



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

**IDENTIFICACIÓN, MEDIANTE RT-PCR, DE TOXINAS DEL
CARACOL MARINO *Conus nux***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A

Q.F.B. Ernesto Flores Martínez

Director de Tesis: Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez



Campus Juriquilla, Querétaro. Junio 2011



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Q.F.B. Ernesto Flores Martínez, cuyo título es: "Identificación, mediante RT-PCR, de toxinas del caracol marino *Conus nux*", se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Secretario (Tutor)

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Vocal

Dr. José Estuardo López Vera

Suplente

Dra. Anaid Antaramian Salas

Suplente

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México *campus* Juriquilla. Becario Número: 37388

Agradezco a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, becario Número. 300156137.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado por CONACyT 79929 y PAPIIT-DGAPA-UNAM IN-204403 y por el presupuesto del Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla

A la Unidad de Proteogenómica (UPG) de la UNAM capus Juriquilla, en especial a la M en C Adriana González y a la Dra. Anaid Antaramian, por apoyo técnico brindado en la elaboración de los experimentos para este trabajo.

Al Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera, Por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por los consejos, por apoyo incondicional brindado en todo momento y por proporcionarme los caracoles para este trabajo.

Al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, Por introducirme en el mundo de los caracoles Cono, por las largas pláticas y consejos otorgados

Al Biólogo Experimental Andrés Falcón Alcántara, por enseñarme la técnica de extracción del conducto venenoso, por los consejos, las pláticas y hacer agradable mi estancia en el laboratorio.

Al la Dra. Eréndida Gorostieta Hurtado, Por enseñarme anatomía de los caracoles, así como las pláticas y consejos que me brindaste.

Al LBT Reginaldo Rivera Reyes por el apoyo técnico brindado al inició de este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutor, Dr. Manuel Aguilar Ramírez, Dra. Anahid Antaramián Salas y Dra. Maricela Luna Muñoz. Por los comentarios que semestre tras semestres me brindaron, así como por los consejos para la realización de los experimentos de este trabajo.

A la pLTB Elizabeth Cortez Camacho, por su participación en la elaboración de una parte de los experimentos de la superfamilia A.

A mis compañeros de maestría, Cinthya, Daniela, Yunuen, Veronica, Hugo, Socrates, Ulises, Adan y Daniel, por todos esos momentos que vivimos bebimos y convivimos.

DEDICATORIA

A mi familia: a mis padres Joel y Lucía, a mi hermano Alejandro, por brindarme ese apoyo incondicional en todo momento y a mis dos amores Elida y Sofía, ellas son el motor de mi vida y en todo momento mi mejor compañía.

1. Resumen

Los caracoles marinos del género *Conus* se destacan por la gran diversidad de genes que codifican péptidos neurotóxicos presentes en su veneno. Estas toxinas son producidas en forma de bibliotecas estructuralmente combinatorias de pre-pro-péptidos las cuales presentan una gran cantidad de mutaciones en prácticamente todos los residuos de la secuencia del péptido maduro. Utilizando la técnica de RT-PCR, se buscaron conotoxinas de las superfamilias A y T del caracol marino *C. nux*, habitante de las costas del Pacífico mexicano. Se diseñaron oligonucleótidos basados en secuencias conservadas en las regiones 5' y 3' no codificantes (UTR) de ambas superfamilias. Cinco nuevas secuencias de ADN que codifican péptidos precursores de la superfamilia A fueron identificadas; los precursores presentan un péptido señal de 21 residuos de aminoácidos, una región "pro" de 16 residuos de aminoácidos y cinco toxinas maduras distintas de 23 residuos de aminoácidos, las cuales pertenecen a dos subfamilias estructurales, la $\alpha 4/4$ y la $\alpha 4/5$. En el caso de la superfamilia T, se identificaron nueve secuencias nuevas de ADN que codifican precursores de siete nuevas conotoxinas T1, las cuales presentan un arreglo de cisteínas CC-CC, un péptido señal de 19 residuos de aminoácidos, una región "pro" de 16 residuos de aminoácidos y una toxina madura de 23 aminoácidos; con un par de oligonucleótidos de esta superfamilia se lograron amplificar dos precursores distintos de dos conotoxinas de la superfamilia O1. Los resultados aquí presentados son útiles para la síntesis de nuevas conotoxinas con el fin de identificar sus blancos moleculares

2 Summary

The marine snails of the genus *Conus* are remarkable in the extension and diversity of the gene-encoded neurotoxic peptides present in their venom. These toxins are produced as structurally constrained combinatorial pre-pro-peptides libraries in which they present hypermutation essentially in all residues of the mature toxin. Using RT-PCR, we searched for A and T superfamily conotoxins from the marine snail *C. nux*, a resident of the Pacific coast of México. Primers were designed based on conserved sequences in 5' and 3' untranslated regions (UTR) of both superfamilies. Five new ADN sequences were identified for the A-superfamily encoding precursor peptides; they present a signal peptide of 21 amino acid residues, a pro region of 16 amino acid residues and a mature toxin of 23 amino acid residues, which belong to two structural subfamilies, the α 4/4 and the α 4/5. On the other hand, in the case of the T superfamily, 9 new sequences of ADN were identified that encode for precursors of 7 new T1 conotoxins; all of them present the cysteine arrangement CC-CC, a signal peptide of 19 amino acid residues, a pro region of 16 amino acid residues and a mature toxin of 23 amino acid residues. We were also able to amplify two different precursors of two conotoxins of the O1-superfamily with one set of oligonucleotides for this superfamily. The results presented here might be useful in the synthesis of new conotoxins in order to identify their molecular targets

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen	v
2 Summary	vi
3 Introducción	1
4 Antecedentes	2
4.1 Caracoles cono	2
4.1.1 Clasificación taxonómica.....	2
4.1.2 Distribución geográfica.....	2
4.1.3 Características generales.....	2
4.2 Conotoxinas	5
4.2.1 Superfamilia A.....	8
4.2.2 Superfamilia T.....	10
4.2.3 Síntesis de conotoxinas.....	11
4.2.4 Modificaciones post traduccionales.....	12
4.2.5 Nomenclatura de las conotoxinas.....	14
4.3 Conus nux	15
5 Justificación	16
6 Hipótesis	17
7 Objetivo General	17
7.1 Objetivos Particulares.....	17
8 Material y Métodos	18
8.1 Material biológico.....	18
8.2 Extracción de ARN total.....	18
8.3 Clonación y purificación de ADNc.....	18
8.4 Ligación del plásmido y transformación de células competentes.....	19
8.5 Diseño de oligonucleótidos para las superfamilias A y T.....	20
8.6 Secuenciación de muestras.....	20
8.7 Análisis de secuencias.....	20
9 Resultados	21
9.1 Diseño de oligonucleótidos para la superfamilia A.....	21
9.2 Diseño de oligonucleótidos para la superfamilia T.....	21
9.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	22
9.4 Superfamilia A.....	23
9.5 Superfamilia T.....	28
10 Análisis y discusión de resultados	37
10.1 Purificación de ARN.....	38
10.2 Superfamilia A.....	38
10.3 Superfamilia T.....	41
11 Conclusiones	46
12 Bibliografía	47
ÍNDICE DE FIGURAS	55
ÍNDICE DE TABLAS	55

3 Introducción

Una de las tácticas de supervivencia más interesantes dentro del reino animal es la producción de toxinas, ya sea como mecanismo de defensa o como arma para la captura de presas. Esta estrategia es usada por organismos de diversos grupos como eubacterias, artrópodos, cnidarios, plantas, moluscos y diversos vertebrados. Entre los venenos de mayor interés por su posible aplicación farmacéutica y su gran diversidad de toxinas codificadas en una gran variedad de genes, se encuentran los venenos de arañas, escorpiones y caracoles Cono.

Los caracoles Cono (orden: Neogastropoda, género: *Conus*) es el grupo de gasterópodos más abundante en el mundo ya que presenta de 500 a 700 especies, siendo todos sus representantes carnívoros. Estos caracoles poseen un aparato venenoso altamente sofisticado, el cual está constituido por un bulbo y un conducto venenoso, y un saco radular, el cual contiene dientes en forma de arpón acanalados y barbados. De este modo, a la hora de cazar a su presa, estos animales extienden la probóscide y “disparan” un diente cargado de veneno. Una característica de sus venenos es que contienen una gran gama de toxinas. Además, cada especie presenta un veneno de características peculiares, con un perfil farmacológico definido y totalmente diferente al de cualquier otra especie. Así mismo, los venenos de los caracoles Cono se caracterizan por presentar una mezcla de toxinas que actúan en diferentes puntos de la transmisión nerviosa y/o de actividad muscular y sus toxinas son extraordinariamente específicas de sus blancos moleculares, uniéndose solo a determinados receptores de membrana de células muy bien definidas. Sin embargo, los venenos de los caracoles Cono del continente americano han sido muy poco estudiados, y es por ello que en este trabajo tiene como propósito el demostrar, mediante técnicas de biología molecular, que el veneno del caracol *Conus nux*, presente en el Pacífico americano, presenta conotoxinas de las superfamilias A y T.

4 Antecedentes

4.1 Caracoles cono

4.1.1 Clasificación taxonómica

Las caracoles Cono pertenecen al Phylum Mollusca, a la clase Gastropoda, a la subclase Caenogastropoda, al orden Hypsogastropoda, al suborden Neogastropoda, a la superfamilia Conoidea, a la familia Conidae, y al género *Conus* (Peng *et al.*, 2007). La superfamilia Conoidea incluye también a las familias Terebridae y Turridae (Vaught, 1989).

4.1.2 Distribución geográfica

La mayoría de estos gasterópodos marinos se localizan en todos los ambientes marinos tropicales y en menor grado en zonas subtropicales. La distribución batimétrica oscila de centímetros en profundidad hasta más de 150 m. Su hábitad principal son arrecifes de coral, donde se pueden encontrar hasta 30 especies distintas. Se han determinado diferentes provincias marinas, de las cuales, aproximadamente el 60% de las especies se localizan en la región del Indo-Pacífico (IP) (Röckel *et al.*, 1995), la cual comprende el Océano Índico tropical y subtropical así como el Océano Pacífico en su parte central tropical y occidental tropical; el 40% restante, se encuentra distribuidas en las diferentes provincias restantes, las cuales son: el Océano Pacífico del este (EP), que se extiende desde Baja California hasta el Ecuador, el Océano Atlántico occidental (WA), que comprende las Bermudas, Florida meridional, desde el Golfo de México y el Mar Caribe hasta Río de Janeiro, y el Océano Atlántico del este (EA), que comprende desde Cabo Verde hasta Angola (Duda Jr. y Kohn, 2005).

4.1.3 Características generales

Los caracoles Cono son uno de los grupos más diversos de depredadores marinos, constituido por 500 a 700 especies aproximadamente (Figura 1), las cuales pueden expresar de 50,000 hasta 70,000 conotoxinas distintas, debido a que cada especie

puede sintetizar alrededor de 100 comotoxinas (Norton y Olivera, 2006). Algunas de estas toxinas se encuentran entre las más potentes del reino animal.

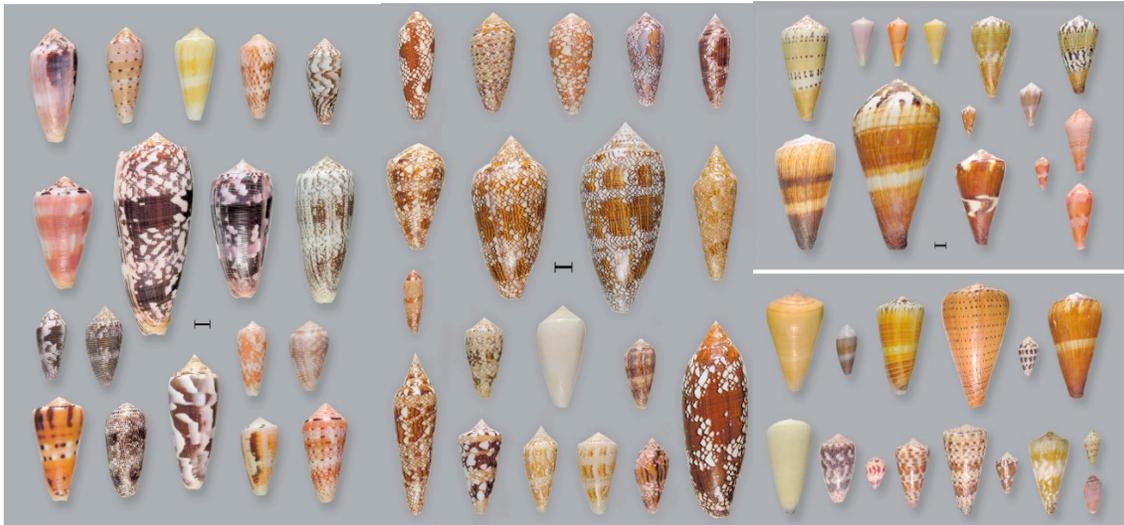


Figura 1. Ejemplos de algunas especies de caracoles cono de las región del IndoPacífico, excepto *C. californicus* (esquina inferior derecha), el cual se colectó del Océano Pacífico oriental. La barra negra representa 1 cm. Modificado de Olivera, 2002.

Los caracoles cono tienen una concha de forma cónica regular con una abertura en la base del ápice por donde se extiende el caracol, un sifón, una probóscide larga y maniobrable apoyada en un bulbo bucal muy musculoso y voluminoso, dos tallos oculares, un pie por medio del cual se desplazan y en la parte trasera se localiza el opérculo (Figura 2). Estos caracoles poseen un aparato venenoso altamente sofisticado para poder capturar a sus presas (Kohn *et al.*, 1960).

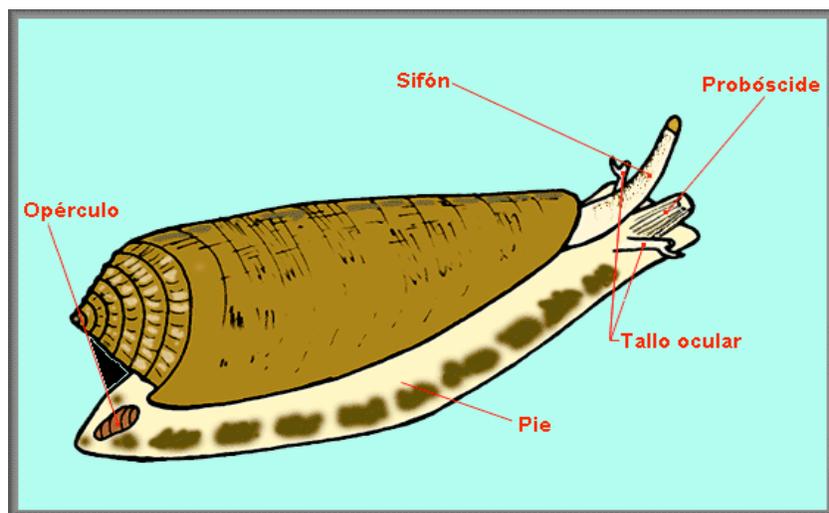


Figura 2. Esquema de un caracol cono.

El aparato venenoso (Figura 3) está constituido en la parte posterior por un bulbo, que deriva a un conducto venenoso, el cual se conecta, en la parte anterior, con el saco radular; el saco radular sirve para el amacen de los dientes radulares, quienes tienen forma de arpón acanalados y barbados. De este modo, a la hora de cazar a su presa, estos animales extienden la probóscide y “disparan” un diente cargado de veneno el cual puede o no permanecer unido a la probóscide. Este grupo de depredador han desarrollado a través de la evolución, un sistema neurofarmacológico altamente sofisticado, basando su estrategia en un veneno formado por péptidos pequeños (10-35 aminoácidos) (Olivera *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1991; Olivera y Cruz, 2001).

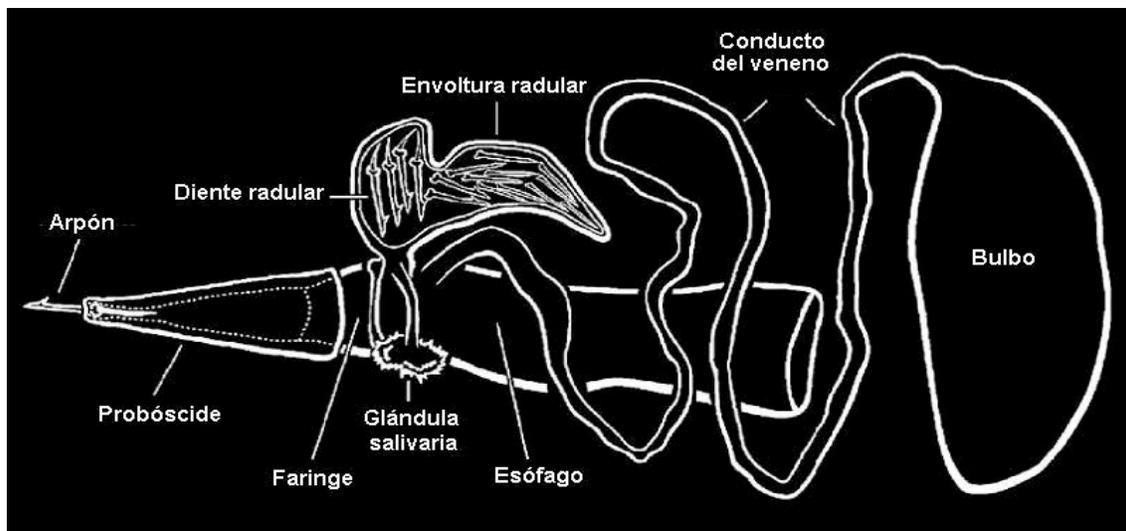


Figura 3. Esquema del aparato venenoso. Modificado de Norton y Olivera, 2006.

Una forma de clasificar a los caracoles como es de acuerdo a su tipo de alimentación; esta clasificación los divide en tres grandes grupos de acuerdo al tipo principal de presa (Craig, 2000):

Piscívoros.- Se alimentan principalmente de peces, ejemplos: *C. striatus*, *C. geographus*, *C. purpurascens*, *C. radiatus*.

Molusquívoros.- Se alimentan principalmente de moluscos, ejemplos: *C. textile*, *C. marmoreus*.

Vermívoros.- Se alimentan principalmente de gusanos, ejemplos: *C. lividus*, *C. glans*, *C. planorbis*, *C. betulinus*, *C. ebraeus*, *C. vexillum*, *C. virgo*, *C. arenatus*, *C. sponsalis*, *C. tessulatus*, *C. imperialis*.

También existen especies como *Conus californicus* que tiene una dieta muy diversa, ya que vive en un ambiente de agua fría y en su hábitat no hay especies que compitan con él (Kohn, 1966).

4.2 Conotoxinas

Por la gran diversidad en los ambientes marinos donde habitan, este tipo de gasterópodos han desarrollado mecanismos efectivos para inmovilizar y capturar a sus presas (Figura 4A), así como para su defensa (Figura 4B). Es por ello que los caracoles como producen potentes venenos neurotóxicos los cuales paralizan a su presa en cuestión de fracciones de segundo.

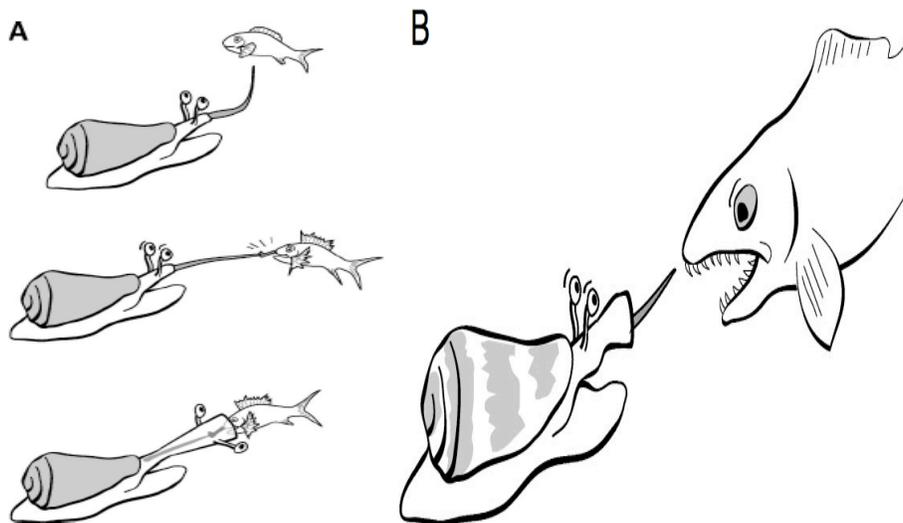


Figura 4. Caricatura representativa de dos diferentes formas en que los conus utilizan sus toxinas: (A) para cazar a sus presas, y (B) para defenderse de depredadores potenciales. Modificado de Olivera, 2002.

Los componentes activos del veneno de los caracoles como son sintetizados en las células epiteliales a lo largo del conducto venenoso, cuyo contenido es liberado dentro de la probóscide por el bulbo muscular. Todos los caracoles como utilizan un diente radular el cual es transportado individualmente dentro de la probóscide y es utilizado de dos formas, como arpón y como aguja hipodérmica (Figura 5). El diente radular puede

ser usado para clasificar taxonómicamente a los conos debido a que en diferentes grupos se presentan características únicas en los dientes (Olivera, 2002).

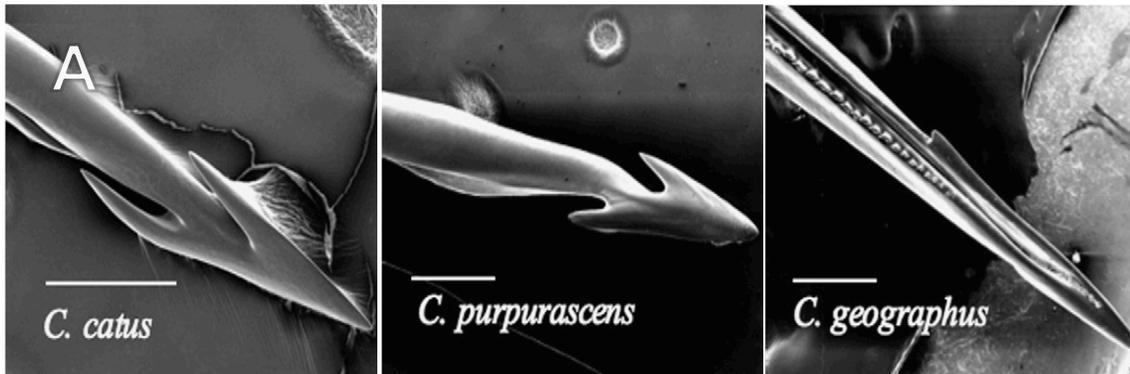


Figura 5. Fotografías de microscopia de barrido electrónico de dientes radulares. La barra representa 0.1 mm. Tomado de Bingham *et al.*, 2010.

Los venenos de algunos *Conus* piscívoros producen un choque excitotóxico y parálisis irreversible por bloqueo neuromuscular (López-Vera *et al.*, 2004). En los humanos, pueden causar la muerte; este hecho fue lo que motivó a los investigadores a realizar el estudio de estos venenos (Olivera y Cruz, 2001).

El veneno de los caracoles cono contiene entre 50 y 200 péptidos activos diferentes, la mayoría de los cuales tienen un tamaño de 12 a 30 aminoácidos (Myers *et al.*, 1993). La característica más predominante de los péptidos es su arreglo de cisteínas; por otra parte de acuerdo a la cantidad de puentes disulfuro, los conopéptidos se pueden clasificar en dos grandes grupos, los que presentan más de dos puentes disulfuro catalogados como conotoxinas y los que presentan uno o ningún puente llamados también conopéptidos (Figura 6). Un aspecto importante de los conopéptidos es que presentan una alta afinidad por su blanco molecular, es decir, solo se necesita una concentración muy baja de ellos para que se unan a su blanco molecular y afecten las funciones del organismo atacado. Además, presentan propiedades similares a algunos fármacos, teniendo por consecuencia, un gran potencial como modelo para el diseño de nuevos fármacos.

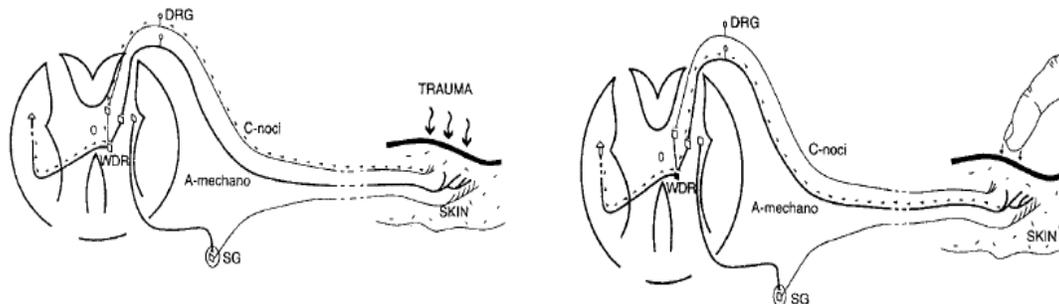


Figura 7. Diagrama de conducción del dolor neuropático. En el modelo de la izquierda se muestra la transmisión nociceptiva y en el diagrama de la derecha se muestra la transmisión mecanoreceptiva. A-mechano = neurona mecanoreceptiva tipo A; C-noci = Neurona nociceptiva tipo C; DRG = Ganglio del asta dorsal de la médula espinal; SG = Cadena de ganglios del sistema nervioso simpático. Modificado de Wermeling, 2005.

Existen otras conotoxinas que empiezan a ser utilizadas en pruebas preclínicas como analgésicos post operatorios, relajantes musculares, para tratar embolias, hipertensión, asma y arritmias, entre otras enfermedades (Terlau y Olivera, 2004).

Para abordar el estudio de las conotoxinas de una manera simplificada, los genes que codifican los más de 50,000 péptidos se agruparon en superfamilias (Figura 6). En general cada superfamilia de conotoxinas presenta una secuencia conservada y distintiva en su péptido señal y un arreglo característico de cisteínas en el péptido maduro; sin embargo, solo en algunas de ellas se conoce su blanco molecular y su familia farmacológica. En este trabajo se analizarán las toxinas de las superfamilias A y T.

4.2.1 Superfamilia A

Las α -conotoxinas (α -ctx) son una familia de péptidos pequeños (12 a 19 aminoácidos), ricos en cisteínas, encontrados en la mayoría de las especies de *Conus*. Estos péptidos presentan una actividad farmacológica como antagonistas competitivos, sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina (AChR).

Cada miembro de esta familia, no solo presenta una afinidad selectiva a distintas subclases de los AChR, sino también a los sitios de unión específicos entre las subunidades, principalmente en los receptores neuronales, lo cual las convierte en herramientas ideales para el estudio de estos receptores en el sistema nervioso tanto

central como periférico. Adicionalmente, su estructura permite que sean los moldes ideales para el diseño de agentes farmacéuticos. Estas características se han empleado para catalogarlas en subfamilias (Tabla 1) de acuerdo a su arreglo conservado de cisteínas. La subfamilia $\alpha_{3/5}$ (CCX₃CX₅C) y la subfamilia $\alpha_{4/7}$ (CCX₄CX₇C), ambas presentan actividad en AChR neuromusculares, y las subfamilias $\alpha_{4/7}$ (CCX₄CX₇C), $\alpha_{4/6}$ (CCX₄CX₆C), $\alpha_{4/3}$ (CCX₄CX₃C) y $\alpha_{4/4}$ (CCX₄CX₄C), tienen actividad sobre AChR neuronales.

Secuencias de alfa conotoxinas neuromusculares																				
Nombre		Secuencia																		
$\alpha_{3/5}$ α -conotoxina																				
GI		Glu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Gly	Arg	His	Tyr	Ser	Cys	-NH ₂					
MI	Gly	Arg	Cys	Cys	His	Pro	Ala	Cys	Gly	Lys	Asn	Tyr	Ser	Cys	-NH ₂					
SI		Ile	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Gly	Pro	Lys	Tyr	Ser	Cys	-NH ₂					
SIA		Tyr	Cys	Cys	His	Pro	Ala	Cys	Gly	Lys	Asn	Phe	Asp	Cys	-NH ₂					
SII^b	Gly	Cys	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Gly	Pro	Asn	Tyr	Gly	Cys	Gly	Thr	Ser	Cys	Ser	
GIA		Glu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Gly	Arg	His	Tyr	Ser	Cys	Gly	Lys	-NH ₂			
GII		Glu	Cys	Cys	His	Pro	Ala	Cys	Gly	Lys	His	Phe	Ser	Cys	-NH ₂					
CnIA	Gly	Arg	Cys	Cys	His	Pro	Ala	Cys	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Cys	-NH ₂					
$\alpha_{4/7}$ α -conotoxina																				
EI		Arg	Asp	Hyp ^c	Cys	Cys	Tyr	His	Pro	Thr	Cys	Asn	Met	Ser	Asn	Pro	Gln	Ile	Cys	-NH ₂
Secuencia de alfa conotoxinas neuronales																				
Nombre		Secuencia																		
$\alpha_{4/7}$ α -conotoxina																				
MII			Gly	Cys	Cys	Ser	Asn	Pro	Val	Cys	His	Leu	Glu	His	Ser	Asn	Leu	Cys	-NH ₂	
AuIA			Gly	Cys	Cys	Ser	Tyr	Pro	Pro	Cys	Phe	Ala	Thr	Asn	Ser	Asp	Tyr	Cys	-NH ₂	
AuIC			Gly	Cys	Cys	Ser	Tyr	Pro	Pro	Cys	Phe	Ala	Thr	Asn	Ser	Gly	Tyr	Cys	-NH ₂	
PnIA			Gly	Cys	Cys	Ser	Leu	Pro	Pro	Cys	Ala	Ala	Asn	Asn	Pro	Asp	Tyr ^b	Cys	-NH ₂	
PnIB			Gly	Cys	Cys	Ser	Leu	Pro	Pro	Cys	Ala	Leu	Ser	Asn	Pro	Asp	Tyr ^b	Cys	-NH ₂	
EpI			Gly	Cys	Cys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Asn	Met	Asn	Asn	Pro	Asp	Tyr ^b	Cys	-NH ₂	
AnIA				Cys	Cys	Ser	His	Pro	Ala	Cys	Ala	Ala	Asn	Asn	Gln	Asp	Tyr ^b	Cys	-NH ₂	
AnIB		Gly	Gly	Cys	Cys	Ser	His	Pro	Ala	Cys	Ala	Ala	Asn	Asn	Gln	Asp	Tyr ^b	Cys	-NH ₂	
AnIC		Gly	Gly	Cys	Cys	Ser	His	Pro	Ala	Cys	Phe	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Tyr ^b	Cys	-NH ₂	
GIC			Gly	Cys	Cys	Ser	His	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Asn	Gln	His	Ile	Cys	-NH ₂	
GID	Ile	Arg	Asp	Gla ^c	Cys	Cys	Ser	Asn	Pro	Ala	Cys	Arg	Val	Asn	Asn	Hyp	His	Val	Cys	
Vc1.1^d			Gly	Cys	Cys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Asn	Tyr	Asp	His	Pro	Glu	Ile	Cys	-NH ₂	
PIA	Arg	Asp	Pro	Cys	Cys	Ser	Asn	Pro	Val	Cys	Thr	Val	His	Asn	Pro	Glu	Ile	Cys	-NH ₂	
$\alpha_{4/6}$ α -conotoxina																				
AuIB			Gly	Cys	Cys	Ser	Tyr	Pro	Pro	Cys	Phe	Ala	Thr	Asn	Pro	Asp	Cys	-NH ₂		
$\alpha_{4/3}$ α -conotoxina																				
ImI			Gly	Cys	Cys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Ala	Trp	Arg	Cys	-NH ₂					
ImII			Ala	Cys	Cys	Ser	Asp	Arg	Arg	Cys	Arg	Trp	Arg	Cys	-NH ₂					
ImIIA			Tyr	Cys	Cys	His	Arg	Gly	Pro	Cys	Met	Val	Trp	Cys	-NH ₂					
$\alpha_{4/4}$ α -conotoxina																				
BuIA^e			Gly	Cys	Cys	Ser	Thr	Pro	Pro	Cys	Ala	Val	Leu	Tyr	Cys	-NH ₂				

Tabla 1. Ejemplos de α -conotoxinas catalogados en sus diferentes subfamilias estructurales. Modificado de Olivera 2002

Los AChR son los prototipos de receptores canal modulados por un neurotransmisor específico. Esta superfamilia incluye receptores tipo A como los de glicina, ácido γ -aminobutírico y 5-hidroxitriptamina. Existen 2 principales tipos de AChR, los receptores neuromusculares y los receptores neuronales. Los receptores AChR tipo neuromuscular son pentámeros α conformados por 2 subunidades α_1 , una subunidad β_1 , una subunidad δ y una subunidad γ o una subunidad ϵ (dependiendo si se encuentra en un estadio embrionario o adulto, respectivamente). Las subunidades α_1 contienen 2 cisteínas

adyacentes en las posiciones 192 y 193, las cuales están involucradas en el reconocimiento y unión de los agonistas colinérgicos y sus antagonistas competitivos. Las subunidades de los AChR neuronales se clasifican de acuerdo a la presencia o ausencia de las dos cisteínas adyacentes; las subunidades presentan las cisteínas se denominan α y las clase β , no las presentan; se ha descrito ocho subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 9$) y 3 subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ son capaces de formar canales homo-oligoméricos.

4.2.2 Superfamilia T

La superfamilia T presenta péptidos de 10 a 17 aminoácidos; se encuentran en los tres tipos de alimentación. Esta superfamilia se divide en 2 subfamilias denominadas T1 y T2. La subfamilia T1 (τ -conotoxinas), presenta un patrón de cisteínas CC-CC, mientras que la subfamilia T2 (χ -conotoxinas) tiene un patrón de cisteínas CC-C-OC (O, hidroxiprolina). Las conotoxinas T1 presentan dos pares de cisteínas adyacentes separados, en general, por cinco aminoácidos, con una conectividad I-III, II-IV y pueden bloquear los canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a Tetrodotoxina (TTX). Las conotoxinas T2 presentan dos cisteínas juntas, separadas por cuatro aminoácidos de la tercer cisteína, la cual está separada por un aminoácido y una hidroxiprolina de la cuarta cisteína; tienen una conectividad I-IV, II-III y pueden inhibir reversiblemente los transportadores neuronales de norepinefrina.

Los canales de sodio sensibles a voltaje (Na_v) son la clave molecular para la generación de potenciales de acción en células excitables. Se han identificado 10 isoformas de subunidades con diferente distribución en tejidos. Los Na_v convencionalmente se dividen en dos grandes grupos, basándose en su sensibilidad al bloqueador clásico de la corriente de Na^+ , la TTX: los canales TTX-sensibles y los TTX-resistentes. El sitio de interacción entre la TTX y la proteína del canal se denomina sitio 1, y su localización se postuló en la región extracelular del poro del canal. Adicionalmente a este sitio, existen otros cinco sitios de interacción para diferentes sustancias con diferentes modos de acción sobre la actividad del canal. La mayoría de los ligandos que interactúan con los otros cinco sitios causan un incremento en la corriente de Na^+ , ya sea por cambio de la

relación corriente-voltaje o mediante el bloqueo de la inactivación rápida de estos canales (Terlau y Olivera, 2004).

4.2.3 Síntesis de conotoxinas

El ARN mensajero es traducido a un pre-pro-péptido, cuya organización consiste en una secuencia señal muy conservada de aproximadamente 25 aminoácidos (región “pre”), seguida por una secuencia variable o semi-conservada de 20 a 40 aminoácidos (región “pro”) y una región hipervariable donde se encuentra la toxina madura de 10 a 40 aminoácidos (Figura 8) (Olivera, 2006).

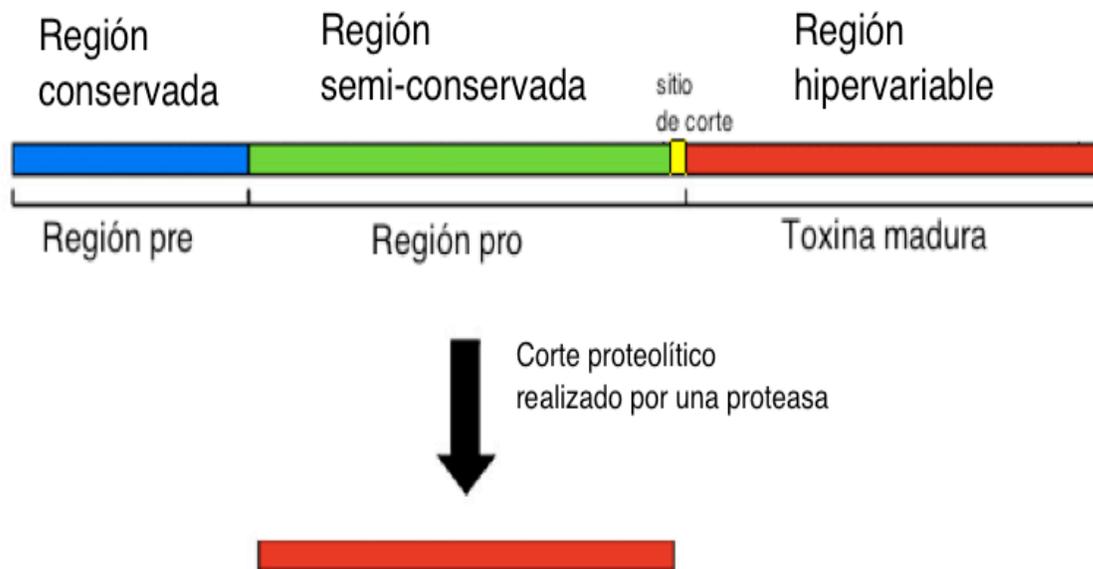


Figura 8. Modelo general de los precursores de conotoxinas. La toxina madura es separada de la región “pre-pro” por una peptidasa. Modificado de Bingham *et al.*, 2010.

Como se mencionó anteriormente, los péptidos de los conos son agrupados en superfamilias genéticas; dentro de una superfamilia, los péptidos no solo presentan un arreglo similar de sus cisteínas en el péptido maduro, sino que también muestran secuencias similares tanto en la región “pro” como en la región “pre”. Después de ser traducidos los ARN mensajeros, el péptido señal determina el destino del pre-pro-péptido; generalmente, entra en el retículo endoplasmático para su maduración. La región “pro” juega un papel importante en las modificaciones post traduccionales y secreción de la toxina madura (Conticello *et al.*, 2003). Las variaciones existentes entre cada miembro de las superfamilias ocurren con una frecuencia mayor en la región

carboxilo terminal del precursor, es decir, en el péptido maduro (Figura 9) (West *et al.* 2002); esta región, puede adoptar muchas formas, debido al reemplazo, supresiones o adiciones de aminoácidos, los cuales generan su hipervariabilidad (Figura 9).

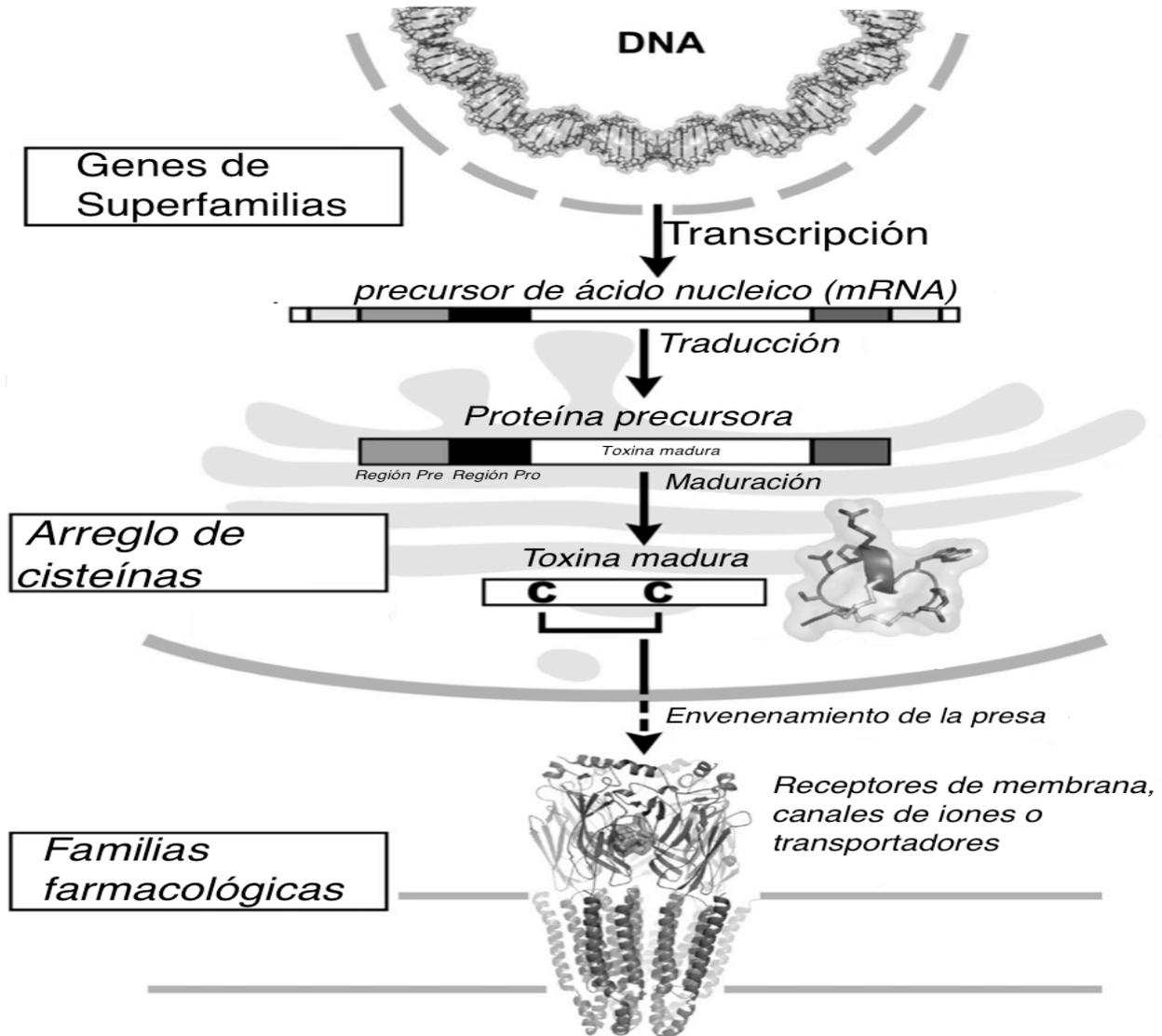


Figura 9. Esquema de la síntesis, maduración y clasificación de conopéptidos. Modificado de Kaas *et al.*, 2010.

4.2.4 Modificaciones post traduccionales.

El péptido señal, el cual está altamente conservado entre los miembros de una misma superfamilia, determina el destino del precursor a su compartimiento celular específico para su modificación post-traduccional particular. Generalmente se supone que las modificaciones post traduccionales mejoran la eficiencia funcional y/o especificidad de

los conopéptidos en los que se encuentran. Una función alternativa que se debe considerar es que estas modificaciones pueden facilitar el correcto plegamiento del péptido, sobre todo si la modificación ocurre de manera previa al proceso de secreción (Lirazan *et al.*, 2000).

La distribución de las modificaciones post traduccionales encontradas en diferentes grupos de péptidos de *Conus* generalmente no es uniforme. Mientras que algunos grupos de péptidos prácticamente tienden a no tener modificaciones post traduccionales (exceptuando el procesamiento proteolítico y la formación de enlaces disulfuro), otros son modificados de forma considerable como es el caso del péptido tx5a (13 aminoácidos) en el cual se han identificado las siguientes modificaciones: γ -carboxilación, bromación del triptófano, O-glicosilación de treonina e hidroxilación de prolina (Walker *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004).

Para que se lleven a cabo las modificaciones post traduccionales se necesita que enzimas específicas sean reclutadas sobre una secuencia de reconocimiento. Una vez unida a dicha secuencia, la enzima modificará un aminoácido específico en la región de la toxina madura. Muchas de las enzimas necesarias en la modificación post-traduccional no han sido del todo caracterizadas. Un mecanismo que se ha sugerido para elucidar el sistema de modificación post-traduccional en los *Conus* es el de la enzima γ -glutamil carboxilasa, la cual requiere CO_2 , O_2 y vitamina K reducida. Este sistema se descubrió originalmente en la cascada de coagulación sanguínea de mamíferos, en donde ciertos factores de coagulación, como la protrombina y el Factor IX deben tener residuos de glutamato γ -carboxilados para la regulación adecuada de la coagulación (Aktimur *et al.*, 2003; Schmidt y Bajaj, 2003). El descubrimiento del γ -carboxiglutamato en péptidos de *Conus* fue completamente inesperado; en ese momento se pensaba que era una adaptación especializada, restringida al sistema de coagulación sanguínea de mamíferos. La caracterización de la γ -glutamil carboxilasa de *Conus*, así como el análisis del gen que codifica dicha enzima, reveló que tanto la enzima de *Conus* como la de mamíferos no solo son homólogas, sino que el gen que codifica la enzima γ -glutamil carboxilasa de *Conus* tiene todos los intrones encontrados en el gen de humano exactamente en los mismos loci (McIntosh *et al.*, 1984). La

conservación notable de la localización de los intrones no deja duda que estas enzimas deben tener un origen en común.

Otra característica notable de este sistema es que la secuencia señal de reconocimiento de la γ -glutamil carboxilasa está presente en la región del propéptido de todos los precursores de conotoxinas que son sustratos para la γ -carboxilación (Craig *et al.*, 1999). De ahí se infiere que la región “pro” juega un papel importante en la modificación postraducciona l y en el proceso de secreción de la toxina madura (Conticello *et al.*, 2003). No obstante, existen excepciones, como es el caso de las conotoxinas pertenecientes a la superfamilia I2, las cuales carecen de la región del propéptido entre la secuencia señal y la toxina madura (Buczek *et al.*, 2005). Es sabido que los *Conus* expresan enzimas de modificación postraducciona l en sus conductos venenosos (Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Stanley *et al.*, 1997); estas enzimas reconocen la región “pro” del precursor. La presencia de tal señal en el péptido precursor recluta a la enzima postraducciona l correspondiente e induce la modificación de los residuos de aminoácidos específicos en la región de la toxina madura (Hooper *et al.*, 2000). La escisión proteolítica del precursor para generar la toxina funcional es un paso obligatorio en la maduración de todos los péptidos de *Conus*.

4.2.5 Nomenclatura de las conotoxinas.

El nombre final de una conotoxina cuyo mecanismo de acción ha sido caracterizado consiste de una letra griega para distinguir su acción farmacológica, seguido por un guión antes de la palabra conotoxina, seguido por la primera letra (o las dos primeras) del nombre científico de la especie de *Conus* del cual se obtuvo el veneno, un número romano que indica el arreglo de cisteínas del péptido y una letra mayúscula que indica una variante específica del péptido. Por ejemplo, la ω -conotoxina GVIA es un péptido de *C. geographus* que bloquea canales de calcio dependientes de voltaje y tiene un arreglo VI de cisteínas; la δ -conotoxina TxVIA es un péptido de *C. textile* que retrasa la inactivación de canales de sodio y tiene un arreglo de cisteínas de clase VI.

El nombre de un péptido de mecanismo de acción desconocido carece de letra griega y solo consiste del código de especie con letras minúsculas, un número arábigo para

designar el arreglo de cisteínas y una letra minúscula que indica una variante particular, por ejemplo, tx5a. El correspondiente clon codificante de tx5a se designa como Tx5.2, con el nombre de las especies comenzando con una letra mayúscula seguido por un número arábigo que designa al arreglo de cisteínas y el número después del punto designa la variante del clon (por ejemplo, Tx5.1 fue el primer clon en ser caracterizado, a partir de *Conus textile*, que codificaba un péptido con un arreglo 5 de cisteínas). Así, si el péptido resultara tener un nuevo modo de acción, su nombre final podría ser τ -conotoxina TxVA.

Los arreglos de cisteínas específicos se designan por números y los modos de acción se indican por letras griegas.

Para péptidos con el mismo modo de acción pero diferente arreglo de cisteínas se agrega una letra mayúscula (correspondiente a la superfamilia) después de la letra griega. Los péptidos con el mismo arreglo y modo de acción se diferencian por letras mayúsculas.

Las familias que presentan 1 o ningún enlace disulfuro son menos diversas y se encuentran en menos especies. A estos conopéptidos se les da un nombre, seguido por una o dos letras del código de especie (por ejemplo, conopresina-S, contrifano-R, y contulakina-G de *C. striatus*, *C. radiatus* y *C. geographus*, respectivamente). Los polipéptidos grandes (>70 aminoácidos) se designan de manera similar. Ejemplo: conodipina-M.

4.3 *Conus nux*

Estos caracoles como fueron descritos por primera vez en 1833 por William Broderip. Son los caracoles como más pequeños y posiblemente los más comunes de la región este del Océano Pacífico. Presenta bandas cafés-rojizas arregladas de manera indistinta, una mancha púrpura en la punta anterior y en la apertura tiene comúnmente dos bandas púrpura en un fondo blanco. La ornamentación presenta espiras débiles. El pie del animal es rosa, y la concha tiene una longitud promedio de 22 mm y un diámetro

promedio de 14 mm. Se localiza desde Baja California hasta el sur del Ecuador (Keen, 1971).



Figura 10. *Conus nux*. El panel de la izquierda muestra tres imágenes del caracol marino *Conus nux* mostrando la concha, la apertura y la ornamentación. El panel de la derecha presenta la foto de un caracol marino *Conus nux* donde se muestra el pie del caracol y la probóscide; la barra de calibración es de 5 mm.

En el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla, se han estudiado las toxinas de diversas especies de conos de aguas mexicanas. Se han realizado estudios biogeográficos, morfológicos, histológicos y toxicológicos (Aguilar *et al.*, 2005a, b; Aguilar *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2009; López-Vera *et al.*, 2007a; Luna-Ramírez *et al.*, 2007; Maillo *et al.*, 2002; Zugasti-Cruz *et al.*, 2006; Zugasti-Cruz *et al.*, 2008), enfocando estos últimos a la purificación, caracterización bioquímica, y comparación de los compuestos peptídicos aislados de los venenos a través de diversas técnicas bioquímicas, o identificados mediante métodos de biología molecular (Zamora-Bustillos *et al.*, 2009; Zamora-Bustillos *et al.*, 2010).

5 Justificación

El estudio de compuestos naturales con importancia biológica aislados de organismos marinos ha resultado de gran interés por ser fármacos potenciales; un claro ejemplo son los caracoles del género *Conus*. Estos gasterópodos son especialistas en

neurofarmacología, debido a una especialización evolutiva, la cual es resultado de hipermutación en la región final del precursor del conopéptido, la toxina madura. Esto ha dado como resultado que tengan un gran repertorio de toxinas, cuyos blancos moleculares son diferentes receptores, transportadores y canales iónicos dependientes de voltaje, las cuales pueden usarse para el desarrollo de fármacos cada vez más selectivos, o para la investigación (Terlau y Olivera, 2004). Algunas conotoxinas, por su alta especificidad, son usadas en investigaciones para el tratamiento contra el dolor neuropático, epilepsia, enfermedades cardiovasculares y psiquiátricas, y desórdenes motores, entre otras (McIntosh y Jones, 2001). De las más de 500 especies de caracoles cono existentes en el mundo, las toxinas de las superfamilias A y T han sido encontradas en especies de todos los tipos de alimentación en todas las provincias marinas, excepto la sudafricana (ConoServer, 2011). Sin embargo, los venenos de los conos presentes en los océanos americanos han sido poco estudiados, especialmente los de las especies habitantes de los mares del Pacífico mexicano. El presente trabajo tiene como propósito demostrar que *Conus nux*, especie del Pacífico mexicano, expresa genes de péptidos de las superfamilias A y T.

6 Hipótesis

En el conducto venenoso de la especie vermívora del Pacífico mexicano *Conus nux* se expresan toxinas pertenecientes a las superfamilias A y T, cuyos genes tienen secuencias conservadas con respecto a los genes de estas superfamilias que se expresan en especies vermívoras de otras provincias marinas.

7 Objetivo General

Identificación y determinación de la secuencia de las conotoxinas de las superfamilias A y T de *Conus nux*, a partir de ADNc.

7.1 Objetivos Particulares

- Obtener ADNc total de *Conus nux*.

- Diseñar oligonucleótidos y estandarizar condiciones para amplificar diferentes productos de PCR.
- Obtener y analizar las secuencias de los productos.

8 Material y Métodos

8.1 Material biológico

Seis especímenes de *Conus nux*, tres colectados en las playas de Jalisco y Nayarit en el año del 2008 y tres colectados en las playas de Cuastecomate y Tenacatita, en las costas de Jalisco, en el 2010. Para los caracoles colectados durante el 2008, el conducto venenoso se disecó del caracol vivo e inmediatamente después se colocó en RNAlater (Qiagen, Hilden, Alemania) y se incubó durante toda la noche a 6 °C con el reactivo para posteriormente ser almacenado a -70 °C. Para los caracoles del 2010, el conducto venenoso se disecó del caracol vivo e inmediatamente después se colocó en el amortiguador de extracción del kit SV Total ARN Isolation System (Promega, Madison, WI), se homogenizó y se almacenó a -70 °C hasta el día de su uso.

8.2 Extracción de ARN total

El ARN fue extraído con el kit SV Total ARN Isolation System (Promega), siguiendo el protocolo del proveedor.

8.3 Clonación y purificación de ADNc

Para la síntesis de ADNc, se utilizaron 200 ng del ARN total extraído del ducto venenoso de *C. nux*, siguiendo el protocolo estandarizado del kit Clontech's SMART ADNc síntesis (Clontech, Mountain View, CA). Se sintetizaron dos grupos de ADNc; para el grupo 1 se utilizó el iniciador CDS III/3' (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGCCGACATG(dT)₃₀VN-3') y para el grupo 2 se usaron los iniciadores CDS III/3' y SMART IV (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'). El ADNc resultante sirvió como plantilla para la amplificación por medio de la técnica de reacción en cadena

de la polimerasa (PCR). La PCR para buscar las familias de conotoxinas se realizó bajo condiciones ya estandarizadas; se utilizó un volumen total de 50 μ L: 2 μ L de ADNc, 1x de “green Reaction Buffer”, 2 mM MgCl₂, 0.2 μ M de cada iniciador, 0.24 mM de la mezcla de dNTP, y 0.04 U de “GoTaq® ADN Polymerase” (Promega). Las amplificaciones se desarrollaron en un termociclador programado por 3 minutos a 95°C para una desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto 55-68°C (dependiendo de la TM de los oligonucleótidos utilizados), 1 minuto a 72°C, y 7 minutos de extensión final a 72°C.

Los oligonucleótidos usados para la superfamilia A son:

Nombre	Secuencia
SFAF	5' -TCTGCGAATGGGCATGCGGATGATGTT-3'
SFAR	5' -TGCTCCAACGTCGTGGTTCAGAGGGTC-3'
adCDS	5' -ATTCTAGAGGCCGAGGCGGC-3'
5' PCR	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

Para la superfamilia T se usaron los siguientes oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia
SFT _{MRCL} F	5' -GAARCTGACWMCARGCAGAAT-3'
SFT _{MLCL} F	5' -GMTACGTGGCACTTTGCAGTGTG-3'
SFT _{MRCL} R	5' -GCCATGCAAGTCTTTATTAGTCGAT-3'
SFT _{MLCL} R	5' -CCACACGAGYATGTGCARAAG-3'
adCDS	5' -ATTCTAGAGGCCGAGGCGGC-3'
5' PCR	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (Promega) al 1.0 %. La purificación del ADNc se realizó siguiendo el protocolo estandarizado del PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

8.4 Ligación del plásmido y transformación de células competentes

El producto purificado de la reacción de PCR se ligó al vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor; la transformación de células competentes (*E. coli* XL1-Blue) se realizó a través de choque térmico bajo el protocolo estandarizado de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Las bacterias obtenidas se sembraron en agar LB con ampicilina 100 μ g/mL, X-gal e IPTG. Las colonias de las bacterias transformantes se observaron de

color blanco; esto es porque no expresan el gen que codifica la β -galactosidasa y por ende no pueden degradar el X-gal. Se seleccionaron de manera aleatoria colonias blancas y se dejaron crecer durante 12 h a 37 °C en medio de cultivo LB con ampicilina 100 μ g/mL. Posteriormente, mediante el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System (Promega), se obtuvo el vector de clonación el cual se usó para secuenciación.

8.5 Diseño de oligonucleótidos para las superfamilias A y T.

Para el diseño de los oligonucleótidos se siguieron las reglas establecidas; se tomaron las secuencias conservadas de los péptidos señal de las superfamilias A y T presentes en otras especies de conos registradas en la página de “ConoServer” (ConoServer, 2010). Los oligonucleótidos iniciadores se nombraron SFAF y SFAR, para la superfamilia A, y SFTF y SFTR, para la superfamilia T. También se revisó las regiones no traducidas de los genes (UTR’s) en busca de regiones conservadas. La alineación para diseñar los oligonucleótidos se realizó en el servidor EMBL-EBI, mediante el programa ClustalW2 (Figura 9).

8.6 Secuenciación de muestras

Las muestras se enviaron a secuenciar a la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla y al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en el CINVESTAV campus Irapuato; las muestras se enviaron conforme las especificaciones de cada lugar.

8.7 Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante los siguientes programas: los electroferogramas se analizaron con el programa FinchTV, de distribución gratuita, en la página de geospiza; los alineamientos de las secuencias se realizaron con el programa ClustalW2, disponible en línea, en la página de EMBL-EBI; la predicción de los cortes del prepro péptido y sus posibles modificaciones post traduccionales se realizaron con el programa Propeptide analysis, disponible en línea en la página de “ConoServer”; y los árboles filogenéticos se realizarán mediante el programa MEGA 5

de distribución gratuita, en la página de MEGA; las secuencias para realizar las comparaciones se obtendrán de la base de datos del “ConoServer”.

9 Resultados

9.1 Diseño de oligonucleótidos para la superfamilia A

Se tomaron todas las secuencias (200 secuencias) de toxinas de la superfamilia A, reportadas en la página “ConoServer”, se dividieron de acuerdo a su alimentación principal (piscívoros, vermívoros y molusquívoros), y se alinearon mediante el programa ClustalW2. Se analizaron las secuencias para encontrar zonas altamente conservadas en las regiones del péptido señal y no traducidas (UTR’s); se tomaron 2 secuencias muy conservadas para diseñar estos oligonucleótidos (una en cada región: péptido señal y 3’-UTR). Al comparar los oligonucleótidos diseñados con los oligonucleótidos existentes en el laboratorio, se encontró mucha similitud entre los oligonucleótidos, por lo que se utilizaron los oligonucleótidos ya existentes.

9.2 Diseño de oligonucleótidos para la superfamilia T

Se tomaron todas las secuencias (86 secuencias) de toxinas de la superfamilia T reportadas en la página “ConoServer”, se alinearon mediante el programa ClustalW2 y se descartaron secuencias que presentaban deleciones o inserciones de nucleótidos. Se identificaron dos ramas filogenéticas en las toxinas de esta superfamilia denominadas toxinas MLCL y MRCL, se separaron ambas ramas y se analizaron las UTR’s 5’ y 3’; posteriormente se diseñaron oligonucleótidos para cada una de estas ramas; los oligonucleótidos de la rama MRCL, eran muy similares a los que se tenían en el laboratorio por ello solo se mandaron a sintetizar los de la rama MLCL, a los cuales se les nombró SFT_{MLCLF}, y SFT_{MLCLR}.

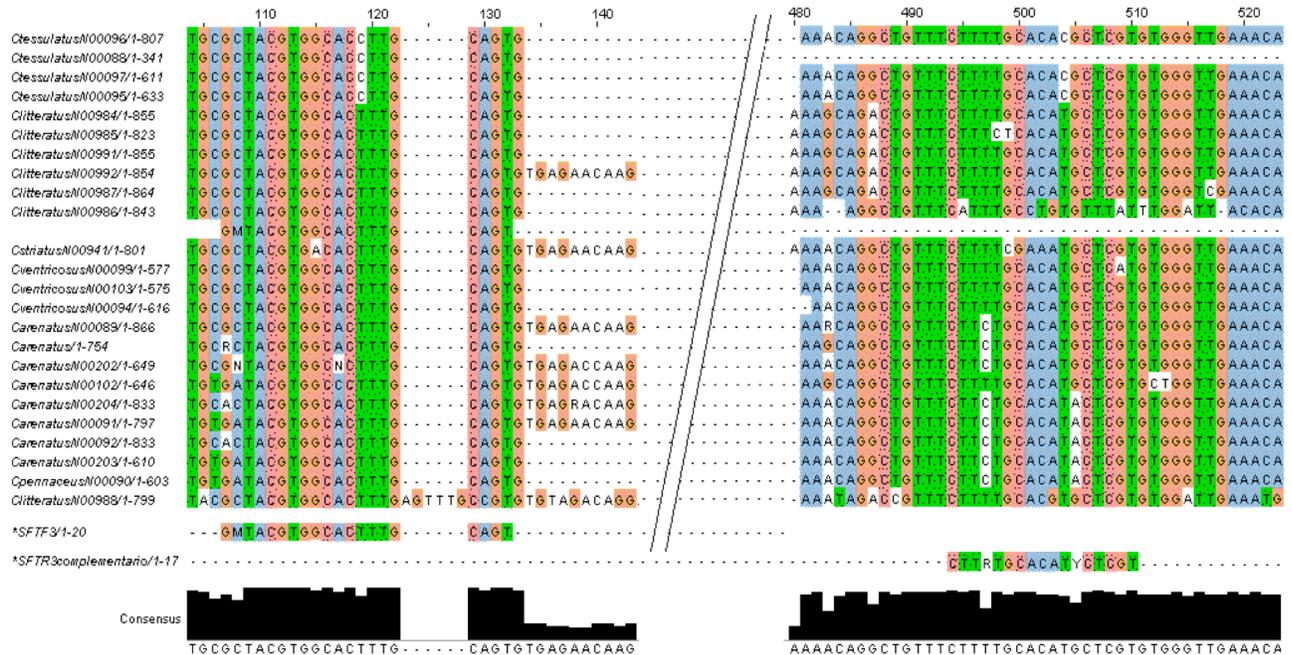


Figura 11 Ejemplo de alineación de nucleótidos de conotoxinas de la superfamilia T para el diseño de los oligonucleótidos SFT_{MLCL}F, y SFT_{MLCL}R

Los oligonucleótidos de la rama MLCL se sintetizaron por Sigma-Aldrich.

Oligonucleótidos de la superfamilia T diseñados:

SFT_{MLCL}F.-GMTACGTGGCACTTTGCAGTGTG

SFT_{MLCL}R.- CCACACGAGYATGTGCARAAG

9.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se extrajo el ARN total del conducto venenoso con el kit SV Total ARN Isolation System, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % con amortiguador TAE y otro con TBE para observar la integridad del ARN y saber si existen diferencias entre estos dos amortiguadores (Figura 12).

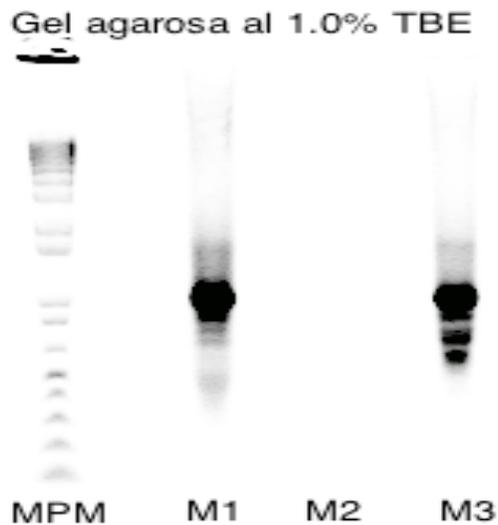


Figura 12. Electroforesis de ARN_{total} . Gel de agarosa al 1.0%; el gel se realizó con amortiguador TBE. Las muestras son de *C. nux* colectados en costas de Jalisco y Nayarit durante el 2008.

La figura 12 muestra, el ARN total obtenido, el cual, se utilizó de molde para la síntesis de ADN codificante (ADNc) mediante la técnica de transcripción reversa-PCR (RT-PCR). La técnica de RT-PCR se realizó con el oligonucleótido CDS III/3', para colocar un adaptador en la región 3' posterior a la cola de poliadeninas (grupo 1) y otra con los oligonucleótidos CDS III/3' y SMART IV, para colocar dos adaptadores uno en la región 3' y otro en la región 5' (grupo 2). El ADNc del grupo 2 cual se utilizó posteriormente para hacer una PCR de larga distancia (LD-PCR) para enriquecer el ADNc.

9.4 Superfamilia A

Se utilizaron tres combinaciones de oligonucleótidos de la superfamilia A (SFAF-adCDS, 5' PCR-SFAR y SFAF-SFAR). En el análisis de la PCR realizada con los pares de oligonucleótidos SFAF-adCDS (Figura 13A), 5' PCR-SFAR (Figura 13B) y SFAF-SFAR (Figura 13C) se observa en el primer carril los marcadores de peso molecular, en el segundo carril una muestra de ADN de abeja, como control negativo, y en los siguientes tres carriles los productos de PCR de diferentes tamaños.

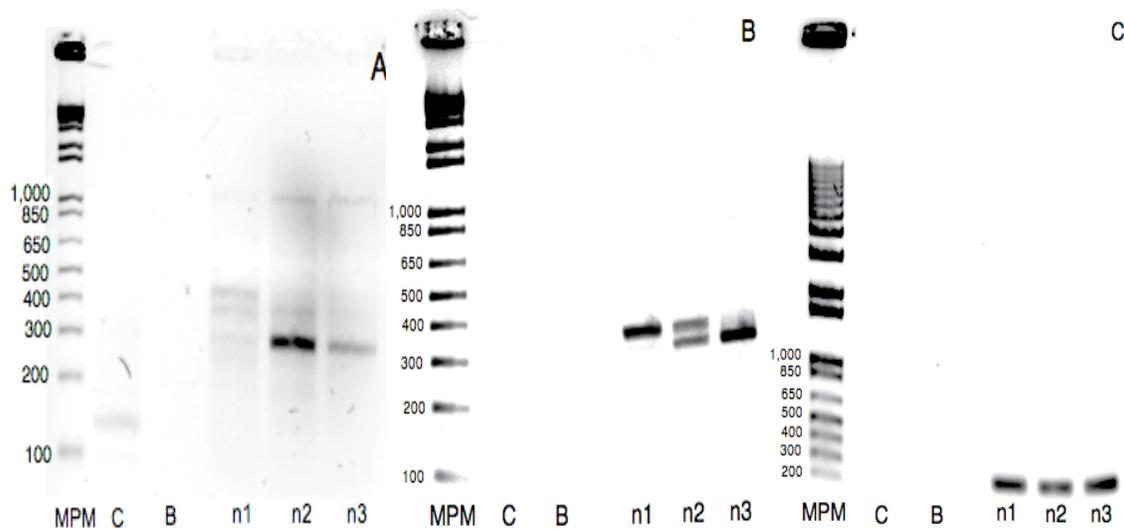


Figura 13. Electroforesis de productos de PCR con oligonucleótidos para la superfamilia A. Gel de agarosa de bajo peso molecular al 1.6%. En el panel A se muestra la PCR de los oligonucleótidos SFAP-adCDS. En el panel B se observa la PCR de los oligonucleótidos 5' PCR-SFAR. En el panel C se muestra la PCR de los oligonucleótidos SFAP-SFAR. MPM (Marcador de pesos moleculares, pb), C (Control abeja), B (Blanco) n1-3 (Ejemplar de *C. nux*).

Las bandas se purificaron para ser clonadas en el vector pGEM-T Easy vector; todas las muestras de PCR se ligaron en una proporción 3:1 ligando:vector y se transformaron células competentes de *E. coli* XL1-Blue a través de choque térmico; los plásmidos de las colonias fueron extraídos y purificados mediante el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System; las muestras que cumplían con las especificaciones de concentración y pureza se enviaron a secuenciar.

De las muestras secuenciadas, se identificaron cinco conotoxinas, una conotoxina con un arreglo $\alpha 4/4$ a la cual se le nombró Nu1.1 (Figura 14) y cuatro conotoxinas con arreglo $\alpha 4/5$, las cuales se nombraron Nu1.2, Nu1.3, Nu1.4 y Nu1.5 (Figura 14).

Las secuencias se analizaron mediante el programa Propeptide Analysis, disponible en la página del “ConoServer”, el cual predice el péptido señal mediante el programa SignalP (etapa 1) con el uso de la secuencia consenso de la peptidasa del péptido señal (SPP por sus siglas en inglés “*Signal Peptide Peptidase*”), así como los posibles cortes de la región “pro” (etapa 2) con la Convertasa de Proproteínas (PPC por sus siglas en inglés “*ProProtein Convertases*”) o con alguna endopeptidasa desconocida, ya que en caracoles como se han encontrado secuencias muy conservadas de corte pero aún no se han identificado estas enzimas, excepto la endopeptidasa Tex-31, la cual es

la única enzima exclusiva de *Conus* identificada (Milne *et al.*, 2003). El programa también predice si existen modificaciones después del corte del péptido con las enzimas carboxipeptidasa E (CPE; etapa 3) y la peptidilglicina monooxigenasa α -amidación (PAM por sus siglas en inglés “*Peptidylglycine α -amidating monooxygenase*”; etapa 4).

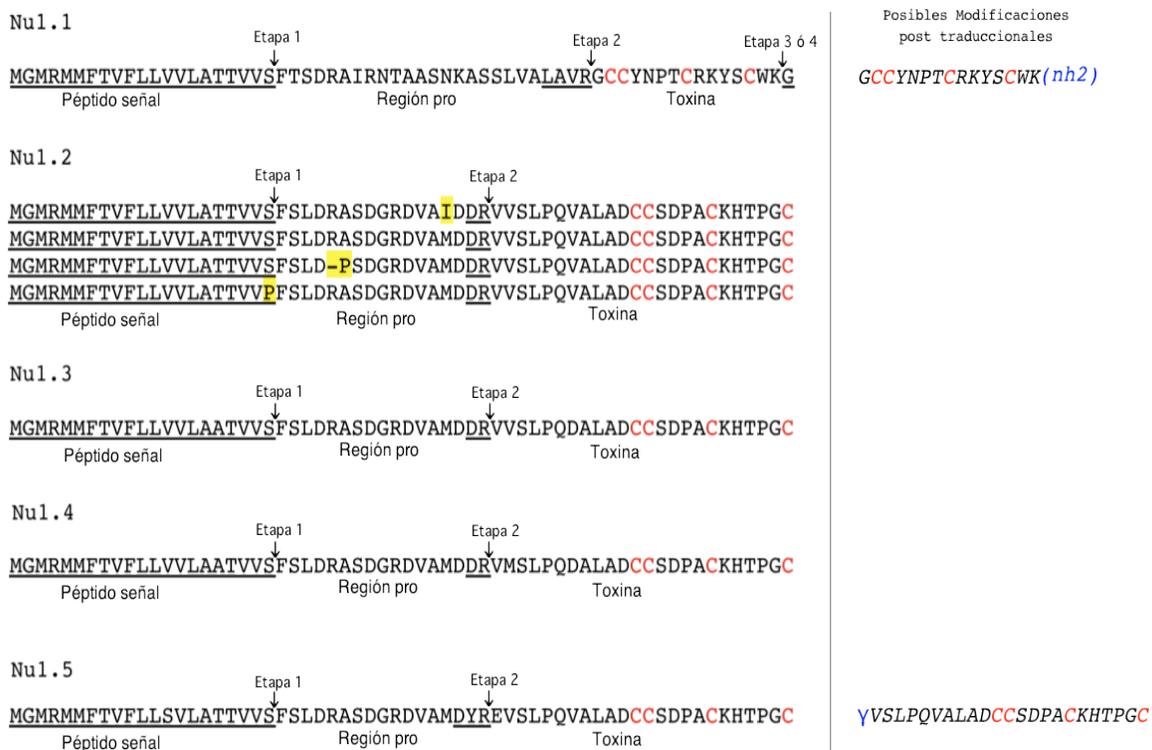


Figura 14. Secuencias de las conotoxinas de la Superfamilia A encontradas en el caracol *C. nux*. Las flechas indican los puntos de corte de diferentes enzimas; Etapa 1: SPP; Etapa 2: PPC o peptidasa desconocida; Etapa 3: CPE; Etapa 4: PAM. En amarillo se muestran las diferencias entre precursores, en letras rojas se muestran las cisteínas, en letras azules las posibles modificaciones post traduccionales. Las etapas y modificaciones post traduccionales fueron predichas mediante el programa Propeptide analysis, disponible en la página del “ConoServer”.

La conotoxina Nu1.2 presenta cuatro precursores con diferencia en no más de dos aminoácidos en la región “pro” o péptido señal. Las conotoxinas Nu1.2 a Nu1.5 presentan diferencia en un solo aminoácido; sin embargo presentan más diferencias en su secuencia de nucleótidos (Figura 15).

```

Nu1.3      GAATTCGATTAAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGGGATAGTACAAGACACGCAGA 56
Nu1.4      GAATTCGATTAAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAGGGATAGTACAAGACACGCAGA 56
Nu1.2Prec1 GAATTCGATT----- 10
Nu1.2Prec2 GAATTCGATT----- 10
Nu1.2Prec3 GAATTCGATT----- 10
Nu1.2Prec4 GAATTCGATT----- 10
Nu1.5      GAATTCATT----- 10
          ***** **

          1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Nu1.3      ACAAGGAAGCAAAAAGTCTGAGAAATTAACCATGGGTATGCGGATGATGTTACCCTGATT 116
Nu1.4      ACAAGGAAGCAAAAAGTCTGAGAAATTAACCATGGGTATGCGGATGATGTTACCCTGATT 116
Nu1.2Prec1 -----TCTGCG-----AATGGGCATGCGGATGATGTTACCCTGATT 46
Nu1.2Prec2 -----TCTGCG-----AATGGGCATGCGGATGATGTTACCCTGATT 46
Nu1.2Prec3 -----TCTGCG-----AATGGGCATGCGGATGATGTTACCCTGATT 46
Nu1.2Prec4 -----TCTGCG-----AATGGGCATGCGGATGATGTTACCCTGATT 46
Nu1.5      -----TCTGCG-----AATGGGCATGCGGATGATGTTACCCTGATT 46
          ****.* .*****

          11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Nu1.3      TCTGTTGGTTGTCTTGGCAGCCACCGTCGTTTCCTTCTCATTAGATCGTGCATCTGATGG 176
Nu1.4      TCTGTTGGTTGTCTTGGCAGCCACCGTCGTTTCCTTCTCATTAGATCGTGCATCTGATGG 176
Nu1.2Prec1 TCTGTTGGTTGTCTTGGCAACCACCGTCGTTTCCTTCTCATTAGATCGTGCATCTGATGG 106
Nu1.2Prec2 TCTGTTGGTTGTCTTGGCAACCACCGTCGTTTCCTTCTCATTAGATCGTGCATCTGATGG 103
Nu1.2Prec3 TCTGTTGGTTGTCTTGGCAACCACCGTCGTTTCCTTCTCATTAGATCGTGCATCTGATGG 106
Nu1.2Prec4 TCTGTTGGTTGTCTTGGCAACCACCGTCGTTTCCTTCTCATTAGATCGTGCATCTGATGG 106
Nu1.5      TCTGTTGAGTGTCTTGGCAACCACCGTCGTTTCCTTCTCATTAGATCGTGCATCTGATGG 106
          *****

          31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
Nu1.3      CAGGGATGTCGCAATGGACGACAGAGTGGTGTCTCTCCCTCAGGACCGCCCTTGCTGATTG 236
Nu1.4      CAGGGATGTCGCAATGGACGACAGAGTGGTGTCTCTCCCTCAGGACCGCCCTTGCTGATTG 236
Nu1.2Prec1 CAGGGATGTCGCAATCGACGACAGAGTGGTGTCTCTCCCTCAGGTCGCCCTTGCTGATTG 166
Nu1.2Prec2 CAGGGATGTCGCAATGGACGACAGAGTGGTGTCTCTCCCTCAGGTCGCCCTTGCTGATTG 163
Nu1.2Prec3 CAGGGATGTCGCAATGGACGACAGAGTGGTGTCTCTCCCTCAGGTCGCCCTTGCTGATTG 166
Nu1.2Prec4 CAGGGATGTCGCAATGGACGACAGAGTGGTGTCTCTCCCTCAGGTCGCCCTTGCTGATTG 166
Nu1.5      CAGGGATGTCGCAATGGACTACAGAGAGGTGTCTCTCCCTCAGGTCGCCCTTGCTGATTG 166
          *****

          51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63
Nu1.3      CTGTTCCGATCCTGCCTGTAAACACACGCCCGGTTGTGATCTTTGTTTTAAAGACGCT 300
Nu1.4      CTGTTCCGATCCTGCCTGTAAACACACGCCCGGTTGTGATCTTTGTTTTAAAGACGCT 300
Nu1.2Prec1 CTGTTCCGATCCTGCCTGTAAACACACGCCCGGTTGTGATCTTTGTTTTAAAGACGCT 226
Nu1.2Prec2 CTGTTCCGATCCTGCCTGTAAACACACGCCCGGTTGTGATCTTTGTTTTAAAGACGCT 223
Nu1.2Prec3 CTGTTCCGATCCTGCCTGTAAACACACGCCCGGTTGTGATTTTTTTTTAAAGACGCT 226
Nu1.2Prec4 CTGTTCCGATCCTGCCTGTAAACACACGCCCGGTTGTGATCTTTGTTTTAAAGACGCT 226
Nu1.5      CTGTTCCGATCCTGCCTGTAAACACACGCCCGGTTGTGATCTTTGTTTTAAAGACGCT 230
          *****

Nu1.3      GCTGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGACG----- 329
Nu1.4      GCTGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGACG----- 329
Nu1.2Prec1 GCTGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGACG----- 255
Nu1.2Prec2 GCTGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGACG----- 252
Nu1.2Prec3 GCTGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGACG----- 255
Nu1.2Prec4 GCTGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGACG----- 255
Nu1.5      GCTGCTCCAGGACCCTCTGAACCACGACGTATCGCCCTCTGCCTGACCTGCTTCACTTTC 290
          *****

Nu1.3      -----
Nu1.4      -----
Nu1.2Prec1 -----
Nu1.2Prec2 -----
Nu1.2Prec3 -----
Nu1.2Prec4 -----
Nu1.5      CGTCTCTTTGTACCACTAGAACTGAACAACCCGATCCACTGGACTCCCWCGTTACCTCTG 350

Nu1.3      -----TTGGAGCAAATCACTAGT 347
Nu1.4      -----TTGGAGCAAATCACTAGT 347
Nu1.2Prec1 -----TTGGAACAATCACTAGT 273
Nu1.2Prec2 -----TTGGAGCAAATCACTAGT 270
Nu1.2Prec3 -----TTGGAGCAAATCACTAGT 273
Nu1.2Prec4 -----TTGGAGCAAATCACTAGT 273
Nu1.5      TACTCTGAAACTATTCTTCTGTTTGTCTCTTCTGTTTGTCTCTTCTGTTTCTCTAGT 393

```

Figura 15. Alineación de las secuencias de nucleótidos de las conotoxinas Nu1.2 a Nu1.5. En turquesa, se muestra el sitio de clonación múltiple del vector, en magenta se muestran los codones de inicio y de paro, en amarillo se muestran los sitios en donde se presentan cambios de nucleótidos y los números localizados por encima de los nucleótidos indican el inicio y número de codón, los asteriscos (*) indican que no existe diferencia entre las secuencias, los dos puntos (:) indican que el cambio es conservativo y el punto (.) indica que el cambio es menos conservativo.

Se realizaron dos árboles filogenéticos, usando las secuencias reportadas en la página del “ConoServer” y las secuencias obtenidas en este trabajo, uno de precursores completos (Figura 16A) y otro de toxinas (Figura 16B).

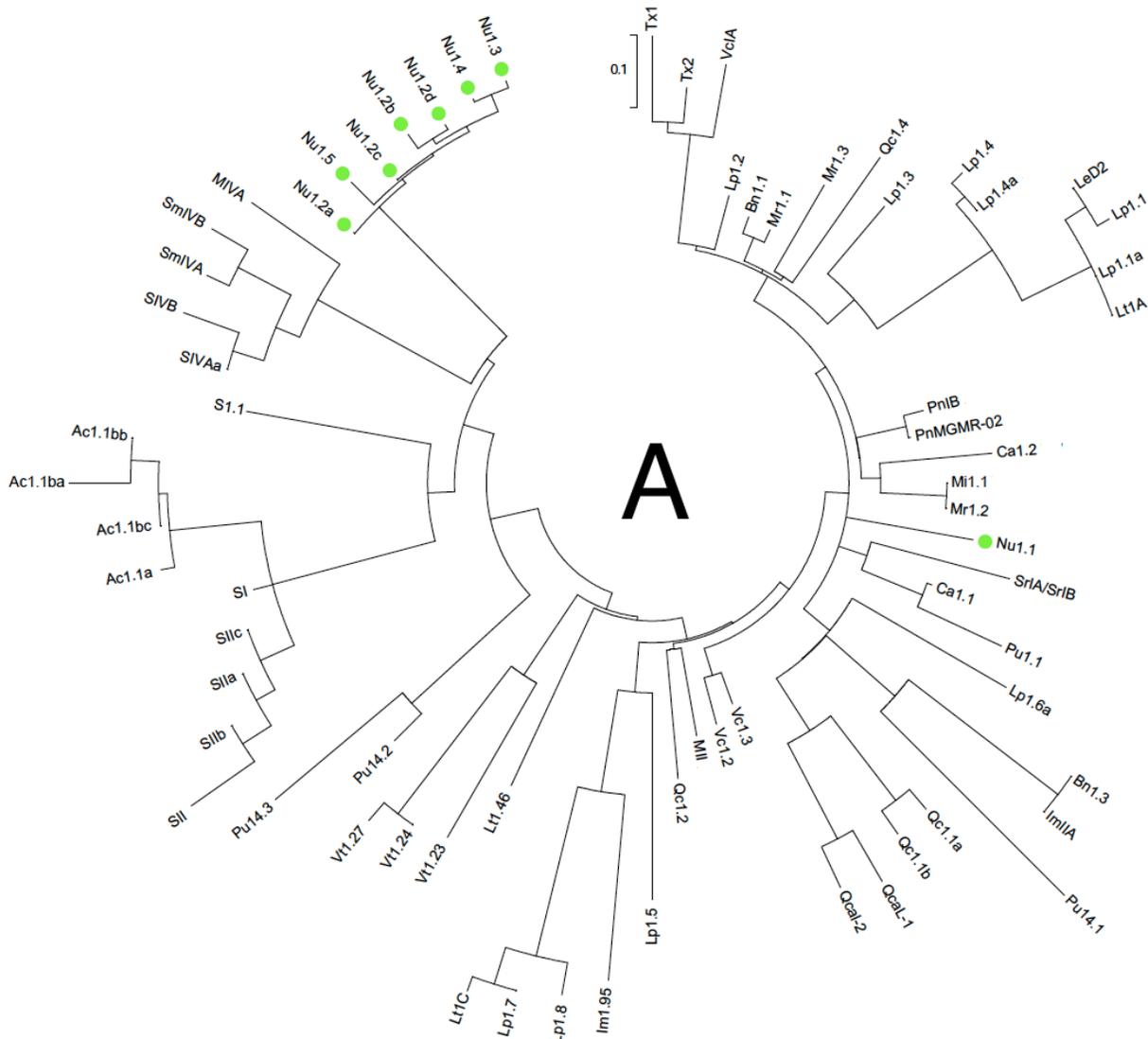


Figura 16. Árboles filogenéticos de la superfamilia A. En el panel A se muestra el árbol del precursor completo (prepro péptido) y en el panel B se muestra el árbol de las toxinas maduras. Los puntos verdes indican las conotoxinas encontradas en el *C. nux*. La nomenclatura de los precursores de la conotoxina Nu1.2 se modificaron con respecto a la nomenclatura de la figura 15; el precursor 1 (Nu1.2prec1) se le designó el la letra a (Nu1.2a) y así sucesivamente.

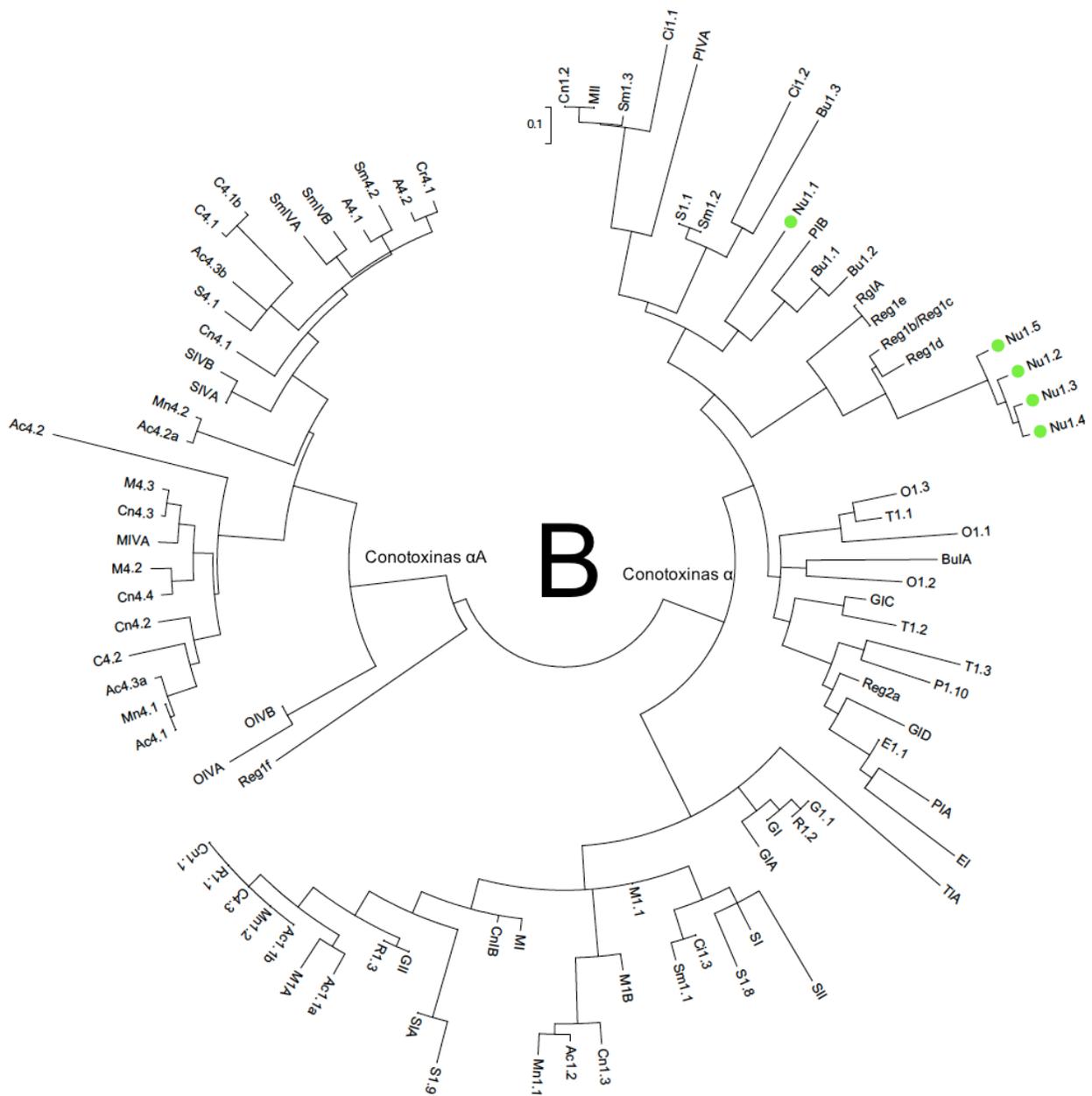


Figura 16 (continuación).

9.5 Superfamilia T

Se utilizaron dos grupos de ADNc, uno enriquecido a través de un LD-PCR (grupo 2) y otro sin enriquecimiento (grupo 1). Por otra parte, en cada grupo se utilizaron los oligonucleótidos de la rama filogenética MLCL y los oligonucleótidos de la rama filogenética MRCL; se realizaron cinco combinaciones de oligonucleótidos para cada rama filogenética de la superfamilia T, tres combinaciones para el grupo 2 (SFTF-

adCDS, 5' PCR-SFTR y SFTF-SFTR) y dos para el grupo 1 (SFTF-adCDS y SFTF-SFTR).

A partir de las PCR con los grupos 1 (Figura 17A) y 2 (Figura 17B y Figura 17C) se obtuvieron bandas de diferentes tamaños, las cuales se purificaron, se clonaron y secuenciaron para realizar su análisis.

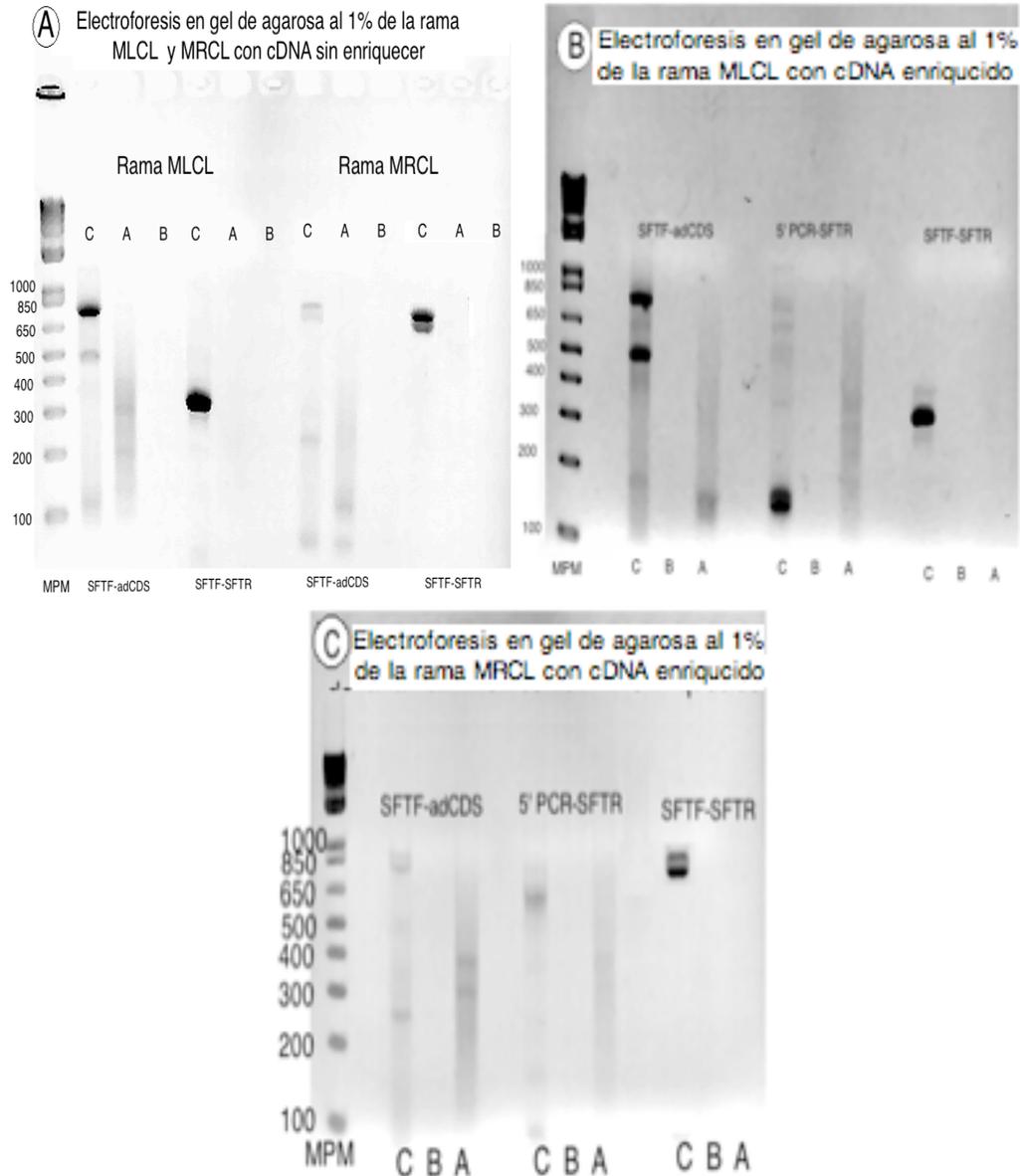


Figura 17. Electroforesis de productos de PCR con oligonucleótidos para la superfamilia T. Gel de agarosa 1.0%. En el panel A se muestra la PCR de los oligonucleótidos SFTF-adCDS y SFTF-SFTR de las ramas MLCL y MRCL del grupo 1. En el panel B y C se observan las PCR con los tres juegos de oligonucleótidos, con ADNc del grupo 2, de las ramas MLCL y MRCL, respectivamente. MPC (Marcador de pesos moleculares pb), A (Control abeja), B (Blanco) C (Ejemplar de *C. nux*)


```

Nu5.1      GCGGGAATTCGATTGATACGTGGCACTTT-GCAGTGTG--AGAACAAGAA-TCTGACTAC 56
Nu5.3      GCGGGAATTCGATTGATACGTGGCACTTT-GCAGTGTG--AGAACAAGAA-TCTGACTAC 56
Nu5.2      GCGGGAATTCGATTGCTACGTGGCACTTTGCAGKGGGGGAAAAACAAAATTCGACTAC 60
*****.***** ***. * * *.*****.** *****

          1  2  3  4  5  6  7  8  9  10 11 12 13 14 15 16 17 18
Nu5.1      AAGCACAATGCTGTGTCTTCCGATCTTCATCCTCCTCCTTCTGTTGGCTTCACCTGCAGC 116
Nu5.3      AAGCACAATGCTGTGTCTTCCGATCTTCATCATCCTCCTTCTGTTGGCTTCACCTGCAGC 116
Nu5.2      AAGCACAATGCTGTGTCTTCCGATCTTCATCATCCTCCTTCTGTTGGCTTCACCTGCAGC 120
*****.*****

          19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38
Nu5.1      TTCAAACCCTTTGGAAAGGAGCCTCCAAAAGAGATTTGATTTCGCGGAACCTTCGAGATTC 176
Nu5.3      TTCAAACCCTTTGGAAAGGAGCCTCCAAAAGAGATTTGATTTCGCGGAACCTTCGAGATTC 176
Nu5.2      TTCAAACCCTTTGGAAAGGAGCCTCCAAAAGAGATTTGATTTCGCGGAACCTTCGAGATTC 180
*****.*****

          39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58
Nu5.1      TGATATGAAAACCGAAAAGGCCGTTTTTGGTAGCTGCTGCCCTTTGATGTCTTGCTGTAA 236
Nu5.3      TGATATGAAAACCGAAAAGGCCGTTTTTGGTAGCTGCTGCCCTTTGATGTCTTGCTGTAA 236
Nu5.2      TGATATGAAAACCGAAAAGGCCGTTTTTGGTAGCTGCTGCCCTTTGATGTCTTGCTGTCA 240
*****.*****

          58  59 60
Nu5.1      CAG--CAAAATGATCAAGAGGCTTTAAAG---TATGGCTGA-CTTGAAACGACAC--CT 288
Nu5.3      CGA--CAAAATGATCAAGAGGCTTTAAAG---TATGGCTGA-CTTGAAACGACAC--CT 288
Nu5.2      CCGGACCTGAGATCAGAAGGTTTTTAAAGATGTTTGGCTGAKCTTAGAAAACGACACATCT 300
* . *.:.:*****.*** ***** *: * ***** **:*. ***** **

          CCAA AACTGTACCTGG-ATATGAGATGTGAAAAACAGGCTG-TTCCTTCTG-CACATACT- 344
Nu5.1
          CCACACTGTACCCGG-ATATGAGATGTGAAAAACAGGCTG-TTCCTTCTG-CACATGCT- 344
Nu5.3
          CCACAT TGT MCCC GGAATATGAGATGTGAAAAACAGGCTG TTTCTTTTGGC CACATGCTY 360
Nu5.2
*****. * ** ** * ** ***** ***** ** *****.**

Nu5.1      CGTGTGGAATCACTAGT 361
Nu5.3      CGTGTGGAATCACTAGT 361
Nu5.2      CGCGTGTGGAATCACTAGT 379
** *****

```

Figura 19. Alineación de las secuencias de nucleótidos de las conotoxinas Nu5.1 a Nu5.3. En turquesa, se muestra el sitio de clonación múltiple del vector, en magenta se muestran los codones de inicio y de paro, en amarillo se muestran los sitios en donde se presentan cambios de nucleótidos y los números localizados por encima de los nucleótidos indican el inicio y número de codón, los asteriscos (*) indican que no existe diferencia entre las secuencias, los dos puntos (:) indican que el cambio es conservativo y el punto (.) indica que el cambio es menos conservativo.

En las toxinas Nu5.5 y Nu5.6, se encontraron dos precursores distintos para cada una con cambios en no más de dos aminoácidos; para descartar un posible error, se alinearon las secuencias de nucleótidos (Figura 20).

```

Nu5.6prec1      GCGGGAATTCGATTGAAGCTGACACCAGGCAGAATGCGCTGTCTCCAGTTTTCGTCATT 60
Nu5.6prec2      GCGGGAATTCGATTGAAGCTGACTACAGGCAGAATGCGCTGTCTCCAGTTCGTCATT 60
Nu5.5prec1      GCGGGAATTCGATTGAAGCTGACTCCAGGCAGAATGCGCTGTCTGCCAGTCTTCGTCATT 60
Nu5.5prec2      GCGGGAATTCGATTGAAGCTGACACCAGGCAGAATGCGCTGTCTGCCAGTCTTCGTCATT 60
*****
Nu5.6prec1      CTCTCTGGTGTGCTGATTGCATTTGCACCTAGCGTTGATGCTCAACGAAAGACCAAGGACGAT 120
Nu5.6prec2      CTCTCTGGTGTGCTGATTGCATTTGCACCTAGCGTTGATGCTCAACGAAAGACCAAGGACGAT 120
Nu5.5prec1      CTCTCTGGTGTGCTGATTGCATCTGCTCCTAGCGTTGATGCTCAAGCAAAGACCAAGGATGAT 120
Nu5.5prec2      CTCTCTGGTGTGCTGATTGCATCTGCACCTGCGTTGATGCTCAAGCAAAGACCAAGGATGAT 120
*****
Nu5.6prec1      GTGCCTCTGGCATCTTTCCACGATAATGCAATGCGAAACCTGCAAAGACTTTTGAACAAA 180
Nu5.6prec2      GTGCCTCTGGCATCTTTCCACGATAATGCAATGCGAAACCTGCAAAGACTTTTGAACAAA 180
Nu5.5prec1      GTGCCTCTGGCATCTTTCCATGATAATGCAATGCAAATACTACAAAGACTTTTGAAGA 180
Nu5.5prec2      GTGCCTCTGGCATCTTTCCATGATAATGCAATGCAAATACTACAAAGACTTTTGAAGA 180
*****
Nu5.6prec1      CGCTGGTGTGCTGCCAGAAAAGACTTATTGTGTGTAGCCACAATGAAGGGAAATGACTTTG 240
Nu5.6prec2      CGCTGGTGTGCTGCCAGAAAAGACTTATTGTGTGTAGCCACAATGAAGGGAAATGACTTTG 240
Nu5.5prec1      CAGTGTGTCACCCAGGAAAGTACTGGTGTGTGTAGCCACAATGAAGGGAAATGACTTTG 240
Nu5.5prec2      CAGTGTGTCACCCAGGAAAGTACTGGTGTGTGTAGCCACAATGAAGGGAAATGACTTTG 240
* . * * * * : * * * * : * . * * * *
Nu5.6prec1      GATGAGACCCCTGCAAACCTGCCCTGGATGTGAGATTGGAAAGCAGACTGTTCCCTCCG 300
Nu5.6prec2      GATGAGACCCCTGCAAACCTGCCCTGGATGTGAGATTGGAAAGCAGACTGTTCCCTCCG 300
Nu5.5prec1      GATGAGACCCCTGCAAACCTGCCCGGATGTGAGATTGGAAAGCAGACTGTTCCCTCCG 300
Nu5.5prec2      GATGAGACCCCTGCAAACCTGCCCGGATGTGAGATTGGAAAGCAGACTGTTCCCTCCG 300
*****
Nu5.6prec1      CGCGTGTTCGTGGAATGTGGAATGGTGTGTCATCAGCACGCGGCCACTTGCAAGCTACAGT 360
Nu5.6prec2      CGCGTGTTCGTGGAATGTGGAATGGTGTGTCATCAGCACGCGGCCACTTGCAAGCTACAGT 360
Nu5.5prec1      CACGTGTTTCGTGGAATGTGGAATGGTGTGTCATCAACACGCTGCCACTTGCAAGCTACAGT 360
Nu5.5prec2      CACGTATTTCGTGGAATGTGGAATGGTGTGTCATCAACACGCTGCCACTTGCAAGCTACAGT 360
* . * * * . * * * * *
Nu5.6prec1      CTCTCTGTCCCTTCATCTGTGGAACCTGGATGGTCTAACAACTGAAATGTCATAGACAGTT 420
Nu5.6prec2      CTCTCTGTCCCTTCATCTGTGGAACCTGGATGGTCTAACAACTGAAATGTCATAGACAGTT 420
Nu5.5prec1      CTCTCTGTCCCTTCATCTGTGGAACCTGGATGGTCTAACAACTGAAATGTCATAGAAAGTT 420
Nu5.5prec2      CTCTCTGTCCCTTCATCTGTGGAACCTGGATGGTCTAACAACTGAAATGTCATAGAAAGTT 420
*****
Nu5.6prec1      TTCAATGGGTATACACTATGACCATGTAGTCCGTAATTACATCATTGGACTTTCTGAAA 480
Nu5.6prec2      TTCAATGGGTATACACTATGACCATGTAGTCCGTAATTACATCATTGGACTTTCTGAAA 480
Nu5.5prec1      TTCAATGGGTATACACTATGACCATGTAGTCCGTAATTACATCATTGGACTTTCTGAAA 480
Nu5.5prec2      TTCAATGGGTATACACTATGACCATGTAGTCCGTAATTACATCATTGGACTTTCTGAAA 480
*****
Nu5.6prec1      TAT-TTTTCAAATGTAAGTTTTTTTTCCCTTGAAAGGTTAATTGAAGTTAAATATTT 538
Nu5.6prec2      TAT-TTTTCAAATGTAAGTTTTTTTTCCCTTGAAAGGTTAATTGAAGTTAAATATTT 538
Nu5.5prec1      TATGTTTTCAAATGTAAG-TTTTTTCCCTTGAAAGGTTCCATTGAAGTTAAATATTT 538
Nu5.5prec2      TATGTTTTCAAATGTAAG-TTTTTTCCCTTGAAAGGTTCCATTGAAGTTAAATATTT 538
* * * * *
Nu5.6prec1      TAGTATGTTATATTTT-GCACACAAGCTATAGCATTCTGTCTTCTTTTTGTTCCTACAT 597
Nu5.6prec2      TAGTATGTTATATTTT-GCACACAAGCTATAGCATTCTGTCTTCTTTTTGTTCCTACAT 597
Nu5.5prec1      TAGTATGTTATATTTTGCACACAAGCTATAGCATTCTGTCTTCTTTTTGTTCCTACAT 598
Nu5.5prec2      TAGTATGTTATATTTT-GCACACAAGCTATAGCGTTCTGTCTTCTTTTTGTTCCTACAT 597
*****
Nu5.6prec1      CAATAGTTGGGGCAGAAATATTGGY-TTTGG-TCAATGTAGTTATGACCCGCATTTAGT 655
Nu5.6prec2      CAATAGTTGGGGCAGAAATATTGGT-TTTGG-TCAATGTAGTTATGACCCGCATTTART 655
Nu5.5prec1      CAATAGTTGGGGCAGAAATATTCCG--TTTGGTCAATGTAGTTATGAYCTGCATTTAGT 656
Nu5.5prec2      CAATAGTTGGGGCAG-ANTTATCCGWTTTTKGGTCAATGTAGTTATGAMCTGCATTTAMT 656
*****
Nu5.6prec1      GCTATAATCATTGCATTTTCAGCGWTGAATGTTCAATCTGCAAACATAAAAAARR--TTGA 713
Nu5.6prec2      GCTATAATCATTGCATTTTCAGCGTGAATGKTCAATCTGCAAGCATNAAAAARGGTTGA 715
Nu5.5prec1      GCTATAGTCATTGCATTTTCAGCGTGAATGTTTCGATCTGCAAACAGAAAAAGG--TTGA 714
Nu5.5prec2      GCTATAGTCATTG--TTTTTCAGCRWTTGAATRTKTCGATCTGCAAACMGAAAAARR-KTGA 713
* * * * *
Nu5.6prec1      TCGACTAATAAAGACTTGCATGGSAAATCACTAGT 747
Nu5.6prec2      TCGACTAATAAAGACTTGCATG--AATCACTAGT 747
Nu5.5prec1      TCGACTAATAAAGACTTGCATGGCAATCACTAGT 748
Nu5.5prec2      TCGACTAATAAAGACTTGCATGG-AATCACTAGT 746
*****

```

Figura 20. Alineación de las secuencias de nucleótidos de las conotoxinas Nu5.5 y Nu5.6 En turquesa, se muestra el sitio de clonación múltiple del vector, en magenta se muestran los codones de inicio y de paro, en amarillo se muestran los sitios en donde se presentan cambios de nucleótidos y los números localizados por encima de los nucleótidos indican el inicio y número de codón, los asteriscos (*) indican que no existe diferencia entre las secuencias, los dos puntos (:) indican que el cambio es conservativo y el punto (.) indica que el cambio es menos conservativo.

Para encontrar conotoxinas de la superfamilia T parecidas a las conotoxinas encontradas en el caracol marino *C. nux*, se realizaron, usando las secuencias reportadas en la página del “ConoServer”, dos árboles filogenéticos, uno de precursores completos y otro de toxinas maduras (Figura 21).

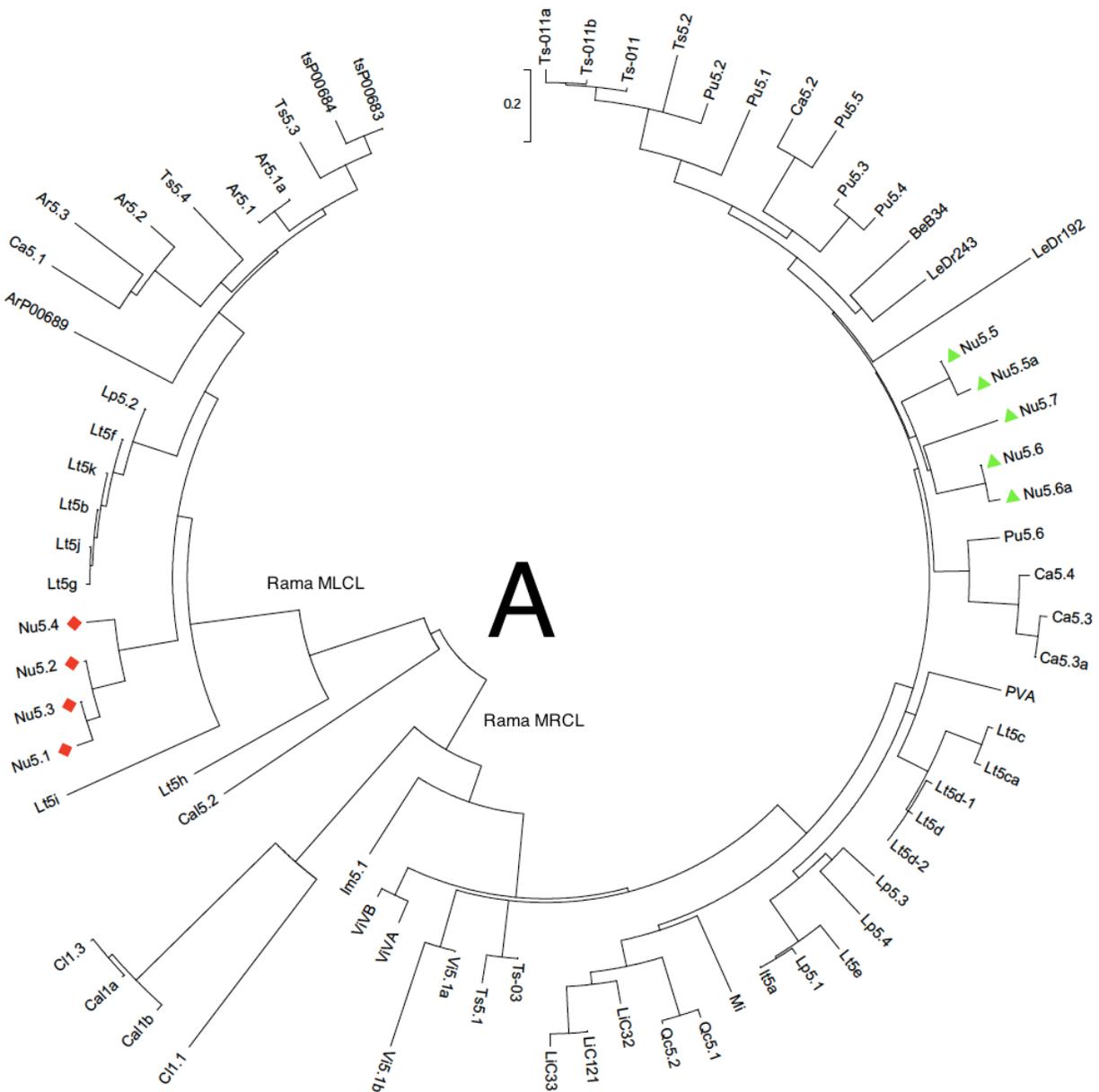


Figura 21. Árboles filogenéticos de la superfamilia T. En el panel A se muestra el árbol de precursores completos (prepro péptido) y en el panel B se muestra el árbol de las toxinas maduras. Los rombos rojos señalan las conotoxinas de la rama MLCL y los triángulos verdes señalan las conotoxinas de la rama MRCL encontradas en el caracol *C. nux*.

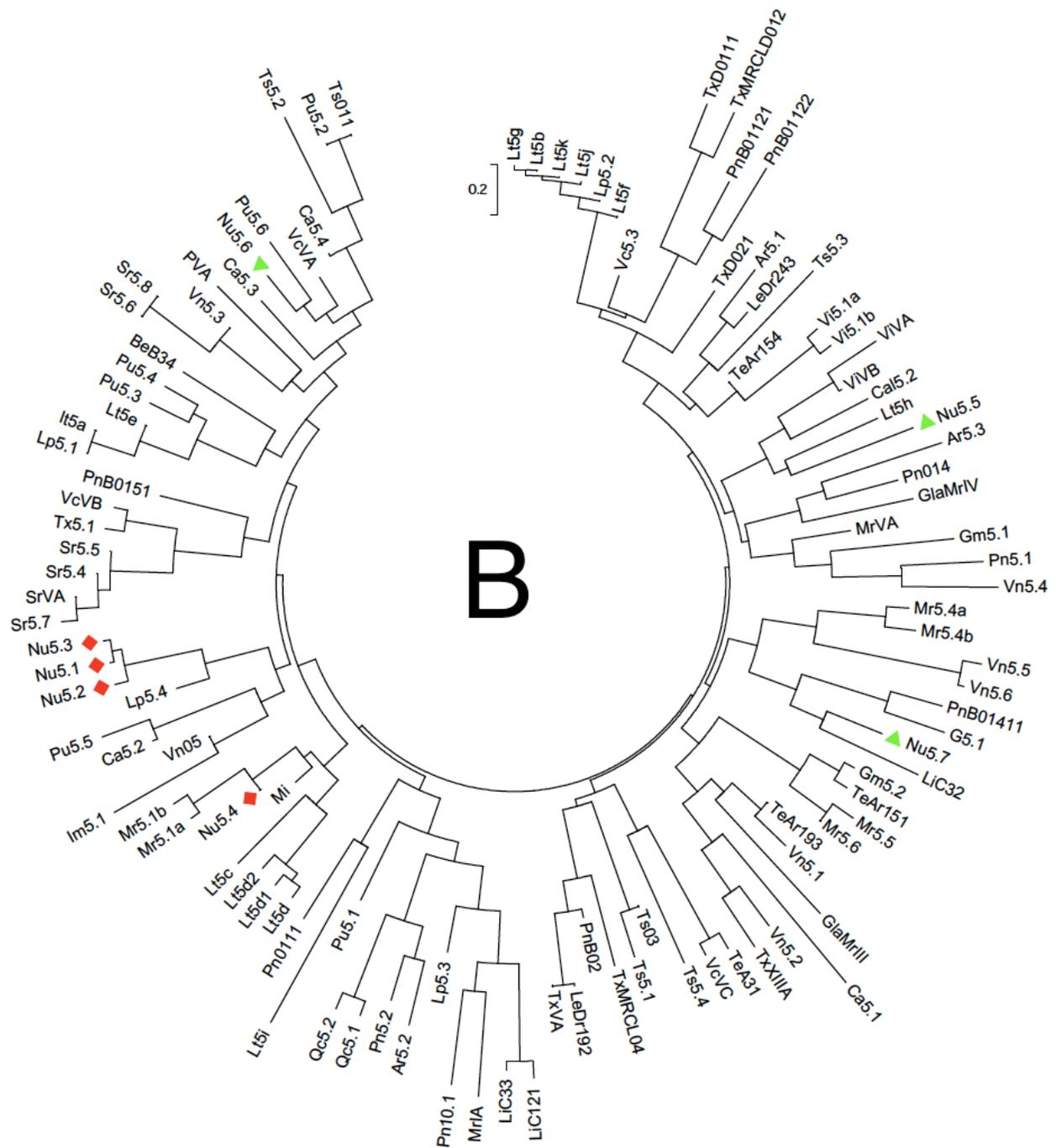


Figura 21 (continuación).

Un resultado inesperado se presentó con el par de oligonucleótidos SFT_{MLCL}F-adCDS de dos caracoles *C. nux*; con este juego de oligonucleótidos se obtuvieron catorce secuencias, de las cuales se identificaron tres diferentes precursores de dos conotoxinas de la superfamilia O1 (Figura 22).



Figura 22. Secuencias de las conotoxinas de la Superfamilia O1 encontradas en el caracol *C. nux*. Las flechas indican los puntos de corte de diferentes enzimas; Etapa 1: SPP; Etapa 2: PPC o peptidasa desconocida; Etapa 3: CPE; Etapa 4: PAM. En amarillo se muestran las diferencias entre precursores, en letras rojas se muestran las cisteínas, en letras azules las posibles modificaciones post traduccionales. Las etapas y modificaciones post traduccionales fueron predichas mediante el programa Propeptide analysis, disponible en la página del “ConoServer”.

Las conotoxinas encontradas de la superfamilia O se nombraron Nu6.3 y Nu6.4; se nombraron así porque ya se encuentran reportadas las conotoxinas Nu6.1 y Nu6.2 (Duda Jr *et al.*, 2008). La conotoxina Nu6.3 presenta dos precursores distintos; para observar los cambios, se alinearon los nucleótidos de estos precursores (Figura 23).

Nu6.3prec1	CGGGGAATTCGATTGATACGTGGCACTTTGCAGTGTGAGAACAACATCACCAAGATCATC	60
Nu6.3prec2	CGGGGAATTCGATTGATACGTGGCACTTTGCAGTGTGAGAACAACATCACCAAGATCATC	60

	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	
Nu6.3prec1	ACCAGAATGAAAATGACGTGCGTG-----CTGTTCTGACGGCCTGTCAG	105
Nu6.3prec2	ACCATAATGAAAATGACGTGCGTGTGTGATCATCGCCGTGCTGTTCTGACGGCCTGTCAG	120
	**** *****	
	19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38	
Nu6.3prec1	CTCATTACAGCTGATGACTCCAGAGATAAGCAGGGGTACCAGCAGTGAGGCTGAGAGAC	165
Nu6.3prec2	CTCATTACAGCTGATGACTCCAGAGATAAGCAGGGGTACCAGCAGTGAGGCTGAGAGAC	180

	39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58	
Nu6.3prec1	CCAATGCAGAATTCATAGATTCCAGGAACCCATGCAGAAACGCGGGCAAGGTTACACT	225
Nu6.3prec2	CCAATGCAGAATTCATAGATTCCAGGAACCTATGCAGAAACGCGGGCAAGGTTGCACT	240

	59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78	
Nu6.3prec1	AACACTGCCCGTGCTGCGCTGGTCTGACCTGCTCGGGCCAAAAACAAGGAGGTATGTGC	285
Nu6.3prec2	AACACTGCCCGTGCTGCGCTGGTCTGACCTGCTCGGGCCAAAAACAAGGAGGTATGTGC	300

	79 80 81 82 83	
Nu6.3prec1	GTCTCCTCCGGGTAGTCTGGCATCTGATATTTCTCCTCTGTGCTCTACTCCCTTTTGCCCT	345
Nu6.3prec2	GTCTCCTCCGGGTAGTCTGGCATCTGATATTTCTCCTCTGTGCTCTACTCCCTTTTGCCCT	360

	GATTCCTCCATACCTTTGTGTGGTCATGAACCACTCAGTACCTACACCTCTAGTGGCTTC	405
Nu6.3prec2	GATTCCTCCATACCTTTGTGTGGTCATGAACCACTCAGTACCTACACCTCTAGTGGCTTC	420

	AGAGGACGTATATCAAAATAAAACCGCATTACN-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC	464
Nu6.3prec2	AGAGGACGTATATCAAAATAAAACCGCATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC	480

	ATGTCGGCCGCTCGGCCTCTAG-AATAATCACTAGT	500
Nu6.3prec2	ATGTCGGCCGCTCGGCCTCTAGNAATAATCACTAGT	517

Figura 23. Alineación de las secuencias de nucleótidos de los precursores de la conotoxina Nu6.3. En turquesa se muestra el sitio de clonación múltiple del vector, en magenta se muestran los codones de inicio y de paro, en amarillo se muestran los sitios en donde se presentan cambios de nucleótidos y los números localizados por encima de los nucleótidos indican el inicio y número de codón, los asteriscos (*) indican que no existe diferencia entre las secuencias, los dos puntos (:) indican que el cambio es conservativo y el punto (.) indica que el cambio es menos conservativo.

Se realizaron dos árboles filogenéticos, uno de precursores completos y otro de toxinas maduras, usando las secuencias reportadas de las conotoxinas de la superfamilia O, en la página del “ConoServer” y las encontradas en este trabajo, para buscar, si existe relación entre las conotoxinas encontradas y las ya reportadas (Figura 24).

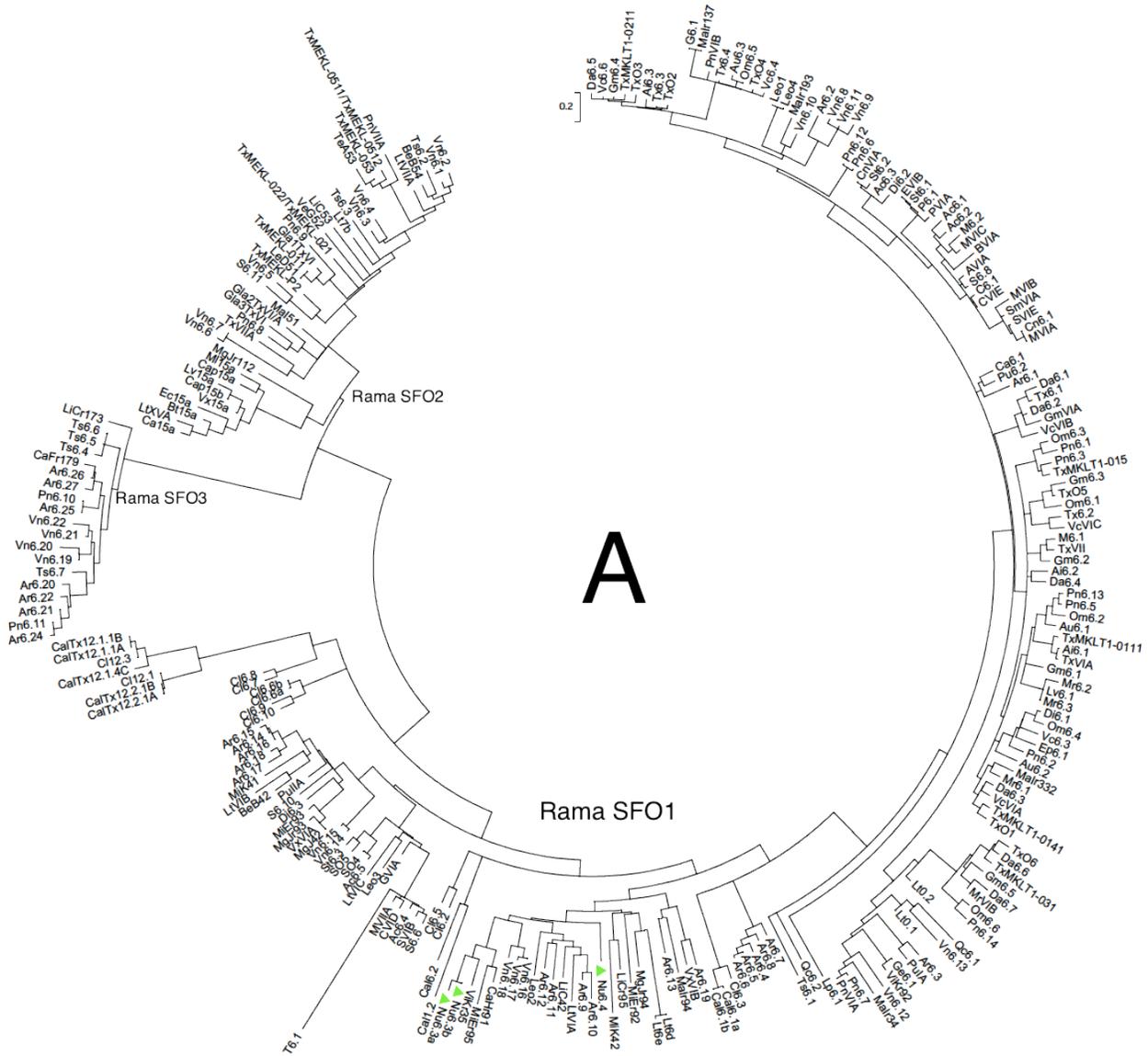


Figura 24. Árboles filogenéticos de la superfamilia O. En el panel A se muestra el árbol de precursores completos (prepro péptido) y en el panel B se muestra el árbol de las toxinas maduras. Los triángulos verdes indican las conotoxinas encontradas en el caracol *C.nux* en este trabajo, los triángulos rojos son conotoxinas ya reportadas del caracol *C. nux*.

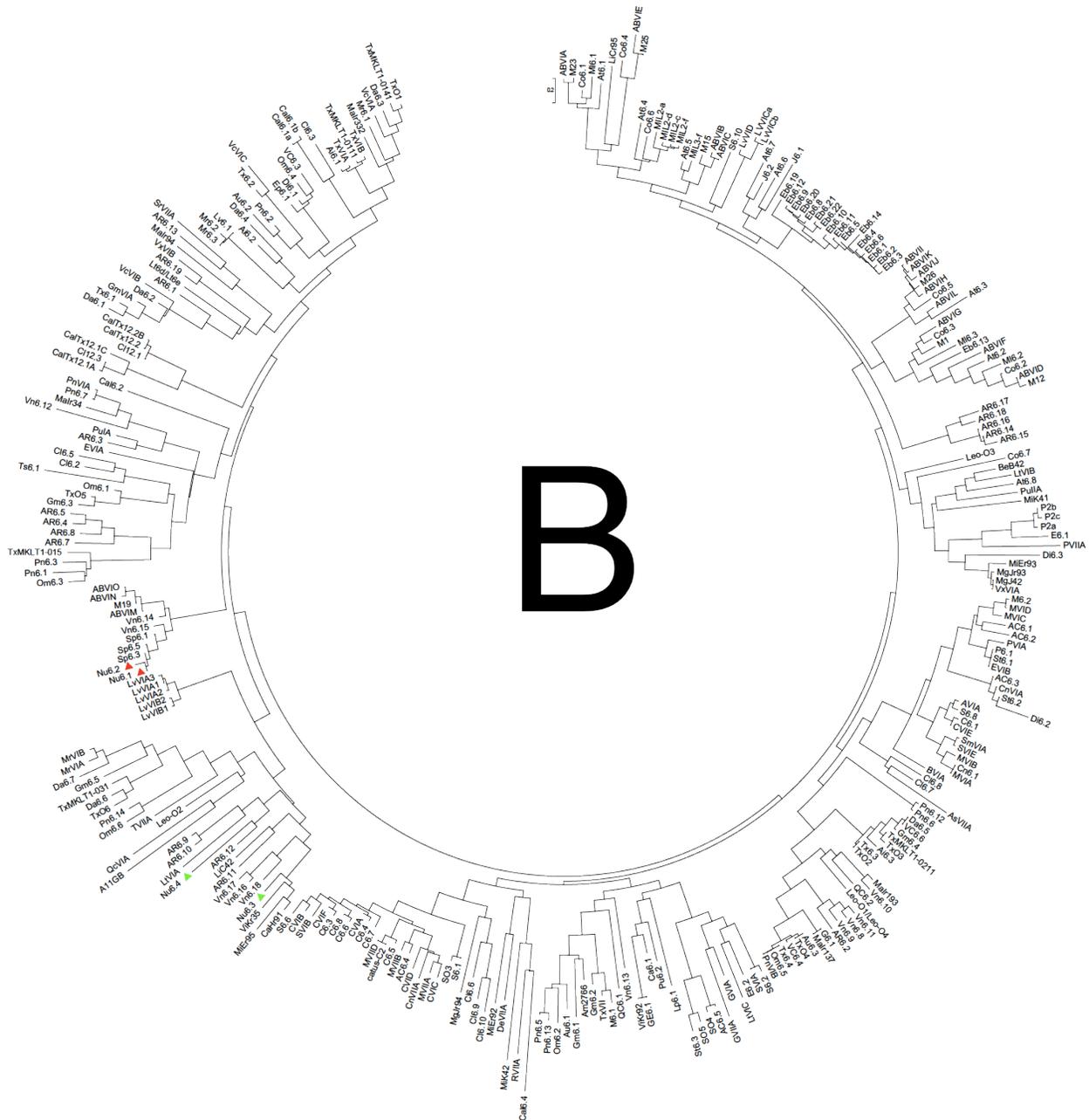


Figura 24 (continuación).

10 Análisis y discusión de resultados.

Una de las herramientas más poderosas para la investigación del sistema nervioso son las neurotoxinas; un ejemplo clásico de ellas es la tetrodotoxina, toxina proveniente del pez globo, la cual actúa de manera selectiva sobre canales de sodio activados por voltaje, inhibiendo la propagación de los potenciales de acción. En la actualidad, se han caracterizado una gran cantidad de compuestos a partir del veneno de diferentes

reptiles, anémonas marinas, arañas, alacranes y caracoles cono, siendo estos tres últimos los de mayor interés para las neurociencias.

El estudio del veneno de los caracoles cono ha impactado en varias ramas de investigación, principalmente en la farmacología, en la toxicología y toxinología principalmente, ya que sus toxinas presentan una gran diversidad estructural y funcional; por su tamaño pequeño, su gran afinidad y especificidad de blancos moleculares, un ejemplo de ellos es la conotoxina ω -GVIA aislada del caracol *C. geographus*, no es activa en sistemas de invertebrados (McCleskey *et al.*, 1987) y puede distinguir entre diferentes grupos de vertebrados (Gray *et al.*, 1988).

10.1 Purificación de ARN

Un punto clave para la obtención del ADNc, es la calidad del ARN extraído; es por ello que al purificar el ARN del conducto venenoso se trabajó con mucho cuidado para evitar contaminación con nucleasas.

Para corroborar si el ARN, se encontraba en buen estado se realizó una electroforesis en gel de agarosa, al analizar el gel, se puede observar un barrido que presenta tres bandas, las cuales podrían representar al ARNr y al ARN de transferencia (ARNt) o simplemente una degradación. Sin embargo, en los organismos eucariotas protostomados, el ARNr 28S se encuentra segmentado, debido a que durante el procesamiento de la maduración de la subunidad 28S, se forma una horquilla en una región del ARNr caracterizada por contener alta proporción de timinas y uracilos, además de la secuencia específica UAAU. Posteriormente, esta subunidad es cortada en dos fragmentos de longitud similar entre sí y también al de la subunidad 18S. Los fragmentos de ARN 28S quedan asociados mediante los puentes de hidrógeno que formaron la horquilla pero no están unidos covalentemente (Fujiwara e Ishikawa, 1986; Ogino *et al.*, 1990).

10.2 Superfamilia A

Los precursores Nu1.1 al Nu1.5, presentan un arreglo de cisteínas -CC-C-C-, correspondiente al marco número I, característicos de las conotoxinas α . El péptido señal de todos es de 21 aminoácidos e inicia con la secuencia MGMRMM, característicos de la Superfamilia A. Las conotoxinas α , pertenecientes a las Superfamilia A, son antagonistas competitivos de los receptores musculares y neuronales de acetilcolina. La mayoría de estas conotoxinas, son traducidas inicialmente como precursores largos de alrededor de 65 aminoácidos en forma de prepropéptido.

Los precursores se analizaron mediante el programa “*Analyse prosequence*”, disponible en línea, en la página del “ConoServer”. Este programa utiliza diferentes algoritmos para identificar el péptido señal y predecir la región “pro”, la toxina madura y las posibles modificaciones post traduccionales presentes en ésta. El precursor Nu1.1 codifica una toxina con un arreglo de cisteínas $\alpha_4/4$ (Figura 14) y posiblemente presenta una amidación en el extremo carboxilo como posible modificación postraduccional; esta modificación se propone porque en el extremo carboxilo de la toxina madura se localiza una Glicina (G), la cual es escindida por la enzima PAM y el grupo amino es amidado. La subfamilia $\alpha_4/4$ tiene como blanco molecular a los receptores nicotínicos para acetilcolina neuronales (n-AChR). Un ejemplo de esta familia es la conotoxina $\alpha_4/4$ Bu1A, la cual presenta una actividad como bloqueador de los n-AChR α_6 , $\alpha_4\beta_2$ y α_7 (Azam *et al.*, 2005). Sin embargo, la toxina Nu1.1 se encuentra mayormente relacionada con la toxina PIB (Figura 16), la cual tiene como blancos moleculares receptores nicotínicos para acetilcolina neuromusculares (m-AChR) $\alpha_1\beta_1\delta\gamma$ y $\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$ de ratón fetal y adulto, respectivamente (López-Vera *et al.*, 2007b). Posiblemente la toxina Nu1.1 presente blancos moleculares parecidos al de la conotoxina PIB por la similitud entre estas toxinas.

Las conotoxinas Nu1.2 a la Nu1.5 pertenecen a la subfamilia $\alpha_4/5$ y solamente la conotoxina Nu1.5 presenta posiblemente una γ -carboxilación como modificación post traduccional debido al ácido glutámico (E). La subfamilia $\alpha_4/5$ no ha sido estudiada a

profundidad; sus miembros están reportados únicamente como precursores y por ello no se conoce su blanco molecular con certeza.

La conotoxina Nu1.2 presenta cuatro precursores distintos; con respecto a los demás, el precursor 4 tiene en la posición 21 una Serina (S) en lugar de una Valina (V); el precursor 1 cuenta con una Isoleucina (I), en la posición 35, en lugar de una Metionina (M); el precursor 2, presenta dos cambios, una posible deleción en la posición 26 y una Prolina (P) en la posición 27 en lugar de una Alanina (A) (Figura 14). Al analizar las secuencias de nucleótidos, podemos observar que los cambios encontrados dentro de los precursores de la conotoxina Nu1.2 son de un solo nucleótido, exceptuando el precursor 2. En éste se suprimieron tres nucleótidos, localizados en las posiciones 91 (G), 92 (T) y 93 (G); los dos primeros (GT) pertenecen al aminoácido de la posición 26 y el último (G) al aminoácido de la posición 27. Al existir esta deleción de tres nucleótidos no existió modificación del marco de lectura y se originó un codón nuevo (CCA) que codifica una Prolina en lugar de los codones (-CGT-GCA-) que codifican la Arginina (R) y la Alanina. Al revisar las regiones no traducidas de estos precursores (Figura 15), observamos que únicamente el precursor 3 tiene un cambio en el nucleótido 208, con lo que puedo asegurar que al menos existen 3 precursores para esta conotoxina; el cuarto precursor podría ser un error de la Taq Polimerasa, por presentar un cambio en toda la secuencia del inserto. La fidelidad de la Taq Polimerasa usada es de 1 error cada 100,000 nucleótidos; en productos de PCR menores a 700 pb, más de un error en la secuencia es poco probable que ocurra.

Al comparar las cinco α conotoxinas encontradas en el *C. nux* (Figura 14), se puede observar una clara relación entre las conotoxinas Nu1.2 a la Nu1.5; en ellas se encontró al menos dos aminoácidos diferentes entre los prepro péptidos. Al revisar la secuencia de nucleótidos se observa que las toxinas Nu1.3 y Nu1.4 (Figura 15) presentan un UTR 5' más largo, lo cual es debido al juego de oligos usados; también se observan cuatro cambios dentro del ORF con respecto a la conotoxina Nu1.2. La naturaleza de estos cambios indica que no son a causa de un error de la polimerasa usada; sin embargo, entre la Nu1.3 y Nu1.4 se presenta un cambio de nucleótido en la región 5'-UTR y otro

en el aminoácido número 40; por lo tanto, aunque solo son dos cambios los que presentan, sin duda alguna son dos secuencias diferentes.

La conotoxina Nu1.5 presenta tres aminoácidos diferentes, con respecto a la conotoxina Nu1.2, en el aminoácido de la posición 13 tiene un cambio de dos nucleótidos, y en los de las posiciones 37 y 39, cambia en un nucleótido; por otra parte presenta una UTR 3' más larga, aunque esto es por el juego de oligonucleótidos usados en su amplificación; aunado a lo anterior tiene más cambios cerca de la región 3' de inserción al vector.

Estas posibles mutaciones que muestran las diferentes toxinas se pueden generar durante la maduración del transcrito primario, ya que las conotoxinas α presentan un gran intrón en la región pro (Olivera BM, 1997). También presentan dos exones, el primero codifica el péptido señal y varios aminoácidos del propéptido, mientras que el exón dos codifica la otra parte del propéptido, el péptido maduro y toda la UTR 3' (Yuan *et al.*, 2007).

10.3 Superfamilia T

Con los juegos de oligonucleótidos específicos para la superfamilia T se encontraron nueve precursores de siete conotoxinas, los cuales presentan el mismo patrón de cisteínas -CC-CC- así como dos inicios de péptidos señales distintos, el primero MLCLPIFI, y el segundo MRCLPVFV; tanto el arreglo de cisteínas como ambos péptidos señales son característicos de la superfamilia T; la primera secuencia pertenece a la rama filogenética MLCL y la segunda a la rama filogenética MRCL.

Aún no se ha reportado un blanco molecular específico para esta superfamilia. La superfamilia T incluye 2 subfamilias; la subfamilia T1 con un marco de cisteínas -CC-CC- (τ -conotoxinas) y la subfamilia T2 (χ -conotoxinas) con un marco de cisteínas -CC-C-OC-. En estudios previos se ha demostrado que los miembros de la subfamilia de conotoxinas T1 presentan efectos biológicos sobre la mayoría de modelos animales, aunque no se conoce a ciencia cierta el blanco molecular de la mayoría de ellos. Dada la notable diversidad de secuencias de las conotoxinas T1, sus blancos pueden incluir

canales iónicos dependientes de voltaje o receptores activados por ligando, ya sea en el sistema nervioso o en la placa neuromotora (Peng *et al.*, 2007).

En la Figura 17 se muestran los productos de PCR de la rama MLCL, la mayoría de ellos de más de 700 pb exceptuando el juego de oligonucleótidos SFTF-SFTR el cual presenta un peso aproximado de 350 pb; únicamente con los juegos de oligonucleótidos SFTF-adCDS y SFTF-SFTR de la rama MLCL con ambos grupos de ADN codificante se obtuvieron productos de PCR con el peso estimado para cada juego de oligonucleótidos. Para la rama MRCL, únicamente con el juego de oligonucleótidos SFTF-SFTR, se encontraron productos con el peso estimado.

De las conotoxinas encontradas cuatro pertenecen a la rama filogenética MLCL, las cuales se nombraron Nu5.1 a Nu5.4 (Figura 18); los prepropéptidos Nu5.1 al Nu5.3 presentan la misma secuencia de corte RGTLR, ligeras diferencias en la región amino terminal, y las toxinas Nu5.1 y Nu5.3 presentan la delección de una lisina (K) en la región del carboxilo terminal causada por la enzima CPE; todos presentan una posible γ -carboxilación como posible modificación postraduccional.

Para comprobar si los cambios no son por errores de la polimerasa, se procedió a revisar las secuencias de nucleótidos; en la figura 19 se puede observar que existen varios cambios de nucleótidos a lo largo de las secuencias, principalmente en los UTR; con ello se puede descartar que los cambios se originaron por error de la polimerasa.

La conotoxina Nu5.4 es de menor tamaño, y presenta dos secuencias de corte, una en el amino terminal de la región “pro” (ER) y otra al final de la toxina madura (KR); otra modificación que sufre esta conotoxina es la delección de una Lisina por la acción de la enzima CPE; no presenta modificaciones post traduccionales aparentemente.

Al comparar el precursor completo de las 4 conotoxinas del *C. nux* de la rama filogenética MLCL (Figura 21A), encontramos que solo presentan relación entre ellas; sin embargo al analizar únicamente las toxinas maduras (Figura 21 B), las conotoxinas Nu5.1 a la Nu5.3 presentan una relación estrecha entre ellas como era de esperarse; así mismo, se encontró que comparten un predecesor común con la Lp5.4 conotoxina

de *C. leopardus*, como vermívoro habitante de la región del Indo-Pacífico; esta toxina solo se ha caracterizado a nivel de ácidos nucleicos, por ello no se puede proponer algún blanco molecular para este grupo de toxinas. La conotoxina Nu5.4, presenta similitudes con toxinas de caracoles como diferentes; tiene el mismo antecesor que las conotoxinas Mr5.1a y Mr5.1b de *C. marmoreus*, como molusquívoro del Indo-Pacífico; por otra parte, también tiene relación, aunque en menor grado, con la conotoxina Mi de *C. miles*, como vermívoro del Indo-Pacífico; de ninguna de las conotoxinas que presentan alguna relación con la conotoxina Nu5.4 se ha reportado su blanco molecular.

Las toxinas Nu5.5 a la Nu5.7 pertenecen a la rama filogenética MRCL, a la cual pertenecen la mayoría de las toxinas de la superfamilia T (Kaas *et al.*, 2010). Las tres conotoxinas de esta rama son diferentes y presentan poca relación entre sí; la conotoxina Nu5.5 presenta la secuencia LLKR, la cual señala el sitio de corte para la escisión del péptido maduro; se detectó un ácido piroglutámico, como una posible modificación postraduccional, debido a que el primer aminoácido de la toxina madura es una glutamina (Q). La conotoxina Nu5.6, después del corte del péptido señal, presenta la secuencia LQRLLNK, y no muestra procesos de deleción de aminoácidos, ni procesos de modificación postraduccional aparentemente. La conotoxina Nu5.7, posee la secuencia de corte LRKR, similar a la de la conotoxina Nu5.5; sin embargo, presenta una Arginina en el extremo carboxilo, la cual es procesada por la enzima CPE; no se detectó alguna otra posible modificación postraduccional.

Al analizar la relación de los precursores completos de estas tres conotoxinas de la rama MRCL, se observó (Figura 21A) que están relacionados entre ellos, aunque la relación más estrecha la tienen los precursores Nu5.6 y nu5.7 al encontrarse en el mismo nodo. Al examinar las toxinas maduras, la relación existente entre ellas desaparece y cada una presenta relación con distintas toxinas en diferentes clados. La conotoxina Nu5.5 muestra relación con la conotoxina Lt5h de *C. litteratus*, como vermívoro del Indo-Pacífico; ambas presentan el mismo antecesor aunque ya se encuentran distanciadas entre sí. La conotoxina Nu5.6 comparte predecesor con la conotoxina Pu5.6 de *C. pulicarius*, como vermívoro del Indo-pacífico; ambas conotoxinas

se encuentran casi a la misma distancia del ancestro común. La conotoxina Nu5.7 presenta relación con la conotoxina LiC32 de *C. lividus*, como vermívoro del Indo-Pacífico. Todas las toxinas con las que se encontró mayor similitud se encuentran reportadas a nivel de ácidos nucleicos. Dada la notable diversidad de secuencias de las conotoxinas T1, sus blancos pueden incluir canales iónicos dependientes de voltaje o receptores activados por ligando, ya sea en el sistema nervioso o en la placa neuromotora (Peng *et al.*, 2007), y por ello no es posible el inferir un posible blanco molecular para estas conotoxinas.

Un dato a destacar en este estudio es la identificación de dos toxinas de la superfamilia O1 de la rama filogenética MKLT2 (Conticello *et al.*, 2001); estas dos toxinas se encontraron con el juego de oligonucleótidos SFT_{MLCL}F-adCDS, en 14 muestras provenientes de dos caracoles distintos (8 muestras del caracol 5 y 6 muestras del caracol 6).

La superfamilia O presenta el grupo más grande de conotoxinas ya que abarca cinco distintas familias farmacológicas μ O-, δ - ω -, κ - y γ - (Santos *et al.*, 2004). Las familias μ O- y δ - tienen como blanco molecular la familia de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v); como ejemplo tenemos a las conotoxinas μ O-MrVIA (Fainzilber *et al.*, 1994) y la δ -TxVIA (Fainzilber *et al.*, 1995). La familia ω - tiene actividad sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) (Olivera *et al.*, 1987), y el mejor ejemplo es la ω -MVIIA; esta toxina, como ya se mencionó con anterioridad, se utiliza como principio activo en el Prialt. La familia κ - tiene como blanco los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) (Shon *et al.*, 1998), y como ejemplo tenemos a la conotoxina κ -PVIIA. La familia γ - tiene como blanco los canales marcapaso dependientes de voltaje (Fainzilber *et al.*, 1998), y un ejemplo de estas toxinas es la γ -PnVIIA.

Una posible explicación para este hallazgo es que en la región 5'-UTR de los precursores de la rama filogenética MLCL de la superfamilia T (a partir de la cual se diseñó el oligonucleótido SFT_{MLCL}F) exista una zona idéntica o al menos muy similar a una secuencia de dicha región presente en la rama filogenética MKLT2 de la

superfamilia O1. Para comprobar si esto es cierto, se buscaron en el “ConoServer” todas las secuencias de los precursores publicadas de la Superfamilia O1; se encontraron 85 secuencias, de las cuales únicamente siete presentan región 5'-UTR; al alinear estas siete secuencias con el oligonucleótido se encontró (Figura 25) que 10 nucleótidos se alinean en la mayoría de las secuencias; por lo tanto, es posible que el oligonucleótido se uniera a una de estas secuencias inespecíficamente y gracias a ello se obtuvieran las secuencias de las conotoxinas de la superfamilia O1.

```

C. geographus N01357 -GGATCTTGCACGGTGAATTTGCTTCATATTTTCTACTGTCGTCCTTGGCATCATCCA 59
C. marmoreus N01307 -----TTGCACGGTGAATTTGCTT-ATATTTTCTACTGTCGTCCTTGGCATCATCCA 54
C. textile N01283 -G--CCTTGCACGGTGAATTTGGCTTCATAGTTTCCACTGTCGTCCTTGGCATCATCCA 57
C. marmoreus N01304 GGATCCTAGCACAGTGAATTTGGCTTCACAGTTTCCACTGTCGTCCTTGGCATCATCCA 60
C. marmoreus N01306 ----GCTAGCACAGTGAATTTGGCTTCACAGTTTCCACTGTCGTCCTTGGCATCATCCA 56
C. gloriamaris N01280 GGATCCTTGCACGGTGAATTTGGCTTCACAGTTTCCACTGTCGTCCTTGGCATCATCCA 60
C. gloriamaris N01279 -G---CTTGCACGGTGAATTTGGCTTCACAGTTTCCACTGTCGTCCTTGGCATCATCTG 54
SFTMLCLF -----GMTACGTGGCACTTTCAGTGTG--- 23

```

Figura 25. Alineamiento de las secuencias O reportadas en el “ConoServer” con 5'-UTR. M= A o C;

En este sentido, existen datos no publicados de la unión del oligonucleótido SMART IV dentro de la región codificante de la toxina madura de las conotoxinas hidrofílicas de la superfamilia T del caracol *C. spurius*; la hibridación del SMART IV fue de 6 nucleótidos consecutivos, lo cual generó, al momento de realizar la PCR, ADNc de toxinas truncas de la superfamilia T, pero con un peso molecular cercano al de las secuencias codificantes de los precursores de toxinas hidrofílicas de la superfamilia T. De igual forma, se encontraron posibles secuencias de la superfamilia A del caracol *C. nux*, en donde el oligonucleótido SMART IV se unió de manera inespecífica en la región de la toxina madura generando de igual forma ADNc de toxinas incompletas de esta superfamilia, aunque en este caso sí existe una variación en el peso molecular de los productos de PCR.

La conotoxina Nu6.3 presenta dos precursores distintos. El precursor 1 tiene una delección de cinco aminoácidos en la región del péptido señal (Figura 23); esta eliminación no es a causa de un error de la polimerasa ya que también presenta cinco cambios más a lo largo del precursor, dos en la región del ORF y las demás en la región UTR-3'. La delección de aminoácidos podría deberse a una mutación del gen que

codifica esta conotoxina. Otra posibilidad es un “splicing” alternativo en que un exón o parte de él, no fue incluido en el ARNm.

Al buscar conotoxinas relacionadas con las encontradas en el *C. nux*, encontramos que a nivel de precursor completo (Figura 24A) la conotoxina Nu6.3, presenta relación con la ViKr35 conotoxina del caracol vermívoro del Indo-Pacífico *C. virgo*; al analizar las toxinas (Figura 24B), la relación persiste. La conotoxina Nu6.4, al compararse a nivel de precursor completo no presenta relación estrecha con ningún precursor reportado; sin embargo, al compararla a nivel de toxina, se encontró que tiene similitud con la conotoxina AR6.12, conotoxina de *C. arenatus*, cono vermívoro del Indo-Pacífico. Dado que, al igual que todas las conotoxinas encontradas en este trabajo, dichas toxinas solo se han reportado a nivel de ácidos nucleicos, no se puede inferir el blanco molecular de las toxinas de *C. nux*.

Cabe destacar que la mayoría de las toxinas encontradas en el caracol *C. nux* presentan similitud con toxinas de caracoles de la región del Indo-Pacífico, lo cual podría sugerir que *C. nux*, habitante del Pacífico americano, tenga parentesco con conos del Indo-Pacífico. Duda Jr. y su equipo de trabajo en el 2008 presentaron datos en donde muestran que los genes de las toxinas de *C. nux* se agrupan junto con los genes de las toxinas de *C. sponsalis*; en este trabajo se sugiere que ambas especies pueden presentar una evolución alopática, es decir, que el *C. nux* y *C. sponsalis*, sean una misma especie que evolucionó de manera distinta por encontrarse separada por una barrera natural. Kraus *et al.* en el 2011, presentan datos los cuales también sugieren que existe una relación estrecha entre estas dos especies.

11 Conclusiones

En este trabajo se describieron a nivel molecular las posibles toxinas de la superfamilia A, T y O que el caracol marino *C. nux* puede expresar para capturar a sus presas; estas toxinas pueden ser sintetizadas o purificadas del extracto crudo del veneno de este caracol, para buscar su blanco molecular y de esta manera usarlas como herramientas para la investigación en neurociencias.

Por último, se cumplieron todos los objetivos del proyecto al:

- Estandarizar las condiciones para la amplificación de productos de PCR específicos para las superfamilias A y T.
- Encontrar cinco toxinas de la superfamilia A, cuatro conotoxinas de la subfamilia $\alpha 4/5$, una de las cuales presenta tres precursores distintos, y una conotoxina de la subfamilia $\alpha 4/4$, que presenta un parecido a la toxina α -PIB; ésta tiene como blancos moleculares receptores nicotínicos para acetilcolina neuromusculares (López-Vera *et al.*, 2007b).
- Identificar siete conotoxinas de la superfamilia T, cuatro de la rama filogenética MLCL y tres de la rama MRCL. Además se obtuvieron dos conotoxinas de la superfamilia O1, mediante el uso de un oligonucleótido específico para la superfamilia T de la rama MLCL (SFT_{MLCLF}).

12 Bibliografía

1. Aguilar MB, López-Vera E, Imperial JS, Falcón A, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. 2005a. Putative γ -conotoxins in vermivorous cone snails: the case of *Conus delessertii*. *Peptides* 26: 23-27.
2. Aguilar MB, López-Vera E, Ortiz E, Becerril B, Possani LD, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. 2005b. A novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry* 44: 11130-11136.
3. Aguilar MB, Lezama-Monfil L, Maillo M, Pedraza-Lara H, López-Vera E, Heimer de la Cotera EP. 2006. A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides* 27: 500-505.
4. Aguilar MB, López-Vera E, Heimer de la Cotera EP, Falcón A, Olivera BM, Maillo M. 2007. I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: Peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides* 28: 18-23.
5. Aguilar MB, Luna-Ramírez KS, Echeverría D, Falcón A, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP, Maillo M. 2008. Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-

- containing FMRamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides* 29: 186-195.
6. Aguilar MB, Flores-Torres A, Batista CVF, Falcón A, López-Vera E, Heimer de la Cotera EP. 2009. Structural characterization of five post-translationally modified isomorphs of a novel putative δ -conotoxin from the vermivorous snail *Conus delessertii* from the Mexican Caribbean Sea. *Peptides* 30: 458-466.
 7. Aktimur A, Gabriel MA, Gailani D, Toomey JR. 2003. The factor IX γ -carboxyglutamic acid (Gla) domain is involved in interactions between factor IX and factor XIa. *J. Biol. Chem.* 278: 7981–7987.
 8. Azam L, Dowell C, Watkins M, Stitzel JA, Olivera BM, McIntosh JM. 2005. α -Conotoxin Bu1A, a novel peptide from *Conus bullatus* distinguishes among neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 280: 80-87.
 9. Bandyopadhyay PK, Garrett JE, Shetty RP, Keate T, Walker CS, Olivera BM. 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: 1264–1269.
 10. Bingham JP, Mitsunaga E, Bergeron ZL. 2010. Drugs from slugs-Past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chem. Biol. Interact.* 183: 1-18.
 11. Buczek O, Yoshikami D, Watkins M, Bulaj G, Jimenez EC, Olivera BM. 2005. Characterization of D-amino-acid-containing excitatory conotoxins and redefinition of the I-conotoxin superfamily. *FEBS J.* 272: 4178–4188.
 12. Conticello SG, Gilad Y, Avidan N, Ben-Asher E, Levy Z, Fainzilber M. 2001. Mechanisms for evolving hypervariability: The case of conopeptides. *Mol. Biol. Evol.* 18: 120-131.
 13. Conticello SG, Kowalsman ND, Jacobsen C, Yudkovsky G, Sato K, Elazar Z, Petersen CM. 2003. The prodomain of a secreted hydrophobic mini-protein facilitates its export from the endoplasmic reticulum by hitchhiking on sorting receptors. *J. Biol. Chem.* 278: 26311-26314.
 14. Craig AG. 2000. The characterization of conotoxins. *J. Toxicol. Toxin Reviews* 19: 53-93.

15. Craig AG, Bandyopadhyay P, Olivera BM. 1999. Post-translationally modified peptides from *Conus* venoms. *Eur. J. Biochem.* 264: 271-275.
16. Duda Jr. TF, Kohn AJ. 2005. Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34: 257–272.
17. Duda Jr TF, Bolin MB, Meyer CP, Kohn AJ. 2008. Hidden diversity in a hyperdiverse gastropod genus: Discovery of previously unidentified members of a *Conus* species complex. *Mol. Phyl. Evol.* 49: 867–76.
18. Fainzilber M, Kofman O, Zlotkin E, Gordon D. 1994. A new neurotoxin receptor site on the sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channels inactivation in molluscs and acts as an antagonist in rat brain. *J. Biol. Chem.* 269: 2574-2580
19. Fainzilber M, Lodder JC, Kits KS, Kofman O, Vinnitsky I, Van Rietschoten E, Zlotkin E, Gordon D. 1995. A new conotoxin affecting sodium current inactivation interacts with the δ -conotoxin receptor site. *J. Biol. Chem.* 270: 1123-1129.
20. Fainzilber M, Nakamura T, Lodder JC, Zlotkin E, Kits KS, Burlingame AL. 1998. γ -conotoxin-PnVIIA, a γ -carboxyglutamate-containing peptide agonist of neural pacemaker cation currents. *Biochemistry* 37: 1470-1477.
21. Farrell RE. 2010. RNA methodologies a laboratory guide for isolation and characterization. 4th Ed., Academic Press. EEUU, pág. 147.
22. Fujiwara H, Ishikawa H. 1986. Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. *Nucleic Acids Res.* 14: 6393-6401.
23. Gray WR, Olivera BM, Cruz LJ. 1988. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Annu. Rev. Biochem.* 57:665-700
24. Halai R, Craik DJ. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 26: 526-536.

25. Hooper D, Lizaran MB, Schoenfeld R, Cook B, Cruz LJ, Olivera BM, Bandyopadhyay P. 2000. Post-translational modification: a two-dimensional strategy for molecular diversity of *Conus* peptides. En: Fields GB, Tam JP and Barany G Dordrecht (Eds.), Peptides for the New Millennium: Proceedings of the Sixteenth American Peptide Symposium. The Netherlands: Kluwer Academic.
26. Kaas Q, Westermann JC, Craik DJ. 2010. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon* 55: 1491-1509.
27. Kang J, Low W, Norberg T, Meisenhelder J, Hasson K, Stenflo J, Zhou GP, Imperial J, Olivera BM, Rigby AC, Craig AG. 2004. Total chemical synthesis and NMR characterization of the glycopeptide tx5a, a heavily post-translationally modified conotoxin, reveals that the glycan structure is a-D-Gal-(1->3)-a-D-Gal NAc. *Eur. J. Biochem.* 271: 4939–4949.
28. Kohn AJ. 1966. Food specialization in *Conus* in Hawaii and California. *Ecology* 47: 1041-1043.
29. Kohn AJ, Saunders PR, Wiener S. 1960. Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 90: 706-725.
30. Kraus NJ, Corneli PS, Watkins M, Bandyopadhyay PK, Seger J, Olivera BM. 2011. Against expectation: A short sequence with high signal elucidates cone snail phylogeny. *Mol. Phyl. Evol.* 58: 383-389.
31. Lizaran MB, Hooper D, Corpuz GP, Ramilo CA, Bandyopadhyay P, Cruz LJ. 2000. The spasmodic peptide defines a new conotoxin superfamily. *Biochemistry* 39: 1583–1588.
32. López-Vera E, Heimer de la Cotera EP, Maillo M, Riesgo-Escovar JR, Olivera BM, Aguilar MB. 2004. A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). *Toxicon* 43: 365-374.
33. López-Vera E, Aguilar MB, Schiavon E, Marini C, Ortiz E, Restano-Cassulini R, Batista CVF, Possani LD, Heimer de la Cotera EP, Peri F, Becerril B, Wanke E.

- 2007a . 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. 15: 3972-3985.
34. López-Vera E, Jacobsen RB, Ellison M, Olivera BM, Teichert RW. 2007b. A novel alpha conotoxin (α -PIB) isolated from *C. purpurascens* is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. Toxicon 49: 1193–1199.
35. Luna-Ramírez KS, Aguilar MB, Falcón A, Heimer de la Cotera EP, Olivera BM, Maillo M. 2007. An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. Peptides 28: 24-30.
36. Maillo M, Aguilar MB, López-Vera E, Craig AG, Bulaj G, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. 2002. Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. Toxicon 40: 401-407.
37. McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, Yoshikami D. 1987. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:4327-4331
38. McIntosh JM, Olivera BM, Cruz LJ, Gray WR. 1984. γ -Carboxyglutamate in a neuroactive toxin. J. Biol. Chem. 270: 16796-16802.
39. McIntosh JM, Jones RM. 2001. Cone venom—from accidental stings to deliberate injections. Toxicon 39: 1447–1451.
40. Milne TJ, Abbenante G, Tyndall JD, Halliday J, Lewis RJ. 2003. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. J. Biol. Chem. 278: 31105–31110.
41. Myers RA, Cruz JL, River J, Olivera BM. 1993. *Conus* peptides as chemical probes for receptors and ion channels. Chem. Rev. 93: 1923-1936.
42. Norton RS, Olivera BM. 2006. Conotoxins down under. Toxicon 48:780–798.

43. Ogino K, Eda-Fujiwara H, Fujiwara H, Ishikawa H. 1990. What causes the aphid 28S rRNA to lack the hidden break?. *J. Mol. Evol.* 30: 509-513.
44. Olivera BM. 1997. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years on neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell.* 8:2101-2109
45. Olivera BM. 2002. *Conus* venom peptides: reflections from the biology of clades and species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 25–42.
46. Olivera BM. 2006. *Conus* peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* 281: 31173–31177.
47. Olivera BM, Cruz LJ. 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 39: 7–14.
48. Olivera BM, Cruz LJ, de Santos V, LeCheminant GW, Griffin D, Zeikus R, McIntosh JM, Gaylean R, Varga J, Gray WR, Rivier J. 1987. Neuronal calcium channel antagonist. Discrimination between calcium channel subtypes using ω -conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry* 26: 2086-2090.
49. Olivera BM, Rivier J, Clark C, Ramilo CA, Corpuz GP, Abogadie FC, Mena EE, Woodward SR, Hillyard DR, Cruz LJ. 1990. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249, 257–263.
50. Olivera BM, Rivier J, Scott JK, Hillyard DR, Cruz LJ. 1991. Conotoxins. *J. Biol. Chem.* 266. 22067–22070.
51. Peng C, Wu X, Han Y, Yuan D, Chi C, Wang C. 2007. Identification of six novel T-1 conotoxins from *Conus pulicarius* by molecular cloning. *Peptides* 28: 2116–2124.
52. Santos AD, McIntosh JM, Hillyard DR, Cruz LJ, Olivera BM. 2004. The A superfamily of conotoxins: structural and functional divergence. *J. Biol. Chem.* 279: 17596-17606.
53. Schmidt AE, Bajaj SP. 2003. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 39–45.

54. Shon KJ, Stocker M, Terlau H, Stühmer W, Jacobsen R, Walker C, Grilley M, Watkins M, Hillyard DR, Gray WR, Olivera BM. 1998. J. Biol. Chem. 273:33-38.
55. Stanley TB, Stafford DW, Olivera BM, Bandyopadhyay PK. 1997. Identification of a vitamin K-dependent carboxylase in the venom duct of a *Conus* snail, FEBS Lett. 407: 85–88.
56. Terlau H, Olivera BM. 2004. *Conus* venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiol. Rev. 84: 41–68.
57. Walker C, Steel D, Jacobsen RB, Liraz MB, Cruz LJ, Hooper D, Shetty R, Delacruz RC, Nielsen JS, Zhou LM, Bandyopadhyay P, Craig AG, Olivera BM. 1999. The T-superfamily of conotoxins. J. Biol. Chem. 274: 30664–30671.
58. Wermeling DP. 2005. Ziconotide, an intrathecally administered N-type calcium channel antagonist for the treatment of chronic pain. Pharmacotherapy 25: 1084-1094.
59. West PJ, Bulaj G, Garrett JE, Olivera BM, Yoshikami D. 2002. μ -Conotoxin SmIIIA, a potent inhibitor of tetrodotoxin-resistant sodium channels in amphibian sympathetic and sensory neurons. Biochemistry 41: 15388-15393.
60. Yuan DD, Han YH, Wang CG, Chi CW. 2007. From the identification of gene organization of α conotoxins to the cloning of novel toxins. Toxicon. 49: 1135-1149
61. Zamora-Bustillos R, Aguilar MB, Falcón A. 2010. Identification, by molecular cloning, of a novel type of I₂-superfamily conotoxin precursor and two novel I₂-conotoxins from the worm-hunter snail *Conus spurius* from the Gulf of México. Peptides 31: 384-393.
62. Zamora-Bustillos R, Aguilar MB, Falcón A, Heimer de la Cotera EP, 2009. Identification, by RT-PCR, of four novel T-1 superfamily conotoxins from the vermivorous snail *Conus spurius* from the Gulf of México. Peptides 30: 1396-1404.

63. Zugasti-Cruz A, Maillo M, López-Vera E, Falcón A, Heimer de la Cotera EP, Olivera BM, Aguilar MB. 2006. Amino acid sequence and biological activity of a γ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*. *Peptides* 27: 506-511.
64. Zugasti-Cruz A, Aguilar MB, Falcón A, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. 2008. Two new 4-Cys conotoxins (framework 14) of the vermivorous snail *Conus austini* from the Gulf of Mexico with activity in the central nervous system of mice. *Peptides* 29: 179-185.

Libros

65. Keen AM. 1971. Sea shells of tropical West America. 2th edit. Stanford University Press, Stanford.
66. Röckel D, Korn W, Kohn AJ. 1995. Manual of the Living Conidae. Vol. I, Indo-Pacific. Christa-Hemmen Verlag, Wiesbaden.
67. Vaught KC. 1989. A classification of living mollusca. American Malacologist, Inc. Melbourne, Fla.

Páginas Web

68. ConoServer: <http://www.ConoServer.com>
69. EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>
70. FinchTV: <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>
71. MEGA 5: <http://www.megasoftware.net/>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de algunas especies de caracoles cono.	3
Figura 2. Esquema de un caracol cono.	3
Figura 3. Esquema del aparato venenoso.	4
Figura 4. Caricatura representativa de dos diferentes formas en que los conus utilizan sus toxinas.	5
Figura 5. Fotografías de microscopia de barrido electrónico de dientes radulares.	6
Figura 6. Clasificación general de los conopéptidos.	7
Figura 7. Diagrama de conducción del dolor neuropático.	8
Figura 8. Modelo general de los precursores de conotoxinas.	11
Figura 9. Esquema de la síntesis, maduración y clasificación de conopéptidos.	12
Figura 10. Conus nux.	16
Figura 11 Ejemplo de alineación de nucleótidos de conotoxinas de la superfamilia T	22
Figura 12. Electroforesis de ARN _{total}	23
Figura 13. Electroforesis de productos de PCR con oligonucleótidos para la superfamilia A. ...	24
Figura 14. Secuencias de las conotoxinas de la Superfamilia A encontradas en el caracol C. nux.	25
Figura 15. Alineación de las secuencias de nucleótidos de las conotoxinas Nu1.2 a Nu1.5.	26
Figura 16. Árboles filogenéticos de la superfamilia A.	27
Figura 16 (continuación).	28
Figura 17. Electroforesis de productos de PCR con oligonucleótidos para la superfamilia T.	29
Figura 18. Secuencias de las conotoxinas de la Superfamilia T encontradas en el caracol C. nux.	30
Figura 19. Alineación de las secuencias de nucleótidos de las conotoxinas Nu5.1 a Nu5.3.	31
Figura 20. Alineación de las secuencias de nucleótidos de las conotoxinas Nu5.5 y Nu5.6.	33
Figura 21 (continuación).	34
Figura 22. Secuencias de las conotoxinas de la Superfamilia O1 encontradas en el caracol C. nux.	35
Figura 23. Alineación de las secuencias de nucleótidos de los precursores de la conotoxina Nu6.3.	35
Figura 24. Árboles filogenéticos de la superfamilia O.	36
Figura 24 (continuación).	37
Figura 25. Alineamiento de las secuencias O reportadas en el “ConoServer”	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de α -conotoxinas catalogados en sus diferentes subfamilias. _____	9
---------------------------------------------------------------------------------------------	---