol), y un poco menor para SpIVD (1700 pmol).

Determinación de la masa molecular

Las masas promedio se obtuvieron multiplicando el valor de la relación masa/carga (m/z) de los iones (por ej. SpIVC: 1116.98 , 1256.60 , 1435.83 y 1674.97) por su carga (SpIVC: 9 , 8 , 7 y 6 , respectivamente), restando el valor de la carga, y promediando los valores.

Las masas promedio obtenidas fueron 10,043.77 Da para SpIVC (Figura 10) y 10,025.80 Da para SpIVD (Figura 11).

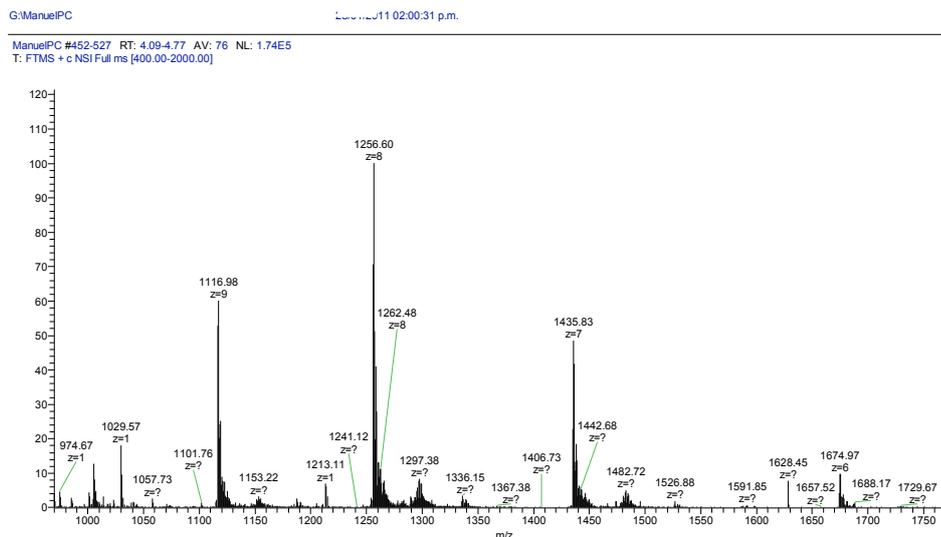


Figura 10. Resultados de la determinación de la masa molecular de la conotoxina SpIVC.

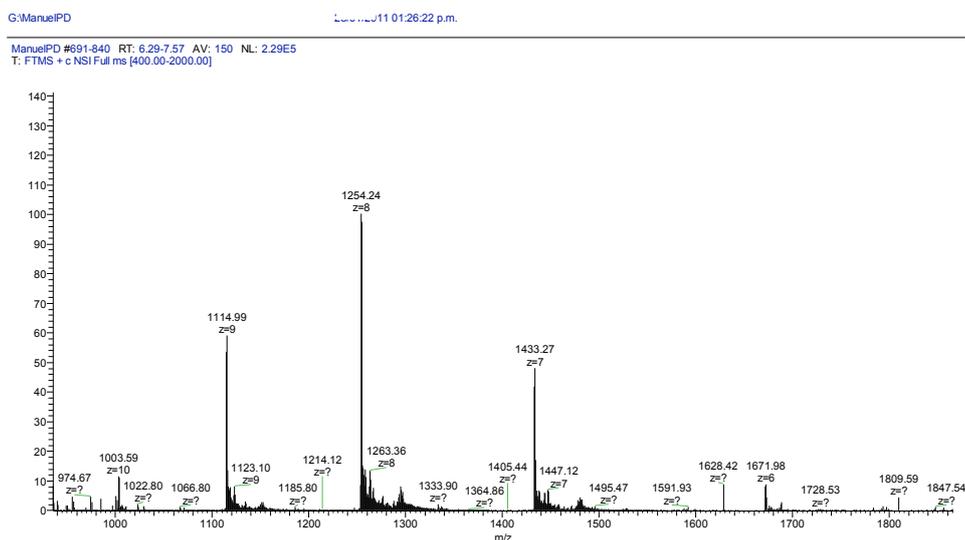


Figura 11. Resultados de la determinación de la masa molecular de la conotoxina SpIVD.

Determinación de la estructura primaria de la conotoxina SpIVD por espectrometría de masas.

Únicamente se pudo obtener la secuencia de una pequeña fracción (11 residuos) de la conotoxina: ETNSFDCT(L/I)FK cuyo espectro y análisis se muestran en la figura 12, en donde la diferencia

entre picos sucesivos es la relación m/z que representa a un aminoácido; la única ambigüedad es entre Leucina e Isoleucina que tienen la misma masa. La causa aparente de este resultado fue que la cantidad de muestra fue insuficiente. Las masas monoisotópicas del ión precursor que fue fragmentado por CID (1677.74 Da) y de la secuencia determinada (1360.58 Da, considerando la alquilación con yodoacetamida) indica que faltan 3 aminoácidos (317.16 Da) del extremo amino.

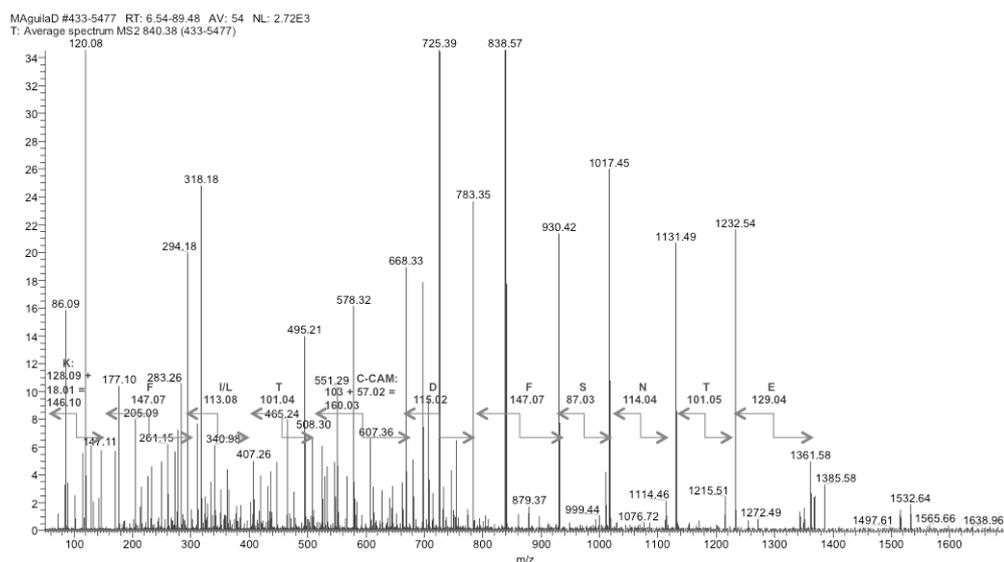


Figura 12. Secuencia obtenida por espectrometría de masas a partir de SpIVD reducida y alquilada con yodoacetamida y cortada con tripsina.

Determinación de la estructura primaria de las proteínas por el principio de degradación de Edman.

Para verificar la integridad de las proteínas, después de tanto tiempo de almacenamiento y después de la repurificación, se sometió a secuenciación una alícuota de SpIVC, observando que la muestra no ha sufrido proteólisis y se confirmó la secuencia obtenida anteriormente; se decidió analizar sólo una de las proteínas debido a la poca cantidad que se tenía y a que el almacenamiento fue el mismo (Maillo Peñalver, 2001):GEVSDNLMHCWLPEFRGCLLDCWNVFSRY (C, residuo por confirmar).

El cromatograma de la repurificación de la proteína SpIVD piridiletalada se observa en la Figura 13. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante el secuenciador de Edman para verificar cuales correspondían al SpIVD piridiletalado (y al mismo tiempo cuantificarlos), de acuerdo con la secuencia ya conocida de la parte amino; se obtuvieron 4 fracciones y dos de ellas se juntaron para ser digeridas con tripsina y las dos sobrantes se utilizaron para determinación de masas y verificar el nivel de alquilación.

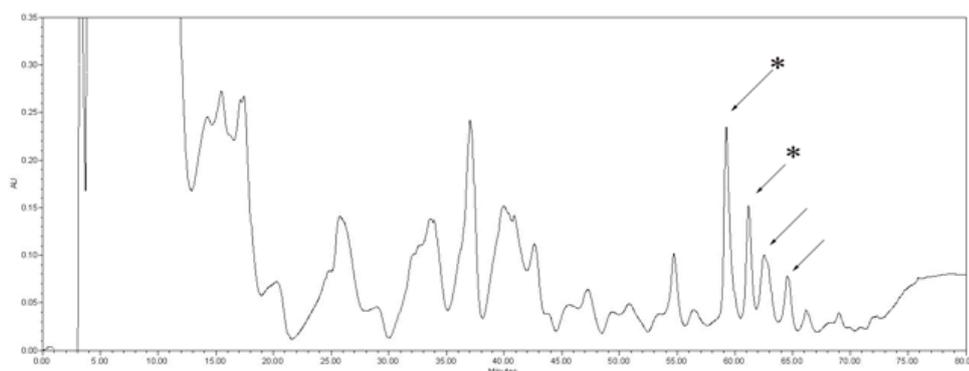


Figura 13. Cromatograma de la repurificación del péptido SpIVD piridiletalado. Las flechas señalan los picos en donde se encuentra el péptido alquilado y los indicados con asterisco (*) son los utilizados para digerirse con tripsina.

El péptido piridiletalado digerido con tripsina se muestra en el cromatograma de la Figura 14, en donde se representa con un número los fragmentos con los cuales se pudo obtener una secuencia usando 1/3 del total obtenido de cada uno de ellos.

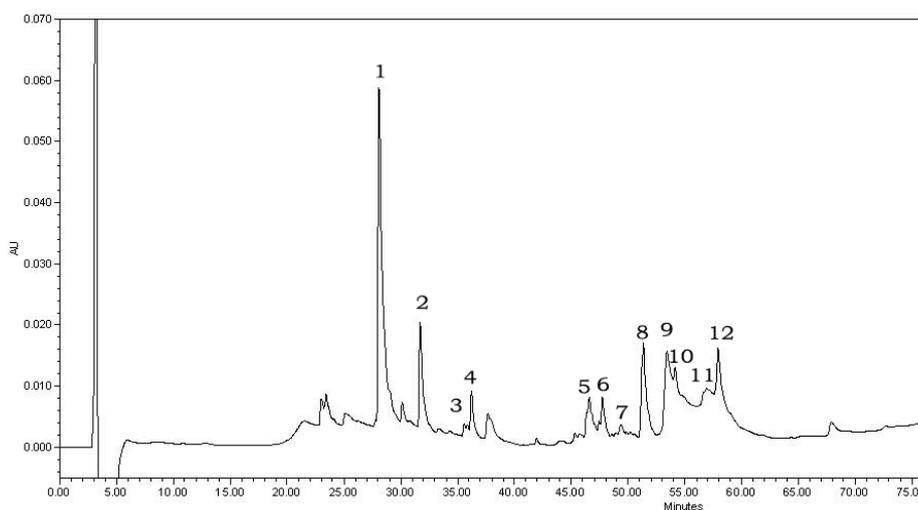


Figura 14. SpIVD piridiletalada digerida con tripsina; los números indican los picos que fueron secuenciados.

En la tabla 4 se muestran las secuencias obtenidas por secuenciación automatizada, así como la cuantificación de cada uno de los fragmentos obtenidos. Para el fragmento uno la secuencia es consistente con la enzima tripsina catiónica en las posiciones 92-97, y para el fragmento 2 (en la secuencia XGIQVS) en las posiciones 44-49; tomando en cuenta que el primer residuo del fragmento uno y dos no pudieron ser identificados debido a que aparecieron varios aminoácidos en el ciclo pero en poca cantidad, lo que podría identificarse como S que se observa en la enzima tripsina catiónica; para el primer fragmento, los residuos del 7 en adelante eran dudosos, sin embargo, se apreció un pequeño aumento de S en la posición 7 (lo cual concuerda con la tripsina catiónica) pero hubo un aumento mayor en la H razón por la cual se identificó ese aminoácido; en la posición 8 no se vio aumento de ningún aminoácido, pero a veces no se ve el último residuo de un péptido (R en el caso del fragmento SAASLNSR); finalmente, la posible K que identificamos en la posición 8 (aumento muy pequeño) pudo deberse a un artificio cromatográfico, ya que la señal era muy pequeña. Para el fragmento dos la R de la posición 6 se pudo apreciar, pero se interpretó tentativamente como una posible la R en la posición 6 del péptido tríptico de SpIVD-PE

(TCYYRR), lo cual fue descartado por el análisis de masas de este péptido triptico. La secuencia de la tripsina catiónica se muestra a continuación, señalando las secuencias correspondientes a los fragmentos 1 y 2).

IVGGYTCGANTVPYQVSLNSGYHFCGGSLINSQWVVSAAHCYKSGIQVRLGEDNINVVEG 60
 NEQFISASKSIVHPSYNSNTLNNDIMLIKLSAASLNSRVASISLPTSCASAGTQCLISG 120
 WGNTKSSGTSYPDVLKCLKAPILSDSSCKSAYPGQITSNMFCAGYLEGGKDCSQGDSGGP 180
 VVCSGKLQGIVSWGSGCAQKNKPGVYTKVCNYVSWIKQTIASN- 223

Tabla 4. Secuencias obtenidas a partir de la digestión de SpIVD con tripsina.

Fragmento	Secuencia(s)	Cantidad (pmol)
1	XAASLNHK	6.0
2	TCYYRR	45.8
	XGIQVS	26.7
3	CYAVCTEIAKK	24.6
	XYVLGXPXVPDXX	21.6
4	CYAVCTEIAK	60.8
5	LYVLETNSHDTTIND	14.9
	CLGHGSYNA_LHG	7.4
	GIV_PNPEV__N	15.1
	DEL DK	4.6
6	GCLLDCXNVXSRR	21.6
	LGXETNSXDCTIXX-	43.6
	GEVSDNLLXCXLPEX	
7	GEVS	7.8
8	GEVSDNL	57.0
9	GEVXDNLXX	2.0
	GXLLDCXNVX	
10	----XLNVNXX	3.2
	----XXLL----	
11	GEVSDNLLHX	18.0
	GXLLDXXXVX	7.1
12	GEVSDNLLXX	12.1

“X” = residuo no identificado; “-” = representa que no se observó nada en el ciclo de la secuenciación, pero se hizo el ciclo; “_” = representa que en los ciclos anteriores se observa una secuencia pero en ese ciclo no hay presencia de aminoácido.

Para SpIVC piridiletalada se obtuvo el cromatograma representado en la Figura 15, en donde se indican con una flecha los fragmentos que se sometieron a digestión por la enzima proteasa V8.

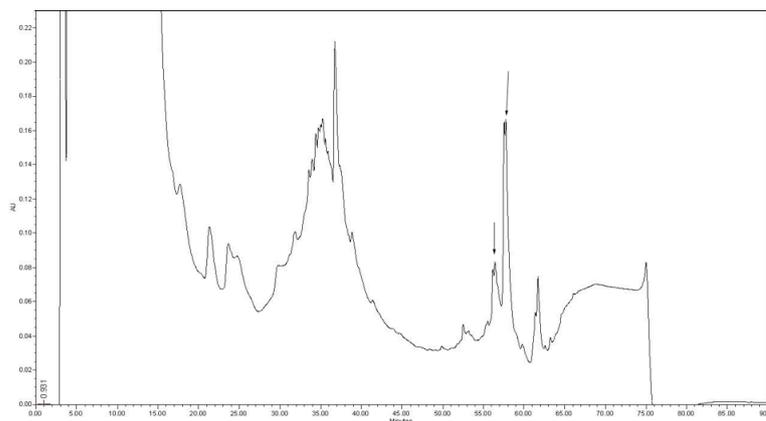


Figura 15. Cromatograma de la repurificación de SpIVC piridietilado.

El péptido SpIVC digerido con proteasa V8 se muestra en la figura 16 en donde se señala con números los fragmentos que fueron secuenciados; el primer pico más alto y el siguiente no se secuenciaron debido a que corresponden a los obtenidos en el blanco de digestión, lo que indica que corresponden a la enzima y/o al amortiguador; sin embargo, en ningún fragmento secuenciado se pudo obtener una secuencia clara usando un 1/2 del total recuperado.

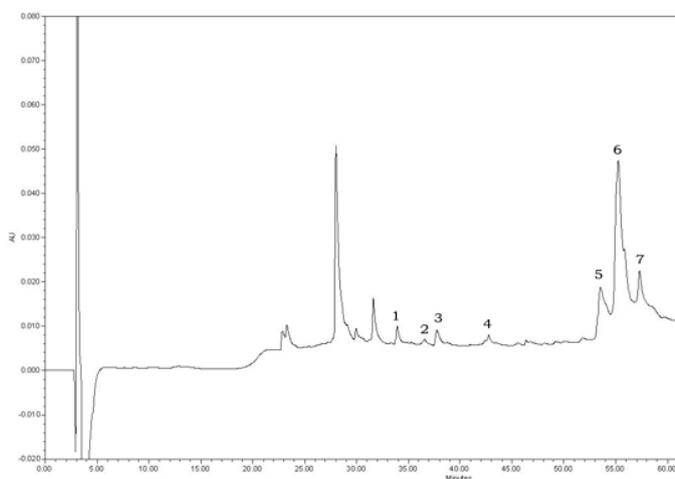


Figura 16. Cromatograma de SpIVC piridiletalado digerido con proteasa V8.

Determinación de la masa molecular de fragmentos del péptido SpIVD.

Para la determinación de la masa molecular únicamente se analizaron los remanentes (2/3 del total obtenido) de los fragmentos en los cuales se tenía una mayor cantidad de picomoles calculados durante la secuenciación; los cuales fueron 2, 3, 4, 6 y 8, que se observan en la figura 14 y en la tabla 4, y las fracciones señaladas con una flecha en la figura 13 que corresponden a SpIVD piridiletilado; estos resultados se muestran en la tabla 5 y el espectro de masas en la figura 17, donde las líneas verticales rojas señalan los valores de la relación m/z que se usaron para calcular la masa de SpIVD piridiletilada; cada una corresponde a una carga diferente (desde 14^+ hasta 11^+), pero al hacer los cálculos para cada una de ellas se obtienen valores similares, aproximadamente 11,208.00 Da. La masa molecular teórica se calculó sumando cada masa molecular de los residuos de aminoácidos más la del radical piridietil a lo que corresponde la cantidad de 105.06 Da por cada cisteína; en el caso de tener dos cisteínas se realizó el cálculo con una y dos cisteínas, para comprobar el grado de alquilación del compuesto.

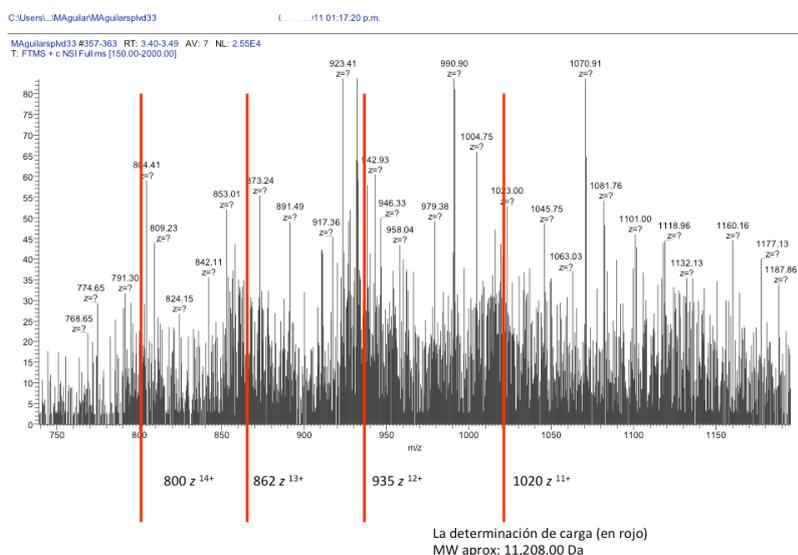


Figura 17. Resultados de la determinación de la masa molecular de la conotoxina SpIVD piridiletilada.

Tabla 5. Determinación de la masa molecular de los fragmentos obtenidos con tripsina a partir de SpIVD piridiletilado.

Fragmento	Secuencia	Masa molecular experimental (monoisotópica, Da)	Masa molecular teórica (monoisotópica, Da)
2	TCYYR	809.36	809.34 (con cisteína alquilada)
3	CYAVCTTEIAK	1237.40	1238.49 (sin alquilación)
4	CYAVCTTEIAK	1305.60 1410.68	1305.60 (con una alquilación) 1410.66 (con dos alquilaciones)
6	LGFETNSFDCTIFK	1741.80	1741.78 (con cisteína alquilada y una oxidación)
8	GEVSDNLLHCWLPEFR	2018.98 2034.96	2018.95 (con cisteína alquilada) 2034.94 (con cisteína alquilada y una oxidación, posiblemente de triptófano).
SpIVD_PE (figura 17)	GEVSDNLLHCWLPEFR	11208.00	11192.22 (con 11 alquilaciones; con 11 alquilaciones más una oxidación= 11208.21)*

*Este dato se calculó tomando la masa molecular promedio del péptido (10025.80 Da) más lo que correspondería a 11 cisteínas piridiletiladas ((11x106.13)-1.01=1166.42).

Búsqueda de similitudes en bases de datos y comparación de secuencias

La búsqueda de similitudes entre las secuencias parciales de los péptidos SpIVD (24 residuos) y SpIVC (29 residuos) y las proteínas depositadas en la base de datos nr (non-redundant: All non-redundant GenBank CDS translations + RefSeq Proteins + PDB + SwissProt + PIR + PRF) accesible mediante del programa BLASTP dió resultados muy parecidos para ambos péptidos (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del programa BLASTP para SpIVD y SpIVC.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de la secuencia	Valor E
Proteína parecida al toll-like receptor 5 de <i>Anolis carolinensis</i>	32.9 para SpIVC y 35.4 para SpIVD	32.9 para SpIVC y 35.4 para SpIVD	62 %	3.5 para SpIVC y 0.47 para SpIVD
Proteína hipotética BDDG_08840 de <i>Ajellomyces dermatitidis</i>	32.5	32.5	44 %	4.3
Proteína con dominio de proteína PiLT de <i>Cyanothece sp.</i>	32.5	32.5	48 %	4.6

El programa utilizado para buscar la semejanzas con otras proteínas hace una alineación con cada una de las proteínas de la base de datos; de acuerdo al parecido en esta alineación (posición y número de aminoácidos exactamente iguales, y los espacios entre los residuos de aminoácidos que hace el programa para hacer la alineación óptima) le brinda una puntuación, entre mayor sea la puntuación, mayor es el parecido; a continuación se muestran las alineaciones reportadas con las proteínas de la tabla 6.

Alineación realizada por el programa BLASTP de SpIVC con la proteína parecida al toll-like receptor 5 de *Anolis carolinensis*:

Longitud de la proteína: 658 a.a. Aminoácidos idénticos: 14/22 (68%)

Positivos: 15/22 (68%) Espacios: 5/22 (23%)

```

Query    4      SDNLMHCWLPE--FRG--CLLD   21
          SDNL+H  LPE  FRG   LLD
Sbjct   553    SDNLLH-RLPEWVFRGLTSLLD   573
    
```

Alineación realizada por el programa BLASTP de SpIVC con la Proteína hipotética BDDG_08840 de *Ajellomyces dermatitidis*:

Longitud de la proteína: 79 a.a. Aminoácidos idénticos: 12/24 (50%)

Positivos: 12/24 (50%) Espacios: 12/24 (50%)

```
Query 11 WLP---EFRGCL-----LDCW 23
          WLP  EFR CL          LDCW
Sbjct 29 WLPCSLEFR-CLADYMCQESLDCW 51
```

Alineación realizada por el programa BLASTP de SpIVC con la Proteína con dominio de proteína PiLT de *Cyanothece sp.*

Longitud de la proteína: 145 a.a. Aminoácidos idénticos: 10/14 (71%)

Positivos: 11/14 (79%) Espacios: 2/14 (14%)

```
Query 13 PEFRGCLLDCWNVF 26
          PEF  CLL+C NVF
Sbjct 40 PEF--CLLECSNVF 51
```

Cuando la búsqueda se limitó a proteínas de moluscos, los resultados con mayor puntaje se representan en la tabla 7 para SpIVD y en la tabla 8 para SpIVC:

Tabla 7. Similitud del péptido SpIVD (secuencia parcial) con proteínas de moluscos.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de la secuencia	Valor E
Citocromo C oxidasa, subunidad III de <i>Venerupis (Ruditapes) philippinarum</i>	24.4	24.4	72 %	0.25
Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de <i>Loligo pealei</i>	23.1	23.1	37 %	0.70
Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de <i>S. officinalis</i>	23.1	45.6	37 %	0.70
Fosfolipasa C de <i>Watasenia scintillans</i>	23.1	33.1	24 %	0.70

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Citocromo C oxidasa, subunidad III de *Venerupis (Ruditapes) philippinarum*:

Longitud de la proteína: 297 a.a. Aminoácidos idénticos: 11/21 (52%)

Positivos: 11/21 (52%) Espacios: 7/21 (33%)

```
Query 7 LLHCWLPEFRGCLLDCWNVFS 27
      LL CW FR LL W FS
Sbjct 239 LLVCW---FR--LL--WSHFS 252
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de *Loligo pealei*:

Longitud de la proteína: 813 a.a. Aminoácidos idénticos: 6/8 (75%)

Positivos: 7/8 (88%) Espacios: 1/8 (13%)

```
Query 18 CL-LDCWN 24
      CL LDCW+
Sbjct 366 CLELDCWD 373
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de *S. officinalis*:

Longitud de la proteína: 816 a.a. Aminoácidos idénticos: 6/8 (75%)

Positivos: 7/8 (88%) Espacios: 1/8 (13%)

```
Query 18 CL-LDCWN 24
      CL LDCW+
Sbjct 366 CLELDCWD 373
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Fosfolipasa C de *Watasenia scintillans*:

Longitud de la proteína: 1112 a.a. Aminoácidos idénticos: 6/8 (75%)

Positivos: 7/8 (88%) Espacios: 1/8 (13%)

```
Query 18 CL-LDCWN 24
      CL LDCW+
Sbjct 365 CLELDCWD 372
```

Tabla 8. Similitud del péptido SpIVC (secuencia parcial) con proteínas de moluscos.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de la secuencia	Valor E
Citocromo oxidasa, subunidad II de <i>Austrochloritis porteri</i>	24.0	34.8	58%	0.32
Subunidad 1 de NADH deshidrogenasa de <i>Biomphalaria glabrata</i>	24.0	33.1	79%	0.33
Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de <i>Loligo pealei</i> .	23.1	45.6	37%	0.65
Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de <i>S. officinalis</i>	23.1	45.6	37%	0.65
Fosfolipasa C de <i>Watasenia scintillans</i>	23.1	33.1	24 %	0.65

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Citocromo oxidasa, subunidad II de *Austrochloritis porteri*:

Longitud de la proteína: 160 a.a. Aminoácidos idénticos: 10/18 (56%)

Positivos: 11/18 (61%) Espacios: 7/18 (39%)

```
Query 5      DNLMHCWLP-EFRGCLLD 21
          DNLM      P EFR  LL+
Sbjct 97      DNLM----PGEFR--LLE 108
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Subunidad 1 de NADH deshidrogenasa de *Biomphalaria glabrata*:

Longitud de la proteína: 307 a.a. Aminoácidos idénticos: 12/26 (46%)

Positivos: 13/26 (50%) Espacios: 12/26 (46%)

```
Query 7      LMHCW---LPEFRG-----CLLDCW 23
          +M CW  LP F G      CLL CW
Sbjct 275    MMLCWKSFLP-F-GICMLFLCLL-CW 297
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de *Loligo pealei*:

Longitud de la proteína: 813 a.a. Aminoácidos idénticos: 6/8 (75%)

Positivos: 7/8 (88%) Espacios: 1/8 (13%)

Query	18	CL-LDCWN	24
		CL LDCW+	
Sbjct	366	CLELDCWD	373

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Cadena A de la estructura cristalina de la proteína Plc21 de *S. officinalis*:

Longitud de la proteína: 816 a.a. Aminoácidos idénticos: 6/8 (75%)

Positivos: 7/8 (88%) Espacios: 1/8 (13%)

Query	18	CL-LDCWN	24
		CL LDCW+	
Sbjct	366	CLELDCWD	373

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Fosfolipasa C de *Watasenia scintillans*:

Longitud de la proteína: 1112 a.a. Aminoácidos idénticos: 6/8 (75%)

Positivos: 7/8 (88%) Espacios: 1/8 (13%)

Query	18	CL-LDCWN	24
		CL LDCW+	
Sbjct	365	CLELDCWD	372

Cuando la búsqueda se limitó a proteínas de *Conus*, los resultados con mayor puntaje se representan en la tabla 9 para SpIVC(GEVSDNLMHCWLPEFRGCLLDCWNVFSRY) y SpIVD (GEVSDNLLHCWLPEFRGCLLDCWN), ya que mostraron resultados idénticos.

Tabla 9. Similitud de los péptidos SpIVC y SpIVD (secuencias parciales) con proteínas de *Conus*

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de la secuencia	Valor E
Conotoxina BeTXIIa	19.7	19.7	20%	0.86
Conotoxina Im11.4	19.3	19.3	13%	1.5
Conotoxina Lt11.3	19.3	19.3	13%	1.5
κ-conotoxina BtX	17.6	31.4	31%	5.4
Conotoxina QcIIIIB	16.8	16.8	10%	5.9

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Conotoxina BeTXIIa:

Longitud de la proteína: 30 a.a. Aminoácidos idénticos: 5/7 (71%)

Positivos: 6/7 (86%) Espacios: 1/7 (14%)

```
Query 18 CLLD-CW 23
      23 CLL+ CW
Sbjct 15 CLLNCCW 21
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Conotoxina Im11.4:

Longitud de la proteína: 64 a.a. Aminoácidos idénticos: 4/4 (100%)

Positivos: 4/4 (100%) Espacios: 0/4 (0%)

```
Query 22 CWNV 25
      25 CWNV
Sbjct 46 CWNV 49
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Conotoxina Lt11.3:

Longitud de la proteína: 71 a.a. Aminoácidos idénticos: 4/4 (100%)

Positivos: 4/4 (100%) Espacios: 0/4 (0%)

```
Query  22  CWNV  25
          CWNV
Sbjct  46  CWNV  49
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la κ -conotoxina BtX:

Longitud de la proteína: 70 a.a. Aminoácidos idénticos: 6/10 (60%)

Positivos: 6/10 (60%) Espacios: 4/10 (40%)

```
Query  15  FR----GCLL  20
          FR      GCLL
Sbjct   3  FRVTSVGCLL  12
```

Aminoácidos idénticos: 4/7 (57%)

Positivos: 5/7 (71%) Espacios: 1/7 (14%)

```
Query  18  CLLD-CW  23
          CL + CW
Sbjct  41  CLNECCW  47
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Conotoxina QcIIIB:

Longitud de la proteína: 15 a.a. Aminoácidos idénticos: 3/3 (100%)

Positivos: 3/3 (100%) Espacios: 0/3 (0%)

```
Query   9  HCW   11
          HCW
Sbjct   5  HCW   7
```

Se realizó el mismo BLASTP para los demás fragmentos obtenidos en la secuenciación; para el fragmento LGFETNSFDCTIFK se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 10.

Tabla 10. Similitud del fragmento LGFETNSFDCTIFK con proteínas de *Conus* spp.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de la secuencia	Valor E
Conotoxina Cl6.4 de <i>C. californicus</i>	17.6	17.6	28%	0.14
Conotoxina Eb11.3 de <i>C. eburneus</i>	16.3	16.3	28%	0.41
Conotoxina de 4 asas de <i>C. sponsalis</i>	15.1	15.1	35%	1.1

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Conotoxina Cl6.4 de *C. californicus*:

Longitud de la proteína: 76 a.a. Aminoácidos idénticos: 4/4 (100%)

Positivos: 4/4 (100%) Espacios: 0/4 (0%)

```
Query 10 CTIF 13
      CTIF
Sbjct 57 CTIF 60
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Conotoxina Eb11.3 de *C. eburneus*:

Longitud de la proteína: 81 a.a. Aminoácidos idénticos: 4/4 (100%)

Positivos: 4/4 (100%) Espacios: 0/4 (0%)

```
Query 6 NSFD 9
      NSFD
Sbjct 42 NSFD 45
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la conotoxina de 4 asas de *C. sponsalis*:

Longitud de la proteína: 25 a.a. Aminoácidos idénticos: 4/5 (80%)

Positivos: 4/5 (80%) Espacios: 0/5 (0%)

```
Query 7 SFDCT 11
      SF CT
Sbjct 16 SFSCT 20
```

Para el fragmento CYAVCTTEIAK se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 11:

Tabla 11. Similitud del fragmento CYAVCTTEIAK con proteínas de *Conus* spp.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de la secuencia	Valor E
Conotoxina MaIr193 de <i>C. marmoreus</i>	18.0	18.0	45%	0.014
Subunidad 1 de NADH deshidrogenasa de <i>C. borgesii</i>	17.2	26.3	54%	0.028
Subunidad 1 de NADH deshidrogenasa de <i>C. textile</i>	17.2	17.2	54%	0.028

Alineación realizada por el programa BLASTP con la conotoxina MaIr193 de *C. marmoreus*:

Longitud de la proteína: 80 a.a. Aminoácidos idénticos: 4/5 (80%)

Positivos: 4/5 (80%) Espacios: 0/5 (0%)

```
Query 1 CYAVC 5
      C+AVC
Sbjct 73 CFAVC 77
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Subunidad 1 de NADH deshidrogenasa de *C. borgesii*:

Longitud de la proteína: 313 a.a. Aminoácidos idénticos: 5/6 (83%)

Positivos: 5/6 (83%) Espacios: 0/6 (0%)

```
Query 6 TTEIAK 11
      T EIAK
Sbjct 59 TKEIAK 64
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Subunidad 1 de NADH deshidrogenasa de *C. textile*:

Longitud de la proteína: 313 a.a. Aminoácidos idénticos: 5/6 (83%)

Positivos: 5/6 (83%) Espacios: 0/6 (0%)

```
Query   6   TTEIAK   11
          T  EIAK
Sbjct  59   TKEIAK   64
```

Y finalmente para el fragmento TCYYR se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 12:

Tabla 12. Similitud del fragmento TCYYR con proteínas de *Conus* spp.

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura de la secuencia	Valor E
Conotoxina de 4 asas de <i>C. miliaris</i>	19.3	19.3	80%	0.00000005
Conotoxina C114.10 de <i>C. californicus</i>	17.2	26.3	54%	0.002

Alineación realizada por el programa BLASTP con la conotoxina de 4 asas de *C. miliaris*:

Longitud de la proteína: 69 a.a. Aminoácidos idénticos: 4/4 (100%)

Positivos: 4/4 (100%) Espacios: 0/4 (0%)

```
Query   2   CYYR   5
          CYYR
Sbjct  50   CYYR   53
```

Alineación realizada por el programa BLASTP con la Conotoxina Cl14.10 de *C. californicus*:

Longitud de la proteína: 36 a.a. Aminoácidos idénticos: 3/4 (75%)

Positivos: 4/4 (100%)

Espacios: 0/4 (0%)

```
Query 1 TCYY 4
      TC+Y
Sbjct 6 TCFY 9
```

Se realizó una alineación con cada una de las conotoxinas reportadas que tienen un peso cercano al de una de las conotoxinas de interés (SpIVD). En los alineamientos que siguen, el asterisco representa los aminoácidos exactamente iguales; los dos puntos, aminoácidos muy parecidos; el punto, aminoácidos que se parecen ligeramente.

a) Alineamiento con la conofisina-R (84 aminoácidos):

```
CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

SpIVD          -----GEVSDNLLH-----CWL--P-E 14
conophysin-R   HPTKPCMYCSFGQCVGPHICCGPTGCEMGTAEANMCSEEDDPIPCQVFGSDCALNPN 60
                * .. *:                               * * * :

SpIVD          FRG-CLLD---CWN----- 24
conophysin-R   IHGHCVADGICCVDDTCTTHLGCL 84
                ::* *: * * :
```

b) Alineamiento con la toxina con-ikot-ikot (86 aminoácidos):

```
CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

SpIVD          -----GEVSDNLLHCWLPEFRGC-----LLD-CWN----- 24
con-ikot-ikot  SGPADCCRMKECCTDRVNECLQRYSGREDKFVVSFCYQEATVTCGSFNEIVGCCYGYQMCM 60
                * . . : .*:                               *   ::. *:.

SpIVD          -----
con-ikot-ikot  IRVVKPNSLSGAHEACKTVSCGNPCA 86
```

c) Alineamiento con la cadena beta de la conodipina-M (42 aminoácidos):

```
CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

SpIVD          GEVSDN--LLHC-----WLP-EFRG----C--LLDCWN-- 24
conodipine-M-beta  AATCTHWALIYFKTVQLFGWXHFNYQVDATYCPQFQPCMPXX 42
                . . . : *::                               *   :::   * : *
```

d) Con la cadena alfa de conodipina-M (77 aminoácidos):

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

SpIVD          -----GEVSD-NLLHCWLPEFR--GC---LLD-----CWN----- 24
conodipine-M-alpha ZXPSTAEELCKINSNACSVF-FSXIPCQKXFLAACDRHDTCYHCGKHFQDDCDDAFFR 59
                .*:.. *   * :* *   *   :*   *::

SpIVD          -----
conodipine-M-alpha DMTALCAHGTDEGXCPX 77

```

e) Alineamiento con las α D-conotoxinas (47-50 aminoácidos):

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

3589Cp20.2      --DVRECQVDTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCSRSVCTCVYHWRRGHGCS 49
3591Cp20.3      --EVQECQVDTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCSRSVCTCVYHWRRGHGCS 49
3595Cp20.5      -DNEAECQIDTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCSRSVCTCVYHWRRGHGCS 50
3603Ms20.4      -DNEAECQINTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCARSGCTCVYHWRRGHGCS 50
3605Ms20.5      -DNEAECQINTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCARSGCTCVYHWRRGHGCS 50
3601Ms20.3      --DVRECQVNTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCARSGCTCVYHWRRGHGCS 49
3597Ms20.1      --DVRECINTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCARSGCTCVYHWRRGHGCS 49
3599Ms20.2      --DVRECINTPGSSWGKCCMTRMCGTMCCARSGCTCVYHWRRGHGCS 49
3619Vt20.1      -DDESECIINTRDSPWGRCCRTRMCGSMCCPRNGCTCVYHWRRGHGCS 50
1685VxXXB       -DDESECIINTRDSPWGRCCRTRMCGSMCCPRNGCTCVYHWRRGHGCS 50
3593Cp20.4      -NDESECIISTPGSSWGRCCMTRMCGTMCCPRSGCYCVYHWRRGHGCS 50
1684VxXXC       --DLRQCTRNAPGSTWGRCCMTRMCGTMCCPRSGCTCAYNWRRIYCS 47
3615Rt20.1      --DARECQVNTPGSRWKGCCMTRMCGTMCCPESHICYCVYHWRRGHGCS 47
3617Rt20.2      --DARECQVNTPGSRWKGCCMTRMCGTMCCPESHICYCVYHWRRGHGCS 47
3587Cp20.1      DRDVQDCQVSTPGSKWGRCCMTRMCGTMCCPASHICYCVYHWRRGHGCS 49
3613Ml20.4      --DVQDCQVSTPGSKWGRCCMTRMCGTMCCPASHICYCVYHWRRGHGCS 47
1686VxXXA       --DVQDCQVSTPGSKWGRCCMTRMCGTMCCPASHICYCVYHWRRGHGCS 47
3607Ml20.1      --DVQECQVVTPGSKWGRCCMTRMCGTMCCPASHICYCVYHWRRGHGCS 47
3609Ml20.2      --DVQECQVVTPGSKWGRCCMTRMCGTMCCPASHICYCVYHWRRGHGCS 47
3611Ml20.3      --DAQGCQVVTPGSKWGRCCMTRMCGTMCCPASHICYCVYHWRRGHGCS 47
SpIVD          -----GEVSDNLLHCWLPEFRG--CLLD--CWN----- 24
                ..   :*   . * *   *

```

DISCUSIÓN

Los péptidos SpIVD y SpIVC no se encontraban puros en las muestras procesadas previamente. En este trabajo se trató de eliminar los componentes minoritarios colectando sólo la parte central de los picos cromatográficos. La pureza del material colectado se verificó mediante espectrometría de masas y secuenciación de Edman automática.

La diferencia de 17.97 Da entre las masas promedio de SpIVC (10,043.77 Da) y SpIVD (10,025.80 Da) corresponde muy cercanamente a la diferencia (18.0 Da) entre las masas promedio de los residuos de Metionina (131.2 Da) y Leucina (113.2 Da) observadas en la posición 8 de las secuencias de SpIVC y SpIVD, respectivamente. Esto sugiere que es probable que, dada la identidad de secuencia

entre los dos péptidos (23 residuos idénticos de 24 residuos determinados en común) encontrada hasta el momento, la diferencia entre ellos se encuentre en esta posición.

La cantidad obtenida para llevar a cabo la secuenciación, 1500 pmol de SpIVC y 1700 pmol de SpIVD, no fue suficiente para caracterizar químicamente los péptidos completos ya que con estas cantidades tan pequeñas algunas secuencias no fueron claras. La presencia de residuos de aminoácidos básicos y ácidos en los péptidos SpIVD y SpIVC indicó, respectivamente, que se podía usar tripsina y proteasa V8 para fragmentarlos; la tripsina corta en el lado carboxilo de aminoácidos básicos y la proteasa V8 tiene preferencia por hidrolizar el lado carboxilo de los aminoácidos ácidos; se decidió utilizar una enzima diferente con cada péptido debido a su gran parecido y poder así complementar la información. Sin embargo, en la secuenciación de los fragmentos obtenidos de SpIVC no se pudo obtener ninguna secuencia, lo cual pudo ser debido que los fragmentos obtenidos estaban en muy poca cantidad dificultando poder ver la secuencia; por lo tanto no se pudo complementar la información obtenida a partir de SpIVD.

En el cromatograma de la alquilación de SpIVD (figura 13) se pudieron observar 4 fracciones diferentes que presentaban la secuencia N-terminal conocida; esto puede ser debido a diferencias en la eficiencia de la alquilación, por lo que se decidió ocupar dos fracciones para la secuenciación y dos para análisis de masas. En la secuenciación, utilizando el principio de degradación de Edman, se analizaron 12 fragmentos diferentes obtenidos con tripsina, en 6 de los cuales se observó la secuencia del extremo amino de SpIVD; esto también puede ser debido a que si el nivel de alquilación no es el mismo en todas las moléculas, durante la digestión con tripsina se obtienen fragmentos de la misma secuencia con diferentes tamaños e hidrofobicidad (debido a las diferencias en alquilación). Dos de los fragmentos obtenidos corresponden a secuencias de la cadena de

aminoácidos de la tripsina, ya que ésta también se autodigiere. Por lo tanto, el tratamiento con tripsina produjo sólo tres fragmentos con secuencias no conocidas: LGFETNSFDCTIFK con 14 a.a. (secuencia obtenida parcialmente también por espectrometría de masas), CYAVCTTEIAK con 11 a.a., y TCYYR con 5 a.a. Considerando los residuos conocidos mediante la secuenciación de las proteínas intactas, los residuos que fue posible identificar dan un total de 58 (SpIVD) y 59 (SpIVC) a.a., lo que indica que se pudo caracterizar aproximadamente el 64% de las proteínas SpIVC (10,043.77 Da) y SpIVD (10,025.80 Da); para este cálculo, se determinó primero el número aproximado de residuos en estas moléculas, dividiendo sus masas entre el promedio de la masa molecular de los residuos de aminoácidos (110 Da), lo cual indica que estas proteínas tienen aproximadamente 91 a.a.

El análisis por espectrometría de masas de los fragmentos obtenidos con tripsina confirmó las secuencias obtenidas mediante degradación de Edman automática. La secuencia CYAVCTTEIAK (péptido 4) dio masas moleculares de 1305.60 Da y 1410.68 Da; la masa molecular teórica con una cisteína alquilada es 1305.60 Da y con dos cisteínas alquiladas 1410.66. En el caso del péptido N-terminal, GEVSDNLLHCWLPEFR (péptido 8), se obtuvieron masas moleculares de 2018.98 y 2034.96 Da, mientras que la masa teórica es de 2018.95 Da; se obtiene una correspondencia con la segunda masa experimental únicamente si se considera una oxidación (15.99) que posiblemente surge en el triptófano ($2018.95 + 15.99 = 2034.94$), que es uno de los aminoácidos más susceptibles a la oxidación, junto con los que contienen azufre (Cys y Met). El grupo tiol de la Cys puede oxidarse de manera reversible formándose un puente disulfuro, en este caso la cisteína no puede ser el sitio de la oxidación, debido a que está piridiletalada, y al no encontrarse metioninas en esta secuencia, lo más probable es que sea el triptófano (Buchanan y Balmer, 2005). En el caso del péptido tríptico 6 (también obtenido mediante digestión de SpIVD carboxamidometilado y digerido con tripsina “in gel”), la

espectrometría de masas permitió identificar el residuo de la posición 3 (F), que no había sido detectado mediante la degradación de Edman; sin embargo, este último método hizo posible diferenciar entre I y L en la posición 13 (I), que no pudieron ser distinguidos mediante la espectrometría de masas. Podemos decir que tanto la secuenciación utilizando el principio de degradación de Edman y la espectrometría de masas se complementan ya que la información que no nos puede brindar la primera metodología nos la brinda la segunda.

En el análisis de espectrometría de masas de SpIVD piridiletilado se obtuvo un valor aproximado de 11208.00 Da, lo que indica que esta proteína está compuesta por una sola cadena; hasta ahora con la ayuda de la secuenciación se sabe que tiene al menos 7 cisteínas, pero este valor de masas indica que la molécula contiene aproximadamente 11 cisteínas ya que el valor de masa promedio para la molécula intacta es de 10,025.80 Da y la masa promedio de cada grupo piridiletil es de 106.13 Da; es decir, 11 cisteínas piridiletiladas representarían una masa adicional de 1166.42 Da (1167.43 Da – 1.01 Da del hidrógeno de la Cys que no forma puente de hidrógeno), que sumados a los 10025.80 Da de la proteína intacta darían una masa de 11192.22Da; si a este valor se suma una oxidación (15.99), entonces el valor teórico (11208.21 Da) es muy cercano al valor obtenido en el análisis. Este análisis, como se mencionó, también nos da información de que estas conotoxinas son una sola cadena de aminoácidos y no un dímero como otras conotoxinas de pesos similares, como es el caso de la Conodipina-M, aislada a partir del veneno de *C. magus*, y que está compuesta por dos cadenas de polipéptidos unidas por uno o más enlaces disulfuros (McIntosh *et al.*, 1995a); o como el caso de α D-VxXIIA, α D-VxXIIIB y α D-VxXIIC, purificadas a partir de *C. vexillum*, que son pseudo homodímeros con 47-50 residuos en cada monómero (Loughnan *et al.*, 2006).

Los extremos amino de SpIVD y SpIVC no tienen similitud global significativa con ninguna proteína conocida; lo mismo se

encontró cuando la búsqueda se limitó a proteínas de moluscos. A pesar del parecido aparente con subunidades III de citocromo C oxidasa y con fosfolipasas C de varias especies de moluscos, éstas son moléculas considerablemente más grandes (297-1112 aminoácidos) que los péptidos de interés (aproximadamente 90 aminoácidos). Cuando se redujo la búsqueda a proteínas de *Conus* spp. se obtuvo que tiene más parecido con la conotoxina BeTXIIa aislada a partir de *C. betulinus*, sin embargo, esta proteína tiene solamente 30 a.a. y su secuencia es RCAHGTYYSNDSQQCLLNCCWWGGGDHCCR (Chen *et al.*, 1999), lo que representa aproximadamente un tercio del peso molecular de SpIVD y SpIVC; además, el parecido con esta secuencia únicamente es de cinco aminoácidos, por lo que hace insignificante esta relación. Para el segundo fragmento obtenido (LGFETNSFDCTIFK) los resultados mostraron que tiene mayor parecido con el precursor Cl6.4 de *C. californicus* con 76 a.a. y un peso molecular de 8615 Da; el parecido con SpIVD y SpIVC está únicamente en 4 a.a. por lo que tampoco lo hace representativo (Biggs *et al.*, 2010). Para el fragmento CYAVCTTEIAK el mayor parecido se encontró con la Conotoxina MaIr193, con 80 a.a. y un peso molecular de 8841 Da; sin embargo, el parecido de este precursor con las toxinas de interés se encuentra únicamente en 4 a.a., en las posiciones 73-77, por lo que el parecido tampoco es representativo (Luo *et al.*, 2006). Finalmente para el fragmento TCYYR se encontró la mayor similitud con el precursor de la conotoxina M4 aislada de *C. miliaris*, de la superfamilia O1 con 69 a.a., y un peso molecular de 7938Da; tiene un parecido de 4 a.a. solamente en las posiciones 50-53 (Duda y Remigio, 2008).

Como se pudo observar anteriormente, a pesar de que no se caracterizaron completamente las proteínas de interés, no se encontró un parecido significativo con ninguna de las proteínas reportadas, ni de moluscos en general, ni de *Conus* en particular, por lo que no es posible predecir el posible efecto biológico que éstas presentan, y por

lo tanto, sería interesante realizar un bioensayo con estas conotoxinas.

Los péptidos SpIVD y SpIVC tampoco se asemejan significativamente a ninguna de las toxinas de 8.8-13.6 kDa que han sido caracterizadas a partir de venenos de especies de *Conus*, incluyendo a las reportadas gracias a la investigación con mRNA.

Con la realización de esta tesis pudimos darnos cuenta que una de las limitaciones primordiales al trabajar con toxinas de origen marino son los pocos rendimientos que se obtienen, ya que en cada proceso de purificación y caracterización química, como lo es la alquilación y la digestión, hay pérdida significativa de la molécula de interés, en este caso proteínas. Por lo tanto, se recomienda trabajar con una cantidad considerable de la toxina; por lo menos tres veces más de la cantidad que se cuantificó en esta ocasión (1500 y 1700 pmoles) sólo para la caracterización química.

CONCLUSIONES

- Aparentemente, las conotoxinas SpIVD y SpIVC difieren únicamente en el aminoácido de la posición 8.
- Las conotoxinas SpIVD y SpIVC consisten en una sola cadena de aminoácidos.
- Estas proteínas tienen por lo menos 7 cisteínas y posiblemente 11; hasta el momento no se han encontrado cisteínas adyacentes.
- Se necesita una mayor cantidad de toxina para poder realizar la caracterización completa de las proteínas.
- Se requiere tanto la secuenciación, usando el principio de degradación de Edman, como la espectrometría de masas para realizar una caracterización completa, ya que estas metodologías se complementan.
- Las conotoxinas SpIVD y SpIVC no tienen parecido con ninguna proteína de moluscos, ni con conotoxinas reportadas hasta el momento, por lo que no se puede predecir el efecto biológico que pudieran tener.

- Las secuencias determinadas en este trabajo podrían servir para diseñar oligonucleótidos para clonar las secuencias codificantes y deducir las secuencias completas de SpIVC y SpIVD.

REFERENCIAS

Abogadie, F.C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P. y Cruz, L.J. 1990. Biologically active peptides from *Conus quercinus*, a worm-hunting species. *Trans Natl Acad Sci Tech (Philippines)* 12:219-32

Aguilar, M.B., Lezama-Monfil, L., Maillo, M., Pedraza-Lara, H., López-Vera, E. y Heimer de la Cotera, E.P. 2006. A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides* 27:500-5

Aguilar, M.B., López-Vera, E., Heimer de la Cotera, E.P., Falcón, A., Olivera, B.M. y Maillo, M. 2007. I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides* 28:18-23

Aguilar, M.B., Luna-Ramírez, K.S., Echeverría, D., Falcón, A., Olivera, B.M., Heimer de la Cotera, E.P. y Maillo, M. 2008. Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides* 29:186-95

Arias, H. 2006. Marine toxins targeting ion channels. *Mar Drugs* 4:37-69

Augustine, G.J., Charlton, M.P. y Smith, S.J. 1987. Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 10:633-93

Balaji, R.A., Ohtake, A., Sato, K., Gopalakrishnakone, P., Kini, R.M., Seow, K.T. y Bay, B.H. 2000. λ -conotoxins, a new family of conotoxins with unique disulfide pattern and protein folding. Isolation and characterization from the venom of *Conus marmoreus*. *J Biol Chem* 275:39516-22

Bandyopadhyay, P.K., Garrett, J.E., Shetty, R.P., Keate, T., Walker, C.S. y Olivera, B.M. 2002. γ -Glutamyl carboxylation: An extracellular posttranslational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods, and chordates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1264-9

Barbier, J., Lamthanh, H., Le Gall, F., Favreau, P., Benoit, E., Chen, H., Gilles, N., Ilan, N., Heinemann, S.H., Gordon, D., Menez, A. y Molgo, J. 2004. A δ -conotoxin from *Conus ermineus* venom inhibits inactivation in vertebrate neuronal Na⁺ channels but not in skeletal and cardiac muscles. *J Biol Chem* 279:4680-5

Biggs, J.S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K.J., Bernaldez, J., Licea-Navarro, A., Corneli, P.S. y Olivera, B.M. 2010. Evolution of *Conus* peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Mol Phylogenet Evol* 56:1-12

Brodie, E.D. 2009. Toxins and venoms. *Curr Biol* 19:R931-5

Brusca, R.C. y Brusca, G.J. 2003. *Invertebrates*. 2nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc., 936 pp.

Buchanan, B.B. y Balmer, Y. 2005. Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* 56:187-220

Buczek, O., Bulaj, G. y Olivera, B.M. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell Mol Life Sci* 62:3067-79

Bulaj, G., Zhang, M.M., Green, B.R., Fiedler, B., Layer, R.T., Wei, S., Nielsen, J.S., Low, S.J., Klein, B.D., Wagstaff, J.D., Chicoine, L., Harty, T.P., Terlau, H., Yoshikami, D. y Olivera, B.M. 2006. Synthetic μ O-conotoxin MrVIB blocks TTX-resistant sodium channel NaV1.8 and has a long-lasting analgesic activity. *Biochemistry* 45:7404-14

Carruthers, J. y Carruthers, A. 2006. *Toxina botulinica: Serie dermatologia estetica*. Elsevier España, 152 pp.

Cestele, S. y Catterall, W.A. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82:883-92

Chau, R., Kalaitzis, J.A. y Neilan, B.A. 2011. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquat Toxicol* 104:61-72

Chen, J.S., Fan, C.X., Hu, K.P., Wei, K.H. y Zhong, M.N. 1999. Studies on conotoxins of *Conus betulinus*. *J Nat Toxins* 8:341-9

Clark, C., Olivera, B.M. y Cruz, L.J. 1981. A toxin from the venom of the marine snail *Conus geographus* which acts on the vertebrate central nervous system. *Toxicon* 19:691-9

Craig, A.G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navarro, V., Mazella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L.J. y Olivera, B.M. 1999. Conulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J Biol Chem* 274:13752-9

Cruz, L.J., Gray, W.R. y Olivera, B.M. 1978. Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Arch Biochem Biophys* 190:539-48

Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M., Zeikus, R.D., Kerr, L., Yoshikami, D. y Moczydlowski, E. 1985. *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 260:9280-8

Cruz, L.J., de Santos, V., Zafaralla, G.C., Ramilo, C.A., Zeikus, R., Gray, W.R. y Olivera, B.M. 1987. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus striatus* venoms. *J Biol Chem* 262:15821-4

Cruz, L.J., Kupryszewski, G., LeCheminant, G.W., Gray, W.R., Olivera, B.M. y Rivier, J. 1989. μ -conotoxin GIIIA, a peptide ligand for muscle sodium channels: chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. *Biochemistry* 28:3437-42

Daly, N.L., Ekberg, J.A., Thomas, L., Adams, D.J., Lewis, R.J. y Craik, D.J. 2004. Structures of μ O-conotoxins from *Conus marmoreus*. Inhibitors of tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-resistant sodium channels in mammalian sensory neurons. *J Biol Chem* 279:25774-82

Duda, T.F., Jr. y Remigio, E.A. 2008. Variation and evolution of toxin gene expression patterns of six closely related venomous marine snails. *Mol Ecol* 17:3018-32

Ellison, M., McIntosh, J.M. y Olivera, B.M. 2003. α -conotoxins ImI and ImII. Similar α 7 nicotinic receptor antagonists act at different sites. *J Biol Chem* 278:757-64

Ellison, M., Gao, F., Wang, H.L., Sine, S.M., McIntosh, J.M. y Olivera, B.M. 2004. α -conotoxins ImI and ImII target distinct regions of the human α 7 nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes. *Biochemistry* 43:16019-26

Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M.E., Watkins, M., Elgoyhen, A.B., McIntosh, J.M. y Olivera, B.M. 2006. α -RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the α 9 α 10 nAChR. *Biochemistry* 45:1511-7

Endean, R. y Izatt, J. 1965. Pharmacological study of the venom of the gastropod *Conus magus*. *Toxicon* 3:81-93

Endean, R., Parish, G. y Gyr, P. 1974. Pharmacology of the venom of *Conus geographus*. *Toxicon* 12:131-8

Endean, R., Williams, H., Gyr, P. y SurrIDGE, J. 1976. Some effects on muscle and nerve of crude venom from the gastropod *Conus striatus*. *Toxicon* 14:267-74

Endean, R., Gyr, P. y Surridge, J. 1977a. The pharmacological actions on guinea-pig ileum of crude venoms from the marine gastropods *Conus striatus* and *Conus magus*. *Toxicon* 15:327-37

Endean, R., Surridge, J. y Gyr, P. 1977b. Some effects of crude venom from the cones *Conus striatus* and *Conus magus* on isolated guinea-pig atria. *Toxicon* 15:369-74

Endean, R., Gyr, P. y Surridge, J. 1979. The effects of crude venoms of *Conus magus* and *Conus striatus* on the contractile response and electrical activity of guinea-pig cardiac musculature. *Toxicon* 17:381-95

Endo, T. y Tamiya, N. 1987. Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. *Pharmacol Ther* 34:403-51

England, L.J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A.G., Gulyas, J., Akhtar, M., Rivier, J., Julius, D. y Olivera, B.M. 1998. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* 281:575-8

Fainzilber, M., Nakamura, T., Gaathon, A., Lodder, J.C., Kits, K.S., Burlingame, A.L. y Zlotkin, E. 1995. A new cysteine framework in sodium channel blocking conotoxins. *Biochemistry* 34:8649-56

Ferber, M., Al-Sabi, A., Stocker, M., Olivera, B.M. y Terlau, H. 2004. Identification of a mammalian target of κ M-conotoxin RIIK. *Toxicon* 43:915-21

Flinn, J.P., Pallaghy, P.K., Lew, M.J., Murphy, R., Angus, J.A. y Norton, R.S. 1999. Roles of key functional groups in ω -conotoxin GVIA synthesis, structure and functional assay of selected peptide analogues. *Eur J Biochem* 262:447-55

Gabbi, G. 2006. *Shells*. White Starpublisher's, Vercelli, Italia. 168 pp.

Galera, I.E.L., Ziehl, C.M. y Lemus, J.L.C. 1989. *Guía ilustrada de animales marinos venenosos de México y el Caribe*. Noriega, México, 103pp.

Garateix, A. 1997. Toxinas marinas. *Elementos* 26:41-6

García-Gomez, B.I., Coronas, F.I., Restano-Cassulini, R., Rodríguez, R.R. y Possani, L.D. 2011. Biochemical and molecular characterization of the venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. *Toxicon* 58: 18-27.

Gray, W.R., Luque, A., Olivera, B.M., Barrett, J. y Cruz, L.J. 1981. Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *J Biol Chem* 256:4734-40

Gray, W.R., Luque, F.A., Galyean, R., Atherton, E., Sheppard, R.C., Stone, B.L., Reyes, A., Alford, J., McIntosh, M., y Olivera, B.M. 1984. Conotoxin GI: disulfide bridges, synthesis, and preparation of iodinated derivatives. *Biochemistry* 23:2796-802

Haack, J.A., Rivier, J., Parks, T.N., Mena, E.E., Cruz, L.J. y Olivera, B.M. 1990. Conantokin-T. A γ -carboxyglutamate containing peptide with N-methyl-D-aspartate antagonist activity. *J Biol Chem* 265:6025-9

Halai, R. y Craik, D.J. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat Prod Rep* 26:526-36

Hasson, A., Shon, K.J., Olivera, B.M. y Spira, M.E. 1995. Alterations of voltage-activated sodium current by a novel conotoxin from the venom of *Conus gloriamaris*. *J Neurophysiol* 73:1295-301

Hillyard, D.R., Monje, V.D., Mintz, I.M., Bean, B.P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J.M., y Cruz, L.J. 1992. A new *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron* 9:69-77

Hillyard, D.R., Olivera, B.M., Woodward, S., Corpuz, G.P., Gray, W.R., Ramilo, C.A. y Cruz, L.J. 1989. A molluscivorous *Conus* toxin: conserved frameworks in conotoxins. *Biochemistry* 28:358-61

Jiménez, E.C., Donevan, S., Walker, C., Zhou, L.M., Nielsen, J., Cruz, L.J., Armstrong, H., White, H.S. y Olivera, B.M. 2002. Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: determinants for anticonvulsant potency. *Epilepsy Res* 51:73-80

Jiménez, J., Marfil, M., Francesch, A., Cuevas, C., Alvarez, M. y Albericio, F. 2007. Productos naturales de origen marino. Investigación y Ciencia. Febrero: 75-83

Kaas, Q., Westermann, J. y Craik, D. 2010. Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon* 55: 1491-509

Kohn, A.J. 1956. Piscivorous gastropods of the genus *Conus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42:168-71

Kohn, A.J., Saunders, P.R. y Wiener, S. 1960. Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. *Ann N Y Acad Sci* 90:706-25

Kohn, A.J. y Waters, V. 1966. Escape responses to three herbivorous gastropods to the predatory gastropod *Conus textile*. *Anim Behav* 14:340-5

Kohn, A.J. y Perron, F.E. 1994. *Life history and biogeography: patterns in Conus*. Clarendon Press, Universidad de California, Estados Unidos de Norteamérica, 85 pp.

Le Gall, F., Favreau, P., Benoit, E., Mattei, C., Bouet, F., Menou, J.L., Menez, A., Letourneux, Y. y Molgo, J. 1999. A new conotoxin isolated from *Conus consors* venom acting selectively on axons and motor nerve terminals through a Na⁺dependent mechanism. *Eur J Neurosci* 11:3134-42

Lew, M.J., Flinn, J.P., Pallaghy, P.K., Murphy, R., Whorlow, S.L., Wright, C.E., Norton, R.S. y Angus, J.A. 1997. Structure-function relationships of ω -conotoxin GVIA. Synthesis, structure, calcium channel binding, and functional assay of alanine-substituted analogues. *J Biol Chem* 272:12014-23

Livett, B.G., Sandall, D.W., Keays, D., Down, J., Gayler, K.R., Satkunanathan, N. y Khalil, Z. 2006. Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 48:810-29

Lirazan M., Jimenez E.C., Grey Craig, A., Olivera B.M. y Cruz L.J. 2002. Conophysin-R, a *Conus radiatus* venom peptide belonging to the neurophysin family. *Toxicon* 40:901-8

López-Vera, E., Heimer de la Cotera, E.P., Maillo, M., Riesgo-Escovar, J.R., Olivera, B.M. y Aguilar, M.B. 2004. A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). *Toxicon* 43:365-74

López-Vera, E. 2005. Actividad biológica de péptidos de caracoles de la superfamilia Conoidea. *Universidad Nacional Autónoma de México*, México. 83 pp.

López-Vera E., Aguilar M.B., Schiavon, E., Marinzi, C., Ortiz, E., Restano-Cassulini, R., Batista, C.V., Possani, L.D., Heimer de la Cotera, E.P., Peri, F., Becerril, B., y Wanke, E. 2007. Novel α -conotoxins from *Conus spurius* and the α -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS J* 274:3972-85

Loughnan M., Nicke A., Jones A., Schroeder C.I., Nevin S.T., Adams D.J., Alewood P.F. y Lewis, R.J. 2006. Identification of a novel class of nicotinic receptor antagonists: dimeric conotoxins VxXIIA, VxXIIB, and VxXIIC from *Conus vexillum*. *J Biol Chem* 281:24745-55

Lubbers, N.L., Campbell, T.J., Polakowski, J.S., Bulaj, G., Layer, R.T., Moore, J., Gross, G.J. y Cox, B.F. 2005. Postischemic

administration of CGX-1051, a peptide from cone snail venom, reduces infarct size in both rat and dog models of myocardial ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:141-6

Luna-Ramírez, K.S., Aguilar, M.B., Falcón, A., Heimer de la Coterá, E.P., Olivera, B.M. y Maillo, M. 2007. An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. *Peptides* 28:24-30

Luo, S., Kulak, J.M., Cartier, G.E., Jacobsen, R.B., Yoshikami, D., Olivera, B.M. y McIntosh, J.M. 1998. α -conotoxin AuIB selectively blocks $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J Neurosci* 18:8571-9

Luo, S., Zhangsun, D., Lin, Q., Xie, L., Wu, Y. y Zhu, X. 2006. Sequence diversity of O-superfamily conopeptides from *Conus marmoreus* native to Hainan. *Peptides* 27:3058-68

Maillo-Peñalver, M. 2001. Extracción, purificación y caracterización química y biológica de péptidos neuroactivos provenientes de especies de *Conus*. *Universidad Nacional Autónoma de México*, Juriquilla, Querétaro. 116 pp.

Marshall, I.G. y Harvey, A.L. 1990. Selective neuromuscular blocking properties of α -conotoxins in vivo. *Toxicon* 28:231-4

McIntosh, M., Cruz, L.J., Hunkapiller, M.W., Gray, W.R. y Olivera, B.M. 1982. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch Biochem Biophys* 218:329-34

McIntosh, J.M., Olivera, B.M., Cruz, L.J. y Gray, W.R. 1984. γ -carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J Biol Chem* 259:14343-6

McIntosh, J.M., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Dooley, D.J., Stoehr, S.J., Giordani, A.B., Naisbitt, S.R. y Olivera, B.M. 1995a. Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J Biol Chem* 270:3518-26

McIntosh, J.M., Hasson, A., Spira, M.E., Gray, W.R., Li, W., Marsh, M., Hillyard, D.R. y Olivera, B.M. 1995b. A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 270:16796-802

McIntosh, J.M., Olivera, B.M. y Cruz, L.J. 1999a. *Conus* peptides as probes for ion channels. *Methods Enzymol* 294:605-24

McIntosh, J.M., Santos, A.D. y Olivera, B.M. 1999b. *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu Rev Biochem* 68:59-88

McIntosh, J.M., Gardner, S., Luo, S., Garrett, J.E. y Yoshikami, D. 2000. *Conus* peptides: novel probes for nicotinic acetylcholine receptor structure and function. *Eur J Pharmacol* 393:205-8

McIntosh, J.M., Plazas, P.V., Watkins, M., Gomez-Casati, M.E., Olivera, B.M. y Elgoyhen, A.B. 2005. A novel α -conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat $\alpha 9\alpha 10$ and $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 280:30107-12

Miljanich, G.P. 2004. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* 11:3029-40

Mitchell, S.S., Shon, K.J., Foster, M.P., Davis, D.R., Olivera, B.M. y Ireland, C.M. 1998. Three-dimensional solution structure of conotoxin ψ -PIIIE, an acetylcholine gated ion channel antagonist. *Biochemistry* 37:1215-20

Nagabhushanam, R. 2004. Biotechnology of aquatic animals. *Science Publishers*, Universidad de California, 182 pp.

Nicke, A., Loughnan, M.L., Millard, E.L., Alewood, P.F., Adams, D.J., Daly, N.L., Craik, D.J. y Lewis, R.J. 2003. Isolation, structure, and activity of GID, a novel $\alpha 4/7$ -conotoxin with an extended N-terminal sequence. *J Biol Chem* 278:3137-44

Nicke, A., Wonnacott, S. y Lewis, R.J. 2004. α -conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Eur J Biochem* 271:2305-19

Nimorakiotakis, B. y Winkel, K. 2002. Marine Envenomations. Part 2 - Other Marine Envenomations. *Australian Family Physician* 31:975-9

Nielsen, K.J., Watson, M., Adams, D.J., Hammarstrom, A.K., Gage, P.W., Hill, J.M., Craik, D.J., Thomas, L., Adams, D., Alewood, P.F. y Lewis, R.J. 2002. Solution structure of μ -conotoxin PIIIA, a preferential inhibitor of persistent tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J Biol Chem* 277:27247-55

Norton, R.S. y Olivera, B.M. 2006. Conotoxins down under. *Toxicon* 48:780-98

Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Luque, F.A. y Gray, W.R. 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 23:5087-90

Olivera, B.M., Gray, W.R., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Varga, J., Rivier, J., de Santos, V. y Cruz, L.J. 1985a. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230:1338-43

Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Clark, C., Middlemas, D., Gray, W.R. y Cruz, L.J. 1985b. A sleep-inducing peptide from *Conus geographus* venom. *Toxicon* 23:277-82

Olivera, B.M., Cruz, L.J., de Santos, V., LeCheminant, G.W., Griffin, D., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Galyean, R., Varga, J., y Gray, W.R. 1987. Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using ω -conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry* 26:2086-90

Olivera, B.M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard, D.R. y Cruz, L.J. 1990. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249:257-63

Olivera, B.M., Johnson, D.S., Azimi-Zonooz, A. y Cruz, L.J. 1992. Peptides in the venom of the geography cone, *Conus geographus*. En *Toxins and Targets*, ed. Waters, D., Lavin, M., Maguire, D. y Pearn, J., pp. 19-28. Melbourne, Australia: Harwood Academic Publ.

Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J. y Adams, M.E. 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-67

Olivera, B.M. 1997. E.E. Just Lecture, 1996. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 8:2101-9

Olivera, B.M. y Cruz, L.J. 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 39:7-14

Olivera, B. 2002. *Conus* venom peptides: Reflections from the biology of clades and species. *Annu Rev Ecol Syst* 33:25-47

Randall, A.D. 1998. The molecular basis of voltage-gated Ca^{2+} channel diversity: is it time for T? *J Membr Biol* 161:207-13

Rigby, A.C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D.E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J.D., Furie, B.C., Furie, B. y Stenflo, J. 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca^{2+} influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5758-63

Rivier, J., Galyean, R., Gray, W.R., Azimi-Zonooz, A., McIntosh, J.M., Cruz, L.J. y Olivera, B.M. 1987a. Neuronal calcium channel inhibitors. Synthesis of ω -conotoxin GVIA and effects on ^{45}Ca uptake by synaptosomes. *J Biol Chem* 262:1194-8

Rivier, J., Galyean, R., Simon, L., Cruz, L.J., Olivera, B.M. y Gray, W.R. 1987b. Total synthesis and further characterization of the γ -carboxyglutamate-containing "sleeper" peptide from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 26:8508-12

Safo, P., Rosenbaum, T., Shcherbatko, A., Choi, D.Y., Han, E., Toledo-Aral, J.J., Olivera, B.M., Brehm, P. y Mandel, G. 2000. Distinction among neuronal subtypes of voltage-activated sodium channels by μ -conotoxin PIIIA. *J Neurosci* 20:76-80

Salceda, E. y Ortega, A. 2009. Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción. *Elementos* 74:29-37

Sandall, D.W., Satkunanathan, N., Keays, D.A., Polidano, M.A., Liping, X., Pham, V., Down, J.G., Khalil, Z., Livett, B.G. y Gayler, K.R. 2003. A novel α -conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry* 42:6904-11

Schagger, H. y von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-79

Sharpe, I.A., Gehrman, J., Loughnan, M.L., Thomas, L., Adams, D.A., Atkins, A., Palant, E., Craik, D.J., Adams, D.J., Alewood, P.F. y Lewis, R.J. 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nat Neurosci* 4:902-7

Shon, K.J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, G.E., Hopkins, C., Gray, W.R., Watkins, M., Hillyard, D.R., Rivier, J., Torres, J., Yoshikami, D. y Olivera, B.M. 1997. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 36:9581-7

Shon, K.J., Hasson, A., Spira, M.E., Cruz, L.J., Gray, W.R. y Olivera, B.M. 1994. δ -conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry* 33:11420-5

Shon, K.J., Olivera, B.M., Watkins, M., Jacobsen, R.B., Gray, W.R., Floresca, C.Z., Cruz, L.J., Hillyard, D.R., Brink, A., Terlau, H. y Yoshikami, D. 1998. μ -Conotoxin PIIIA, a new peptide for

discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J Neurosci* 18:4473-81

Sierra-Beltran, A.P., Cruz, A., Nuñez, E., Del Villar, L.M., Cerecero, J. y Ochoa, J.L. 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon* 36:1493-502

Songdahl, J.H. 1973. The venom and venom apparatus of the Atlantic cone, *Conus spurius atlanticus* (Clench). *Bull Mar Sci* 23:600-12

Spence, I., Gillessen, D., Gregson, R.P. y Quinn, R.J. 1977. Characterization of the neurotoxic constituents of *Conus geographus* (L) venom. *Life Sci* 21:1759-69

Sygo, M. 1999. "*Conus spurius*" (on-line), *Animal Diversity Web*. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Conus_spurius.html

Terlau, H., Stocker, M., Shon, K.J., McIntosh, J.M. y Olivera, B.M. 1996. μ O-conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels, but not through site I. *J Neurophysiol* 76:1423-9

Terlau, H. y Olivera, B.M. 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev* 84:41-68

Turk, T. y Kem, W.R. 2009. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 54:1031-7

Venugopal, V. 2009. *Marine products for healthcare : functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 527 pp.

Volpon, L., Lamthanh, H., Barbier, J., Gilles, N., Molgo, J., Menez, A. y Lancelin, J.M. 2004. NMR solution structures of δ -conotoxin EVIA from *Conus ermineus* that selectively acts on vertebrate neuronal Na⁺ channels. *J Biol Chem* 279:21356-66

Walker, C.S., Jensen, S., Ellison, M., Matta, J.A., Lee, W.Y., Imperial, J.S., Duclos, N., Brockie, P.J., Madsen, D.M., Isaac, J.T.,

Olivera, B. y Maricq, A.V. 2009. A novel *Conus* snail polypeptide causes excitotoxicity by blocking desensitization of AMPA receptors. *Curr Biol* 19:900-8

Walker, C.S., Steel, D., Jacobsen, R.B., Lirazán, M.B., Cruz, L.J., Hooper, D., Shetty, R., DelaCruz, R.C., Nielsen, J.S., Zhou, L.M., Bandyopadhyay, P., Craig, A.G. y Olivera, B.M. 1999. The T-superfamily of conotoxins. *J Biol Chem* 274:30664-71

Watters, M.R. y Stommel, E.W. 2004. Marine Neurotoxins: Envenomations and Contact Toxins. *Curr Treat Options Neurol* 6:115-23

West, P.J., Bulaj, G., Garrett, J.E., Olivera, B.M. y Yoshikami, D. 2002. μ -conotoxin SmIIIa, a potent inhibitor of tetrodotoxin-resistant sodium channels in amphibian sympathetic and sensory neurons. *Biochemistry* 41:15388-93

West, P.J., Bulaj, G. y Yoshikami, D. 2005. Effects of δ -conotoxins PVIA and SVIE on sodium channels in the amphibian sympathetic nervous system. *J Neurophysiol* 94:3916-24

White, H.S., McCabe, R.T., Armstrong, H., Donevan, S.D., Cruz, L.J., Abogadie, F.C., Torres, J., Rivier, J.E., Paarmann, I., Hollmann, M. y Olivera, B.M. 2000. *In vitro* and *in vivo* characterization of conantokin-R, a selective NMDA receptor antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*. *J Pharmacol Exp Ther* 292:425-32

Williams, A.J., Dave, J.R., Phillips, J.B., Lin, Y., McCabe, R.T. y Tortella, F.C. 2000. Neuroprotective efficacy and therapeutic window of the high-affinity N-methyl-D-aspartate antagonist conantokin-G: *In vitro* (Primary cerebellar neurons) and *in vivo* (rat model of transient focal brain ischemia) studies. *J Pharmacol Exp Ther* 294:378-86

Williams, A.J., Ling, G., McCabe, R.T. y Tortella, F.C. 2002. Intrathecal CGX-1007 is neuroprotective in a rat model of focal cerebral ischemia. *Neuroreport* 13:821-4

Woodward, S.R., Cruz, L.J., Olivera, B.M. y Hillyard, D.R. 1990. Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO J* 9:1015-20

Yanagawa, Y., Abe, T., Satake, M., Odani, S., Suzuki, J. y Ishikawa, K. 1988. A novel sodium channel inhibitor from *Conus geographus*: purification, structure, and pharmacological properties. *Biochemistry* 27:6256-62

Zhang, S.J., Yang, X.M., Liu, G.S., Cohen, M.V., Pemberton, K. y Downey, J.M. 2003. CGX-1051, a peptide from *Conus* snail venom, attenuates infarction in rabbit hearts when administered at reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 42:764-71

Zorn, S., Leipold, E., Hansel, A., Bulaj, G., Olivera, B.M., Terlau, H. y Heinemann, S.H. 2006. The μ O-conotoxin MrVIA inhibits voltage-gated sodium channels by associating with domain-3. *FEBS Lett* 580:1360-4

ANEXOS

Especie	Secuencia	Nombre del péptido	Efecto	Referencia
<i>C. geographus</i>	ECCNPACGRHYSC*	α -Conotoxina GI	Parálisis en vertebrados; se une al receptor de acetilcolina neuromuscular.	(Gray <i>et al.</i> , 1981; Gray <i>et al.</i> , 1984)
	RDCCTPPKKCKDRQCKPQRCCA*	μ -Conotoxina GIIIA	Parálisis en vertebrados; actúa en el canal de Na ⁺ del músculo esquelético.	(Cruz <i>et al.</i> , 1985; Cruz <i>et al.</i> , 1989)
	CKSPGSSCSPTSYNCCRSCNPYTKRCY*	ω -Conotoxina GVIA	Parálisis en vertebrados inferiores; mostrando síntomas al momento de inyectar al ratón intracranealmente; actúa en canales presinápticos de Ca ²⁺ .	(Olivera <i>et al.</i> , 1984; Rivier <i>et al.</i> , 1987a)
<i>C. textile</i>	WCKQSGEMCNLLDQNCDDGYCIVLVCT	Péptido “King Kong”	Las langostas adoptan una posición dominante; tiene un efecto de contracción en caracoles; no se presentan síntomas en ratones.	(Endo & Tamiya, 1987)
<i>C. quercinus</i>	CCRTCFGCTPCC*	Péptido “Scratcher”	Los ratones comienzan a rascarse.	(Hillyard <i>et al.</i> , 1989)
	NCPYCVVYCCPPAYCEASGCRPP*	Péptido “Convulsant”	Causa convulsiones en ratones.	(Hillyard <i>et al.</i> , 1989)

	CCSQDCLVCIPCCPN*	Sin nombre	Los ratones comienzan a rascarse. (Abogadie <i>et al.</i> , 1990)
	DQSCPWCGFTCCLPNYCQGLTC(T,V,I)	Sin nombre	Los ratones comienzan a rascarse y se ponen inquietos. (Abogadie <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. tulipa</i>	GE γ γ YQKML γ NLR γ AEVKKNA*	Conantokina-T	Duerme a ratones jóvenes y causa hiperactividad en ratones viejos; se une a receptores de NMDA. (Haack <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. geographus</i>	GE γ γ LQ γ NQ γ LIR γ KSN*	Conantokina-G	Duerme a ratones jóvenes y causa hiperactividad en ratones viejos; se une a receptores de NMDA. (Olivera <i>et al.</i> , 1985b; McIntosh <i>et al.</i> , 1984; Rivier <i>et al.</i> , 1987b)
<i>C. geographus</i>	ACSGRGSRCPPQCCMGLRCGRGNPQKCIGAH γ DH	Conotoxin-GS	Causa muerte con la inyección intercraneal; se une a canales de Na ⁺ . (Yanagawa <i>et al.</i> , 1988)
<i>C. geographus</i>	KFLSGGFK γ IVCHRYCAKGIAKEFCNCPD*	Sin nombre	Los ratones comienzan a rascarse; su blanco es desconocido. (Olivera <i>et al.</i> , 1992)

ANEXO 2: ABREVIATURAS Y MASAS MOLECULARES DE AMINOÁCIDOS.

Nombre	Abreviaturas	Masa promedio del residuo (Daltons)
Alanina	A, Ala	71.08
Arginina	R, Arg	156.20
Asparagina	N, Asn	114.11
Ácido aspártico	D, Asp	115.09
Cisteína	C, Cys	103.14
Glutamina	Q, Gln	128.14
Ácido glutámico	E, Glu	129.12
Glicina	G, Gly	57.06
Histidina	H, His	137.15
Isoleucina	I, Ile	113.17
Leucina	L, Leu	113.17
Lisina	K, Lys	128.18
Metionina	M, Met	131.21
Fenilalanina	F, Phe	147.18
Prolina	P, Pro	97.12
Serina	S, Ser	87.08
Treonina	T, Thr	101.11
Triptófano	W, Trp	186.21
Tirosina	Y, Tyr	163.18
Valina	V, Val	99.14

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

mm	Milímetros	TTX	Tetrodotoxina
kDa	Kilodaltons	ACh	Acetilcolina
Na⁺	Sodio	NMDA Receptor	para Glutamato ionotrópico (N- methyl-D-aspartate)
m	Metros	AMPA Receptor	para Glutamato ionotrópico (α - amino-3-hydroxy-5-methyl- 4-isoxazole propionic acid)
spp.	Especies	nm	Nanómetro
α	Alfa	μm	Micrómetro
β	Beta	Å	Amstrong
χ	Chi	TFA	Ácido trifluoroacético
δ	Delta	MeCN	Acetonitrilo acuoso
ϵ	Epsilon	ml	Mililitro
γ	Gamma	min	Minuto
ι	Iota	UV	Ultravioleta
κ	Kappa	LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
λ	Lamda	ESI	Electrospray Ionization
μ	Mu	ppm	Partes por millón
ρ	Rho	m	Masa
σ	Sigma		
ω	Omega		
ψ	Psi		
rACh-N	Receptores nicotínicos de Acetilcolina		
GPCR	G protein- coupled receptors		

z	Carga	Da	Dalton
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano	pmol	Picomol
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	nr	Non redundant
DTT	Ditiotreitol	a.a	Aminoácido
CID	Collision induced dissociation	pH	Potencial Hidrógeno
HCD	High energy collision dissociation		
μl	Microlitro		
M	Molar		
mM	Milimolar		
°C	Grados Centígrados		
VP	Vinilpiridina		
N₂	Nitrógeno		
h	Horas		
NH₄HCO₃	Bicarbonato de Amonio		
KHPO₄	Monofosfato de Potasio		
BLASTP	Basic Local Alignment Search Tool		
μV	Microvolt		
seg	Segundo		
μg	Microgramo		