



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA  
CONOTOXINA RECOMBINANTE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**OLMO ESTRADA SOUR**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR  
PÉREZ  
2013**



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.

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>i.i</b>	<b>Phylum Mollusca .....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>i.i.i</b>	<i>Generalidades .....</i>	<i>- 4 -</i>
<b>i.i.ii</b>	<i>Plan corporal.....</i>	<i>- 5 -</i>
<b>i.i.iii</b>	<i>Filogenia y Taxonomía.....</i>	<i>- 5 -</i>
<b>i.ii</b>	<b>Clase Gasterópoda.....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>i.ii.i</b>	<i>La concha .....</i>	<i>- 8 -</i>
<b>i.ii.ii</b>	<i>La cabeza.....</i>	<i>- 9 -</i>
<b>i.ii.iii</b>	<i>El pie.....</i>	<i>- 9 -</i>
<b>i.ii.iv</b>	<i>Alimentación.....</i>	<i>- 10 -</i>
<b>i.ii.v</b>	<i>Sistema circulatorio e intercambio gaseoso .....</i>	<i>11</i>
<b>i.ii.vi</b>	<i>Estructuras de excreción.....</i>	<i>12</i>
<b>i.ii.vii</b>	<i>Sistema nervioso .....</i>	<i>12</i>
<b>i.ii.viii</b>	<i>Reproducción.....</i>	<i>13</i>
<b>i.iii</b>	<b>Biología del género <i>Conus</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>i.iii.i</b>	<i>Estrategias de alimentación .....</i>	<i>14</i>
<b>i.iii.ii</b>	<i>Ecología y distribución geográfica.....</i>	<i>15</i>
<b>i.iii.iii</b>	<i>Especies mexicanas de cónidos.....</i>	<i>16</i>
<b>i.iii.iv</b>	<i>Evolución y Filogenia de los cónidos.....</i>	<i>16</i>
<b>i.iii.v</b>	<i>Evolución de los conopéptidos .....</i>	<i>17</i>
<b>i.iii.vi</b>	<i>Relación histórica de los cónidos con el hombre.....</i>	<i>18</i>
<b>i.iii.vii</b>	<i>El aparato venenoso y el veneno .....</i>	<i>19</i>
<b>i.iii.viii</b>	<i>El veneno y el proceso de envenenamiento .....</i>	<i>19</i>
<b>i.iv</b>	<b>Conotoxinas .....</b>	<b>21</b>
<b>i.iv.i</b>	<i>Superfamilias de conotoxinas .....</i>	<i>23</i>
<b>i.iv.ii</b>	<i>Modificaciones postraduccionales .....</i>	<i>25</i>
<b>i.iv.iii</b>	<i>Nomenclatura de las conotoxinas .....</i>	<i>27</i>
<b>i.iv.iv</b>	<i>Biotecnología de los conopéptidos.....</i>	<i>27</i>
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>30</b>
	<i>Conus spurius .....</i>	<i>30</i>
	<i>La conotoxina sr11a.....</i>	<i>31</i>
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>V.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>

v.i	<i>Replicación del vector pBSK LE216</i> .....	35
v.ii	<i>Replicación del vector pET22b</i> .....	35
v.iii	<i>Diseño de los oligonucleótidos</i> .....	35
v.iv	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	35
v.v	<i>Linearización del vector pET22b</i> .....	35
v.vi	<i>Purificación de DNA</i> .....	36
v.vii	<i>Inserción de la secuencia LE216 en el vector pET22b</i> .....	36
v.viii	<i>Secuenciación</i> .....	36
v.ix	<i>Transformación de E. coli con el plásmido recombinante pET22b-LE216</i> .....	36
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
vi.i	<i>Replicación del vector pBSK LE216</i> .....	37
vi.ii	<i>Replicación del vector pET22b</i> .....	41
vi.iii	<i>Diseño de los oligonucleótidos</i> .....	43
vi.iv	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	44
vi.v	<i>Linearización del vector pET22b</i> .....	45
vi.vi	<i>Purificación de DNA</i> .....	46
vi.vii	<i>Inserción de la LE216 en el vector pET22b</i> .....	47
vi.viii	<i>Secuenciación</i> .....	48
vi.i	<i>Transformación de E. coli con el plásmido recombinante pET22b-LE216</i> .....	49
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>50</b>
	<i>Conclusiones</i> .....	50
	<i>Perspectivas</i> .....	50
<b>VIII.</b>	<b>PROTOSCOLOS</b> .....	<b>51</b>
viii.i	<i>Cuantificación de DNA en UV</i> .....	51
viii.ii	<i>Electroforesis de DNA en gel de agarosa 1%</i> .....	51
viii.iii	<i>Método de lisis alcalina</i> .....	51
viii.iv	<i>Plasmid Midi y Maxi Prep Kit (QIAGEN®)</i> .....	52
viii.v	<i>Preparación de células competentes con el método de RbCl</i> .....	53
viii.vi	<i>PureLink Quick Gel Extraction Kit (INVITROGEN)</i> .....	54
viii.vii	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> .....	54
viii.viii	<i>Reacciones con Endonucleasas de Restricción</i> .....	55
viii.ix	<i>Reacción de Ligación</i> .....	56
viii.x	<i>Siembra de bacterias en medio selectivo (Ampicilina 1:1000)</i> .....	56
viii.xi	<i>Transformación de células competentes por choque térmico</i> .....	57
<b>IX.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>57</b>

# I. INTRODUCCIÓN

Los venenos de muchos organismos que incluyen serpientes, arañas, peces y algunas especies de mamíferos, constituyen mecanismos de defensa o armas biológicas para la captura de sus presas.

El veneno de los caracoles predadores marinos pertenecientes al género *Conus* contiene una fuente rica de péptidos biológicamente activos. Estos péptidos (denominados conopéptidos) son ligandos potentes de canales iónicos y receptores acoplados a proteínas G, por lo cual, se presentan como herramientas farmacológicas para la investigación neurofisiológica y como fármacos potenciales.

Sin embargo, la aplicación de los conopéptidos en la investigación se encuentra limitada por la escasa obtención de éstos a partir de sus fuentes naturales, la cual en muchos casos, resulta insuficiente o inviable. Debido a esto, la producción de péptidos a través de técnicas de DNA recombinante es una estrategia efectiva para la obtención de los conopéptidos en cantidades apreciables (1 mg), para su posterior utilización en los ensayos biológicos y moleculares (Zhang *et al.*, 2011).

## **i.i Phylum Mollusca**

### ***i.i.i Generalidades***

Existen descritas cerca de 50,000 especies de moluscos actuales y 60,000 fósiles, aunque se estima que sólo corresponden a la mitad del total de las especies existentes (Brusca & Brusca, 2003).

Los moluscos incluyen muchos de los invertebrados mejor conocidos. Las conchas de algunos de éstos han sido colectadas desde tiempos antiguos y utilizadas como herramientas, contenedores, instrumentos musicales, moneda, fetiches y objetos decorativos. Las formas más conocidas son las almejas, las ostras, los calamares, los pulpos y los caracoles (Rupert, 1969). Actualmente, las naciones con zonas costeras comercian con millones de toneladas de moluscos para la alimentación (Brusca & Brusca, 2003).

### *i.i.ii Plan corporal*

- Protostomados celomados, sin segmentación, con simetría bilateral (o secundariamente asimétricos).
- El celoma está limitado a pequeños espacios alrededor de los nefridios, corazón y parte del intestino.
- La principal cavidad del cuerpo es el hemocele (sistema circulatorio abierto).
- Las vísceras están concentradas dorsalmente en una masa visceral.
- El cuerpo está recubierto por una gruesa capa epidermo-cuticular de piel, denominada manto, que forma una cavidad (la cavidad del manto) que alberga los ctenidios, osfradios, nefridioporos, gonoporos y el ano.
- El manto posee glándulas que secretan espículas epidérmicas calcáreas, placas o conchas.
- El corazón reside en una cámara pericárdica, con ventrículos y aurículas separadas.
- Poseen un pie muscular grande y bien definido, frecuentemente plano o lenguado.
- Región bucal con rádula.
- Intestino completo, con una especialización regional bien definida, incluyendo un extenso ciego digestivo.
- Con metanefridios grandes y complejos.
- Embriogenia típica de Protostomados.
- Con larva trocófora y generalmente larva velígera.

### *i.i.iii Filogenia y Taxonomía*

El registro fósil se extiende a 500 millones de años y sugiere que los moluscos se originaron durante el Precámbrico. Diversas teorías sobre este origen han sido propuestas con los años, las cuales caen generalmente en tres categorías: i) los moluscos se originaron a partir de un gusano plano ancestral; ii) el antepasado consiste en un protostomado celomado no segmentado; iii) o un ancestro segmentado, probablemente ancestro común de los anélidos. La primera teoría, denominada “Teoría de los turbelarios”, se basa en la homología y similitud en el tipo de locomoción entre moluscos y gusanos planos, sugiriendo que los moluscos fueron el primer grupo de celomados protostomados o que comparten un ancestro común con los primeros celomados. Sin embargo, muchos autores consideran que la cavidad del pericardio en los moluscos primitivos corresponde a la de un ancestro que ya poseía un celoma.

La segunda teoría se fundamenta en estudios ontogenéticos y propone que el grupo hermano de los moluscos es el de los sipuncúlidos. La tercera teoría implica que los primeros moluscos eran celomados con segmentación similar a la de los anélidos. Esto se basa en estudios moleculares de rRNA 18s (Brusca & Brusca, 2003).

Las figuras siguientes muestran la filogenia y taxonomía entre las siete clases del phylum:

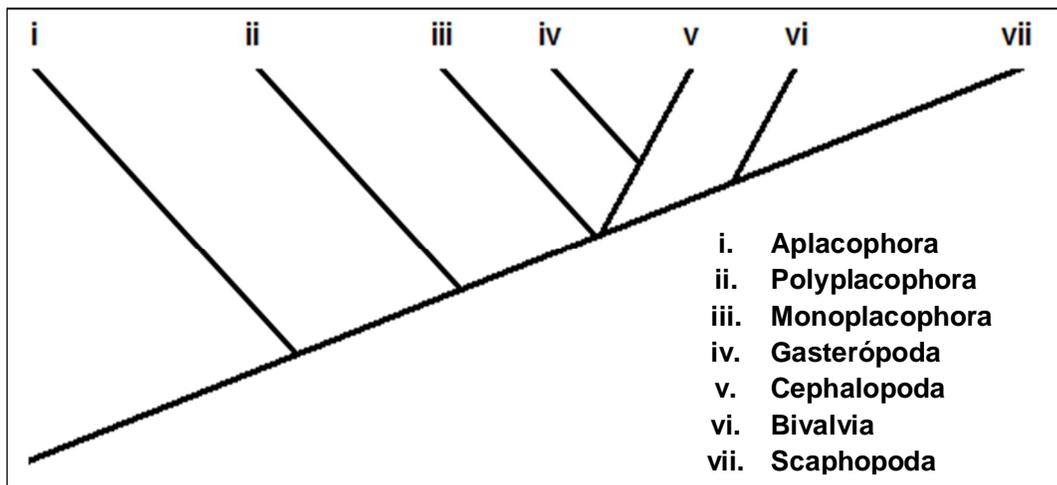


Figura 1. Filogenia del Phylum Mollusca.

## Phylum Mollusca

### Clase Aplacophora

Subclase Chaetodermomorpha

Subclase Neomeniomorpha

### Clase Monoplacophora

### Clase Polyplacophora

Orden Lepidopleurida

Orden Ischnochitonida

Orden Acanthochitonida

### Clase Gasterópoda

Subclase Prosobranchia

- Orden Archaeogasterópoda
- Orden Mesogasterópoda
- Orden Neogasterópoda
- Subclase Opisthobranchia\*
- Subclase Pulmonata
  - Orden Archaeopulmonata
  - Orden Basommatophora
  - Orden Stylommatophora
  - Orden Systellommatophora
- Clase Bivalvia
  - Subclase Protobranchia
    - Orden Nuculida
    - Orden Solemyida
  - Subclase Lamellibranchia
    - Superorden Filibranchia
    - Superorden Eulamellibranchia
      - Orden Paleoheterodonta
      - Orden Veneroida
      - Orden Myoida
  - Subclase Anomalodesmata
- Clase Scaphopoda
- Clase Cephalopoda
  - Subclase Nutiloidea
  - Subclase Coleoidea
    - Orden Sepioida
    - Orden Teuthoida
    - Orden Octopoda
    - Orden Vampyromorpha

\* Se considera un taxón polifilético, pero todavía es utilizado en la clasificación tradicional.

## **i.ii Clase Gasterópoda**

Comprende la clase más diversa entre los moluscos con 40 000 especies actuales y 15 000 en el registro fósil. Incluye a todos los caracoles y babosas del hábitat marino, agua dulce y medio terrestre. La principal sinapomorfía del grupo consiste en la torsión de la masa visceral sobre el pie y la cabeza durante el desarrollo.

Presentan área cefálica (cabeza), un pie musculoso ventral y una concha dorsal (que puede reducirse o perderse en algunas especies). La mayoría son organismos herbívoros, aunque algunos son carnívoros depredadores o carroñeros. La cavidad del manto se sitúa en la región anterior. Como consecuencia de la torsión pierden el osfradio y ctenidio derechos (Prosobranquios), evitando así que el ano contamine las estructuras sensoriales; otros pierden ambos ctenidios (Opisthobranquios) y respiran a través de branquias tegumentarias posteriores. En el caso de las formas terrestres (Pulmonados) se pierden los ctenidios y la cavidad del manto se ha convertido en pulmón. Son asimétricos en consecuencia del proceso de torsión; tienen un sistema nervioso muy desarrollado; pueden ser dioicos o hermafroditas, en ambos casos presentando una sola gónada (Brusca & Brusca, 2003).

Los gasterópodos actuales se dividen en tres subclases:

- **Prosobranchia:** Contiene a la mayor parte de las especies y se caracteriza por que las branquias, el ano y la cavidad del manto se encuentran en la parte anterior del cuerpo.
- **Opisthobranchia:** Presentan una reducción o ausencia de la concha y muchas especies han adoptado una simetría bilateral secundaria. Muchos han desarrollado una existencia pelágica o natatoria.
- **Pulmonata:** Predominantemente terrestres y de agua dulce. La cavidad del manto se ha modificado en un saco respiratorio; en algunos casos carecen de concha. Todos son hermafroditas. No presentan estados larvarios durante el desarrollo.

### ***i.ii.i La concha***

La característica externa más evidente de los gasterópodos es la concha. Es una estructura cónica compuesta de espiras tubulares que contienen en su interior la masa visceral del individuo. La concha protege los órganos internos subyacentes y se origina como producto de secreción del epitelio superficial del manto (Rupert & Barnes, 2003). Su formación comienza durante el estadio larval, trascendiendo de una capa plana a una espiral y finalmente a una forma cónica.

La concha está conformada por tres capas (perióstraco, mesóstraco y endóstraco) y se compone principalmente de carbonato de calcio que se precipita en forma de sales de calcita y aragonita (Brusca & Brusca, 2003).

Se denomina concha *dextrógira* cuando la torsión se desarrolla en el sentido de las manecillas del reloj y *levógira* si es en contrasentido. En algunas especies la concha se ha reducido o está ausente.

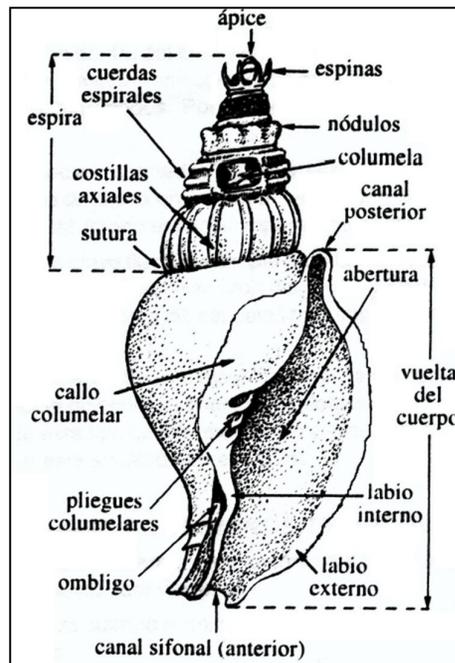


Figura 2. Esquema de la concha de un gasterópodo.

### ***i.ii.ii La cabeza***

El área cefálica se encuentra bien desarrollada, la boca es más o menos terminal y contiene en su interior una rádula que puede presentar formas muy variadas acorde con el tipo de alimentación. Algunos depredadores como los cónidos, presentan una probóscide distensible.

Casi todos los gasterópodos tienen un par de tentáculos con ojos o estructuras quimiorreceptoras en sus ápices (Meiglitsch, 1972).

### ***i.ii.iii El pie***

Es una estructura muscular ventral que permite la locomoción. Secreta una gran cantidad de soluciones mucosas. Los músculos forman una estructura que se adhiere a la concha y al manto ventral en distintos ángulos y actúa en armonía para levantar y bajar la base del pie o para acortarse en dirección vertical o transversal. Las ondas de contracción hacen que el organismo se mueva de atrás hacia delante (ondas directas) o de adelante hacia atrás (ondas retrógradas). Sin embargo, en algunas especies los movimientos presentan una complejidad mayor (Brusca & Brusca, 2003).

### *i.ii.iv Alimentación*

La enorme radiación adaptativa de los gasterópodos ha desembocado en una variedad de hábitos de alimentación. Presentan un aparato digestivo completo compuesto por boca, cavidad bucal (donde se encuentra la rádula), esófago, estómago, intestino y ano. Existen glándulas asociadas a la parte anterior del aparato digestivo que secretan enzimas y lubricante sobre la rádula, denominadas glándulas salivales.

La gran mayoría de los gasterópodos son micrófagos, raspando con sus rádulas las superficies de rocas, algas o animales sésiles y objetos similares, pero algunos otros se alimentan del detritus o son carnívoros depredadores o carroñeros.

En términos alimenticios, los gasterópodos más desarrollados corresponden al grupo de los cónidos. En éstos la rádula se ha modificado como una serie de arpones huecos cuya función consiste en inyectar una potente mezcla de toxinas en la presa (Brusca & Brusca, 2003).

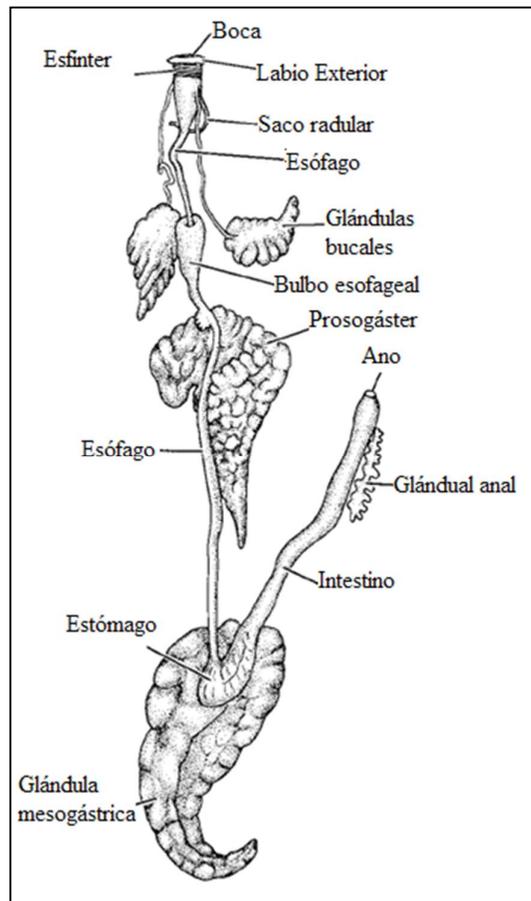


Figura 3. Esquema del sistema digestivo de un gasterópodo. Modificado de Brusca & Brusca, 2003.

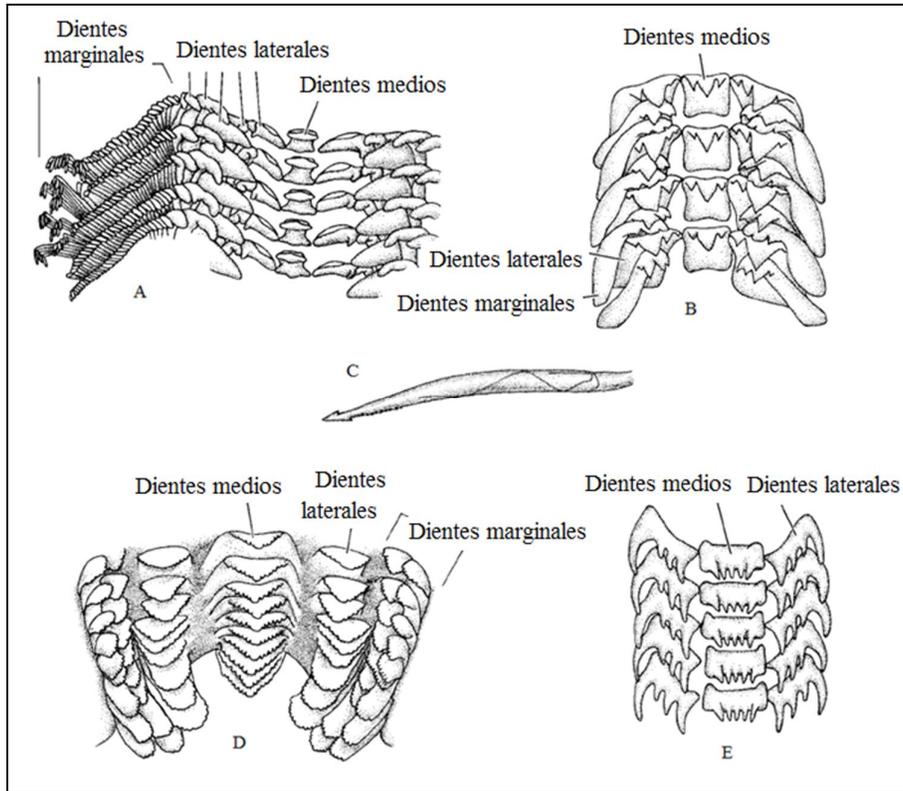


Figura 4. Algunos tipos de rádulas. A: Ripidoglosa; B, D: Tenioglosa; C: **Toxoglosa (cónidos)**; E: Raquiglosa. Modificado de Brusca & Brusca, 2003.

#### *i.ii.v Sistema circulatorio e intercambio gaseoso*

Todos los gasterópodos presentan un sistema circulatorio abierto (denominado hemocele) dentro del cual se encuentran las branquias. En el caso de los pulmonados, la cavidad del manto se ha desarrollado como un saco aéreo que permitió la radiación de los gasterópodos al medio terrestre.

Al igual que otros phyla de invertebrados, la hemolinfa comprende una serie de células denominadas amebocitos que tiene una función análoga a los leucocitos de los vertebrados.

El corazón se localiza dorsalmente en la cámara pericárdica y está compuesto por un par de atrios y un solo ventrículo (Brusca & Brusca, 2003).

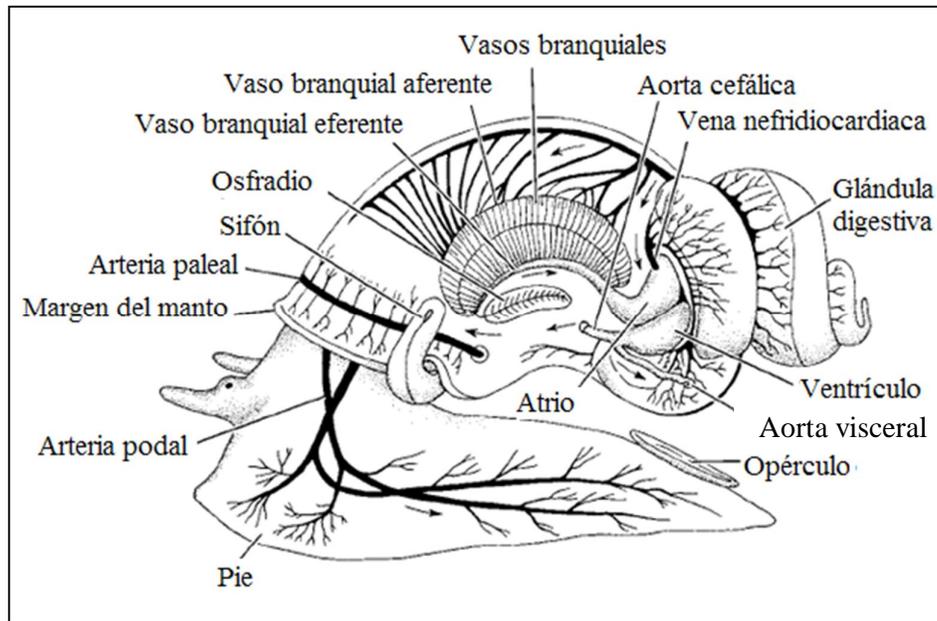


Figura 5. Sistema circulatorio de un gasterópodo. Modificado de Brusca & Brusca, 2003.

#### *i.ii.vi Estructuras de excreción*

Las estructuras básicas de excreción comprenden un par de metanefridios; el nefrostoma se abre al celoma pericardial vía el ducto renopericardio, y el nefridioporo descarga en la cavidad del manto cercana al ano (Brusca & Brusca, 2003).

#### *i.ii.vii Sistema nervioso*

El sistema nervioso comprende tres pares de ganglios cercanos al esófago. Los ganglios cerebrales se encuentran por encima del esófago, los ganglios pedales son anteriores a la línea media del pie y los ganglios pleurales se distribuyen lateralmente. Todos los ganglios están interconectados formando un triángulo neural a cada costado del organismo. Un par de ganglios bucales están conectados a los cerebrales. Un par de cordones nerviosos se extienden desde los ganglios pedales hacia el pie. Otro par de nervios paliovisceralos provienen de los ganglios pedales hacia la región visceral (Meiglitsch, 1972).

Todos los gasterópodos poseen diversas combinaciones de tentáculos, fotoreceptores, estatocistos y osfradios (Brusca & Brusca, 2003).

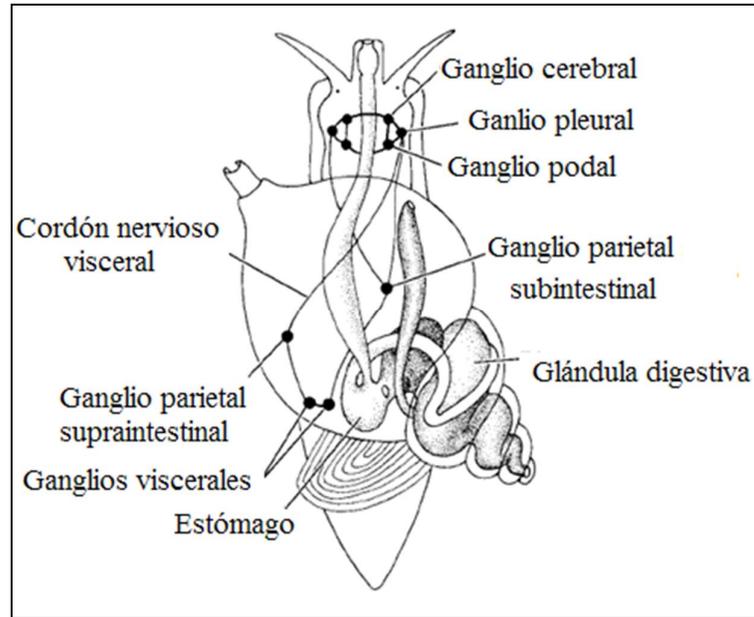


Figura 6. Sistema nervioso de los gasterópodos. Modificado de Brusca & Brusca, 2003.

### *i.ii.viii Reproducción*

El aparato reproductor consiste en una única gónada conectada al aparato visceral. El gonoducto se desarrolla en asociación con el nefridio derecho. Los gasterópodos pueden ser dioicos o hermafroditas (Brusca & Brusca, 2003).

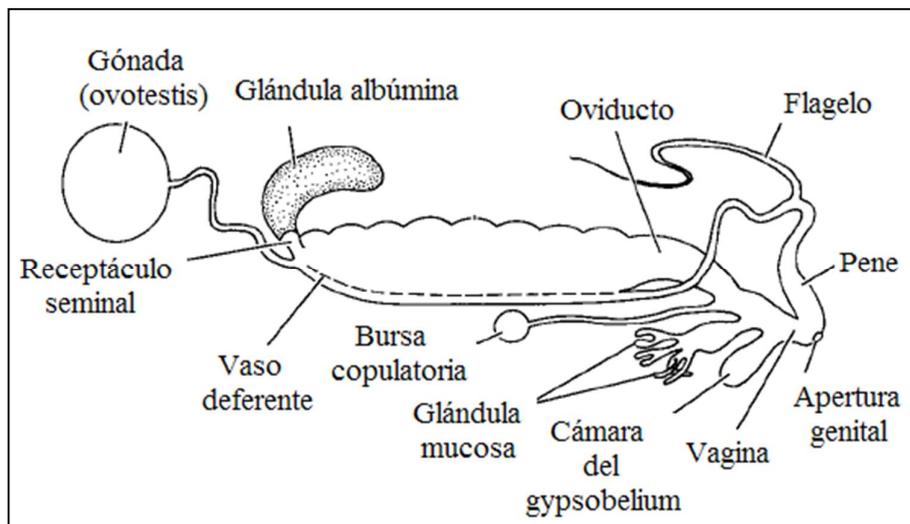


Figura 7. Aparato reproductor de un gasterópodo hermafrodita. Modificado de Brusca & Brusca, 2003.

### ***i.iii* Biología del género *Conus***

Los caracoles pertenecientes al género *Conus* (Familia Conidae) son el grupo de predadores marinos más exitoso y diverso que existe (Olivera, 1997), conformado por más de 500 especies que habitan en las aguas marinas tropicales de todo el mundo.

Todos los miembros de este grupo utilizan veneno como arma principal para capturar a su presa y poseen un sistema venenoso especializado (Terlau & Olivera, 2004). El veneno es expelido a través del lumen dental hacia las capas dérmicas de la presa a una velocidad de 200m/s. Biológicamente, este aparato venenoso único al cual los cónidos deben su éxito evolutivo es una adaptación homogénea a lo largo de todo el género.

#### ***i.iii.i* Estrategias de alimentación**

Los cónidos se dividen en tres grupos de acuerdo con el tipo de presa que consumen: El grupo más grande -los vermívoros- se alimenta principalmente de poliquetos, aunque algunas especies también tienen como presas equiuroideos y hemicordados. Los molusquívoros, segundo grupo en tamaño, se alimentan de otros gasterópodos. Finalmente, el grupo más notable es el de los piscívoros, que posee venenos que inmovilizan a los peces rápidamente.

A pesar de que todos los cónidos arponean a su presa para inyectar su veneno, los piscívoros lo hacen una sola vez mientras que algunas especies de molusquívoros lo hacen en repetidas ocasiones, habiendo sido observadas hasta media docena de piquetes para capturar a una sola presa.

Los piscívoros utilizan dos estrategias distintas para capturar sus presas. La primera se caracteriza por una probóscide extendida y un aparato lingual que contiene la rádula, donde el cónido expulsa violentamente la rádula atravesando al pez, le inyecta el veneno y lo arrastra hacia la cavidad bucal. En algunos casos la presa puede ser de igual tamaño al del cónido en cuestión. La digestión comienza de inmediato y las partes blandas del pez son almacenadas en un saco mucoso en el interior del rostro. Posterior a la digestión, se forma un bolo de escamas y huesos el cual regurgita junto a la rádula a través de la cavidad bucal. Este comportamiento ha sido observado en cautiverio en las especies *C. magus*, *C. purpurascens*, *C. striatus*, *C. ermineus* y *C. catus*.

La otra estrategia que se observa en *C. geographus* y *C. tulipa* consiste en atrapar al pez con la probóscide extendida y una vez dentro de la cavidad bucal, penetrarlo con la rádula. En el caso de *C. tulipa* participan proyecciones ciliares bucales para contribuir a la deglución.

Los molusquívoros se alimentan de una gran variedad de moluscos marinos incluyendo gasterópodos pertenecientes a los géneros *Volutomitra*, *Trochus* y *Cypraea*, así como de otros cónidos (aunque esto puede estar relacionado con la defensa territorial). Después de que la presa es arponeada con

la rádula, es orientada de manera que el rostro del cónido pueda insertarse en la apertura de la concha de la presa para iniciar su extracción y posterior digestión.

Los vermívoros son el grupo más numeroso entre los cónidos. Se alimentan principalmente de poliquetos y utilizan un modo de alimentación por succión sin involucrar forzosamente el envenenamiento de la presa (Bingham *et al.*, 2010).



Figura 8. *Conus purpurascens* capturando un pez payaso (*Amphiprion sp.*). Tomado de Becker & Terlau, 2008.

### ***i.iii.ii Ecología y distribución geográfica***

La diversidad de los cónidos es mayor en las aguas poco profundas de los mares tropicales, a pesar de que algunas especies se han adaptado a aguas más frías y otras, incluyendo algunas de las de mayor tamaño, solo habitan a profundidades mayores a los 100 m.

Alrededor del 60% de éstas se encuentran en la región Indo-Pacífica (IP) que comprende la región tropical y subtropical del océano Índico y el oeste y centro tropicales del océano Pacífico. Esta región es por mucho la provincia biogeográfica más grande, extendiéndose longitudinalmente a lo largo de medio planeta y alrededor de 60° de latitud, por lo que comprende un cuarto del área oceánica mundial. A lo largo de esta región, un solo arrecife coralino puede contener hasta 30 especies distintas de cónidos.

Más de 30 especies de cónidos están reportadas para cada una de las otras tres provincias marinas: el Pacífico Este (PE), extendiéndose desde Baja California hasta Ecuador; el Atlántico Oeste (AO), desde las Bermudas, el sur de Florida y el Golfo de México hasta Río de Janeiro; y el Atlántico Este (AE), que

abarca desde Cabo Verde hasta Angola. Alrededor de 10 especies están reportadas en la región sudafricana, desde Transkei hasta la Provincia Occidental del Cabo (Duda Jr. & Khon, 2005).

La mayoría de los cónidos son nocturnos. A pesar de tener dos ojos pedunculados, su visión es pobre y utilizan principalmente capacidades quimiosensoriales para rastrear a su presa (Terlau & Olivera, 2004).

A pesar de que su función principal es depredadora, el veneno puede ser utilizado en un amplio espectro de interacciones bióticas como la competencia intraespecífica e interespecífica. Los cónidos son presa de diversos animales dentro de su nicho ecológico (cangrejos, peces y otros gasterópodos) y el uso defensivo del veneno está documentado (Olivera, 2007).

### ***i.iii.iii Especies mexicanas de cónidos***

En las aguas de nuestro país habitan alrededor de 50 especies de cónidos distribuidas en dos provincias: la denominada Provincia Panámica, que corresponde a la costa del Pacífico (*C. brunneus*, *C. princeps*, *C. nux*, *C. purpurascens*, *C. archon*, *C. arcuatus*, *C. dalli*, *C. poormani*, *C. patricius*, *C. perplexus*, *C. regularis*, *C. scalaris*, *C. tomatus*, *C. virgatus*, *C. vittatus*) y la Provincia Caribeña, que abarca el Golfo de México y el Mar Caribe (*C. spurius*, *C. delessertii*, *C. austini*, *C. stimpsoni*, *C. mazei*, *C. villepini*, *C. armiger*, *C. sennottorum*, *C. floridanus*, *C. regius*, *C. granulatus*, *C. dacus*, *C. mus*). Habitan en bentos con fondos rocosos (*C. brunneus*), arenosos (*C. purpurascens*) y lodosos (*C. armiger*), así como en arrecifes coralinos (*C. nux*), desde zonas intermareales (*C. californicus*) y aguas someras (<25m) (*C. princeps*), hasta aguas moderadamente profundas (50-100m) (*C. delessertii*), profundas (100-400m) (*C. spurius*) y muy profundas (>400m) (*C. mazei*), así como zonas de marea en los arrecifes (*C. mus*). Algunas especies son muy comunes (*C. mus*), moderadamente comunes (*C. princeps*) o comunes (*C. spurius*), mientras que otras son poco comunes (*C. austini*), raras (*C. stimpsoni*) o inusuales (*C. mazei*). Algunas especies han sido colectadas en varios estados (*C. spurius*, en Veracruz, Campeche y Yucatán). La mayoría son vermívoras, aunque también se reportan especies piscívoras (*C. purpurascens* y *C. ermineus*) y molusquívoras (*C. dalli*). Todas ellas tienen como depredadores otros moluscos, crustáceos y peces (Flores-Torres, 2009; Trussell & Etter, 2001; Olivera, 2002).

### ***i.iii.iv Evolución y Filogenia de los cónidos***

Todos los caracoles cónidos son incluidos en un mismo género (*Conus*); sin embargo, todos los caracoles venenosos conocidos hasta la fecha, incluidos los cónidos, se agrupan en un taxón mayor, la Superfamilia Conoidea, referida colectivamente como caracoles toxoglosados.

El registro fósil de los toxoglosados sugiere su origen durante el Cretácico, pero los cónidos aparecieron solo después de la extinción masiva a finales de este periodo.

El primer fósil bien caracterizado de un cónido pertenece al Eoceno temprano (hace 55 m.a.), por lo que se considera que al igual muchos otros gasterópodos carnívoros, este grupo se diversificó gracias a las oportunidades ecológicas que resultaron de la extinción masiva del Cretácico – Terciario. La desaparición de muchos grupos de moluscos marinos predadores, particularmente los amonites, hizo posible la primera radiación adaptativa de los cónidos. Una segunda radiación surgida a principios del Mioceno permanece hasta nuestros días (Terlau & Olivera, 2004).

Desde su origen hasta el día de hoy, los cónidos comprenden el más diverso entre los géneros de metazoos marinos. La reconstrucción filogenética de 138 especies de cónidos basada en secuencias de DNA mitocondriales y nucleares revelan dos patrones relacionados a esta diversificación inusualmente rápida: que a partir de los 33 millones de años desde su origen los cónidos divergieron en dos grandes clados y que éstos se diferencian fuertemente en el tamaño de las especies y la proporción de éstas en su distribución geográfica. A pesar de que estos datos se obtuvieron sólo con el 25% de las especies reportadas y están sujetos a variación, se espera que los patrones persistan.

El clado de menor tamaño contiene principalmente especies del PE y AO, así como una del IP. El clado mayor comprende especies de todas las regiones conocidas. Estos patrones sugieren que la migración de los cónidos entre el Atlántico Oeste y el Océano Indico está severamente impedida desde el Oligoceno Inferior, o incluso desde el Eoceno, promoviendo la divergencia del taxón en ambos clados. Sin embargo, debido a la amplia distribución se piensa que estas barreras geográficas fueron ocasionalmente atravesadas (Duda Jr. & Khon, 2005).

### *i.iii.v Evolución de los conopéptidos*

Para explicar la enorme diversidad de conopéptidos hay que considerar las relaciones entre la evolución de los conopéptidos y los nichos ecológicos donde los cónidos se desarrollan. Esto puede ser visto en tres niveles: blanco molecular, organismo y ecosistema.

Al nivel de un blanco molecular individual, existen distintos sitios farmacológicos donde un conopéptido puede actuar. Como un componente clave de la señalización neuronal, la modulación farmacológica de los canales iónicos y receptores celulares debe ser considerada adicionalmente en el contexto de un circuito. Además, a nivel del organismo en su conjunto, existen diversos circuitos que pueden llevar a un mismo efecto fisiológico. Finalmente, a nivel ecosistémico, un amplio espectro de animales pueden ser objetivo del veneno, como son presas, depredadores y competidores. La supervivencia de los cónidos implica que los componentes del veneno actúen en varios animales que comprenden el nicho ecológico (Olivera, 2007).

Por lo tanto, la diversidad farmacológica de los componentes del veneno de los cónidos está dirigida por un proceso evolutivo que involucra: una cantidad variable de sitios en los blancos moleculares; una variedad de blancos

moleculares en cada circuito fisiológico; una multiplicidad de circuitos en un mismo organismo; y una diversidad de organismos presentes en el nicho ecológico.

Todos estos factores han contribuido a la extraordinaria diversidad en los arsenales farmacológicos de los cónidos (Olivera, 2007).

#### *i.iii.vi Relación histórica de los cónidos con el hombre*

La investigación actual sobre los cónidos y sus venenos es la culminación de una larga historia documentada del interés humano en este grupo de moluscos. La impresionante gama de patrones en sus conchas ha atraído el interés del ser humano desde tiempos ancestrales en una gran variedad de culturas.

La primera evidencia de esta relación se remonta a la ciudad de Uru en la antigua Mesopotamia, donde se encontró un collar de conchas de cónidos de 5 000 años de antigüedad. Los romanos ya conocían estos gasterópodos, pero no fue hasta el s. XVIII donde su colección ganó mayor auge, considerándolos como algunos de los objetos naturales más codiciados (Terlau & Olivera, 2004).



Figura 9. Collar artesanal compuesto por conchas de cónidos de 5 000 años de antigüedad. Tomado de Terlau & Olivera, 2004.

Por otra parte, el peligro mortal que representan es otro de los factores que han contribuido a llamar la atención del ser humano en estos organismos. El primer reporte científico de un deceso humano a causa de una picadura de cónido es obra de George Eberhard Rumphius (s. XVII).

En la actualidad los cónidos han ganado relevancia debido a la extremadamente compleja composición molecular de sus venenos; estos componentes se perfilan como poderosas herramientas farmacológicas y son un campo en extremo fértil para la investigación biomédica (Terlau & Olivera, 2004).

### *i.iii.vii El aparato venenoso y el veneno*

El sistema se compone de un ducto de veneno, donde el veneno es sintetizado y almacenado; un bulbo que se piensa es utilizado para la transferencia de veneno a través del ducto; y un diente hueco similar a un arpón, que tiene la función de inyectar el veneno en los tejidos de la presa. Estos dientes crecen y son almacenados en un saco radular; cuando el cónido se dispone a atacar, uno de ellos es transferido a la cavidad bucal. La proyección del diente se lleva a cabo por la contracción de los músculos circulares en la parte anterior de la probóscide, que en la mayoría de los cónidos es larga y distensible (Terlau & Olivera, 2004).

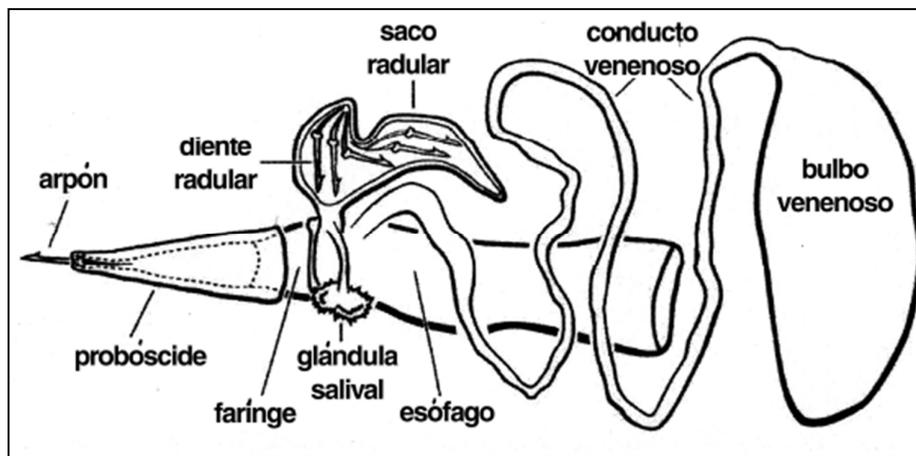


Figura 10. Representación gráfica del aparato venenoso. Modificado de Olivera *et al.* 1990.

### *i.iii.viii El veneno y el proceso de envenenamiento*

El aparato venenoso de los cónidos ha sido objeto de estudio desde principios del siglo XX, sin embargo, se conoce poco sobre el origen de la producción del veneno y los procesos fisiológicos que siguen al envenenamiento.

La composición del veneno de los cónidos es extremadamente compleja. **Cada especie de *Conus* posee un repertorio de entre 100 y 200 compuestos diferentes en sus venenos, denominados conopéptidos**, la mayoría de los cuales son ricos en puentes disulfuro. Además, cada especie tiene su propio repertorio particular de conopéptidos por lo que no existe un conopéptido igual entre las diversas especies. **De este modo, las 500 – 700 especies de cónidos actuales han evolucionado entre 50 000 y 140 000 conopéptidos distintos** (Bingham *et al.*, 2010).

Esta diversidad de moléculas provee una fuente de ligandos potentes con alta selectividad para distintas clases de canales iónicos, receptores y transportadores (Armishaw & Alewood, 2005).

Acorde con su secuencia de residuos de aminoácidos, los conopéptidos pueden dividirse en dos clases: aquellos que presentan puentes disulfuro y los que carecen de ellos (Becker & Terlau, 2008). **Las conotoxinas son aquellas con dos o más puentes disulfuro en su estructura, mientras que el término conopéptido es comúnmente utilizado para referirse a aquellos que presentan uno o ninguno** (Norelle & Craik, 2009).

Además del componente peptídico existe otro tipo de moléculas en los venenos de los cónidos. Sólo dos de éstas han sido identificadas: el neurotransmisor serotonina, en el veneno de *C. imperialis*, y el ácido araquidónico, presente en gran concentración en el veneno de *C. textile*. El caso de la serotonina es único entre todas las especies de cónidos estudiadas, pues sólo en *C. imperialis* está presente esta amina bioactiva en niveles detectables.

Finalmente, algunos polipéptidos de mayor tamaño han sido descritos en los ductos de veneno. Algunos de estos pueden ser importantes para producir la parálisis de la presa, como es el caso de *Conus striatus*, donde un polipéptido de 86 residuos de aminoácidos causa efectos excitotóxicos en peces y ratones. Otros polipéptidos de mayor longitud pueden tener una función transportadora, como es el caso de la conofisina que acarrea conopresinas en el veneno de *C. radiatus*.

Además, algunos polipéptidos detectados pueden ser enzimas de modificación postraducciona como la  $\gamma$ -glutamil carboxilasa en *C. textile*.

De igual manera, es probable la existencia de una cantidad variable de enzimas que contribuyan al envenenamiento; la mejor caracterizada es la condipina de *C. magus*, una novedosa fosfolipasa A<sub>2</sub> (Terlau & Olivera, 2004).

La combinación de conopéptidos en un mismo veneno produce respuestas fisiológicas específicas en el metazoo atacado. Se han determinado dos grados combinaciones de conopéptidos acorde con su acción fisiológica. Dichas combinaciones se conocen como *contubernios* o *cabals*:

El *motor cabal*, que inhibe la contracción muscular, incluye  $\omega$ -conotoxinas que interactúan con canales de Ca<sup>2+</sup> presinápticos impidiendo la liberación de neurotransmisores;  $\mu$ -conotoxinas que inhiben el potencial de acción muscular al bloquear canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje; y otros péptidos que inhiben diferencialmente receptores colinérgicos nicotínicos postsinápticos.

El *lighting strike cabal*, que producen algunas especies de cónidos piscívoros y resulta en una respuesta tetanizante inmediata que inmoviliza a la presa. Incluye antagonistas de canales de K<sup>+</sup> activados por voltaje ( $\kappa$ -conotoxinas), así como péptidos que retrasan la inactivación de canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje ( $\delta$ -conotoxinas) y otros más que reducen su umbral de activación ( $\iota$ -conotoxinas).

Los cónidos utilizan múltiples *cabals* para incapacitar a su presa.

## i.iv Conotoxinas

**Las conotoxinas son un conjunto de péptidos farmacológicamente activos y estructuralmente compactos que tienen como blanco molecular específico canales iónicos y receptores asociados a proteínas G; están compuestas de entre 8 y 30 residuos de aminoácidos y a pesar de ser pequeñas en longitud, contienen muchos de los elementos estructurales de proteínas de mayor tamaño como son  $\alpha$ -hélices y láminas y giros  $\beta$ . Además, presentan un alto grado de modificaciones postraduccionales (MPT) como son la amidación del carboxilo terminal, hidroxilación, carboxilación, brominación, glicosilación y sulfatación (Armishaw & Alewood, 2005). Existen indicios de que los cónidos expresan las enzimas relacionadas a estas modificaciones en sus ductos de veneno (Becker & Terlau, 2008).**

**Las conotoxinas presentan un número variable de puentes disulfuro que estabilizan su estructura tridimensional y dan lugar a una serie de curvas entre los residuos de aminoácidos que determinan su actividad biológica.**

La característica más notable de las conotoxinas es su capacidad para discriminar entre isoformas moleculares cercanas de miembros de una familia de canales iónicos particular. Su selectividad sin precedente hace de las conotoxinas herramientas poderosas para definir la función de estos canales. La mayoría de las familias de canales iónicos poseen una colección desconcertante de formas moleculares cuya complejidad en muchos casos permanece sin definir. Los agentes farmacológicos que pueden discriminar entre los miembros de una gran familia de canales iónicos son indispensables para diferenciar las funciones fisiológicas de diversas isoformas de canales iónicos emparentados.

**Las conotoxinas se clasifican en diversas superfamilias con base en un número de características como son la secuencia precursora en el extremo N-terminal, altamente conservada, la conexión de sus puentes disulfuro y el modo de acción.** Cada superfamilia a su vez se divide en distintas familias con base en sus blancos farmacológicos específicos.

Las primeras conotoxinas identificadas formalmente fueron aisladas del veneno de especies piscívoras como *C. geographus* debido a su capacidad para paralizar vertebrados. No obstante, el veneno de especies vermívoras y molusquívoras - como *C. marmoreus* y *C. imperialis* - también provee de una rica fuente de péptidos neuroactivos.

Las conotoxinas se traducen como precursores *prepropéptido*, consistentes en una secuencia señal (región “pre”) seguidas por una región “pro”, con la región de la toxina madura en la porción del carboxilo terminal.

El péptido farmacológicamente activo es generado por la escisión enzimática de la región C-terminal del *prepropéptido*.

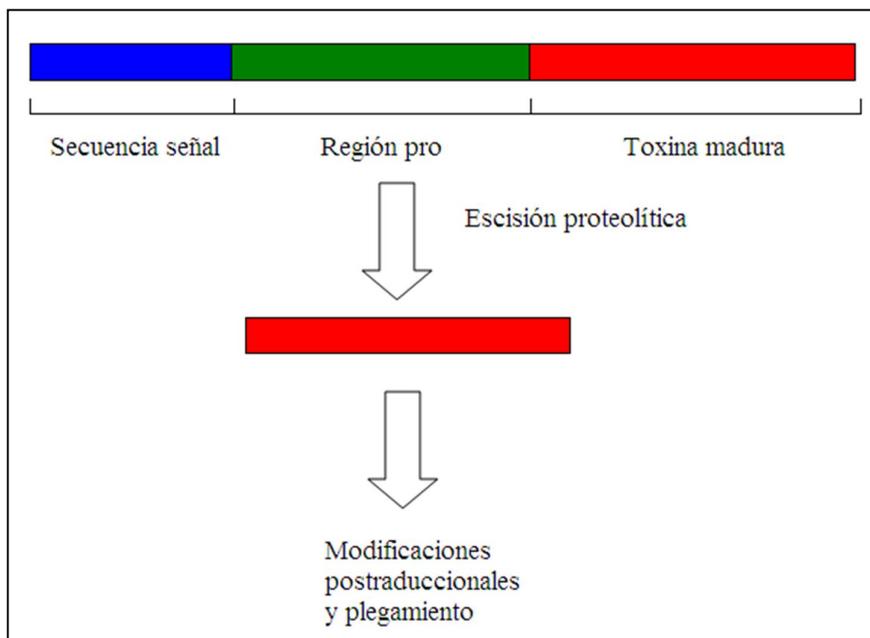


Figura 11. Representación gráfica de las 3 regiones de la secuencia codificada de una conotoxina. Modificado de Olivera, 2002.

Las regiones *prepro* están altamente conservadas a lo largo de las distintas superfamilias de conotoxinas. Las modificaciones postraduccionales de los aminoácidos así como su orden de incorporación están determinadas por estas secuencias. En algunos casos se han observado hasta cinco MPT en un mismo péptido para dar como resultado la toxina madura. Las enzimas involucradas en este proceso varían entre 10 y 12 y están presentes en el ducto de veneno de los cónidos.

Los péptidos maduros de cada superfamilia de genes tienen por lo general un arreglo característico de residuos de cisteína. Sin embargo, el resto de los residuos de aminoácidos que conforman la toxina madura es extremadamente variable.

De este modo, similar a los anticuerpos, las conotoxinas muestran una yuxtaposición entre secuencias altamente conservadas e hipervariables.

Esta diversificación molecular hipermutable en las superfamilias de conopéptidos genera continuamente novedades funcionales, y péptidos que pertenecen a una misma superfamilia, por definición relacionados a nivel estructural, pueden tener blancos moleculares completamente distintos.

Independientemente de la ruta de maduración del péptido lineal, las formas activas de las conotoxinas requieren un plegamiento específico para desempeñar su función biológica. A pesar de que la función de las regiones *prepro* está bien definida en cuanto a las modificaciones postraduccionales, su

actividad en relación con el plegamiento y formación de los patrones de puentes disulfuro – si es que existe - aún no ha sido determinada (Bingham *et al.*, 2010).

#### *i.iv.i Superfamilias de conotoxinas*

Las conotoxinas se han agrupado en diversas superfamilias de acuerdo a los patrones en la conectividad entre cisteínas. Dentro de estas superfamilias, diversos péptidos tienen distintos blancos moleculares. Debido a esto, cada superfamilia se divide en varias familias de conotoxinas agrupadas en consonancia con sus propiedades farmacológicas.

El hallazgo de que conopéptidos con arreglos de cisteínas similares tienen como objetivo distintas familias de canales iónicos, demuestra que incluso el menor cambio en la estructura general de dichos péptidos puede resultar en diferencias farmacológicas sustanciales (Becker & Terlau, 2008).

<b>CONOPÉPTIDOS</b>	<b>Pobres en puentes disulfuro</b>	Sin enlace S-S	Familia de Conotulakinas	Agonista de la Neurotensina
			Familia de Conantokinas	Inhibidor del receptor de NMDA
			Familia de Conofarmidas	¿Agonista del receptor de Rfamidas?
		Con un enlace S-S	Familia de Conopresinas	Agonista de la vasopresina
			Familia de Contrifanos	¿?
	<b>Ricos en puentes disulfuro (Conotoxinas)</b>	Superfamilia O	Estructuras VI/VII	Patrón C-C-CC-C-C
		Superfamilia M	Estructura III	Patrón CC-C-C-CC
		Superfamilia A	Estructuras I/II	Patrón CC-C-C
			Estructura IV	Patrón CC-C-C-C-C
		Superfamilia S	Estructura VIII	Patrón C-C-C-C-C-C-C-C-C-C
		Superfamilia T	Estructura V	Patrón CC-CC
		Superfamilia P	Estructura IX	Patrón C-C-C-C-C-C
		Superfamilia I	Estructura XI	Patrón C-C-CC-CC-C-C
		Superfamilia L	Estructura XIV	Patrón C-C-C-C
		Superfamilia J	Estructura XIV	Patrón C-C-C-C
		Superfamilia V	Estructura XV	Patrón C-C-CC-C-C-C-C
		Superfamilia C	Estructura X	Patrón C-C
		Superfamilia D	Estructura XII	Patrón C-CC-C-CC-C-C-C-C
			Estructura XIII	Patrón C-C-C-CC-C-C-C
	Estructura XVI	Patrón C-C-C-CCC-C-C-C-C		
	Estructura XVII	Patrón C-C-CC-C-CC-C		

Tabla 1. Clasificación genética y estructural de los conopéptidos y conotoxinas (Terlau & Olivera, 2004; Loughnan *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008).

- La superfamilia A consta de 4 familias:  $\alpha$ -,  $\alpha A$ -,  $\kappa A$ - y  $\rho$ -. Las dos primeras son antagonistas de receptores colinérgicos de tipo nicotínico (nAChR). Se cree que las  $\kappa A$ -conotoxinas actúan sobre canales de  $K^+$ , mientras que las  $\rho$ -conotoxinas son antagonistas de receptores adrenérgicos de tipo  $\alpha_{1B}$ .

- La superfamilia M se divide en las familias  $\mu$  y  $\psi$ . Las  $\psi$ -conotoxinas tienen como blanco molecular nAChR de manera no competitiva, mientras que las  $\mu$ -conotoxinas bloquean canales de  $\text{Na}^{2+}$  activados por voltaje ( $\text{Na}_v$ ) en células excitables, como son los tres tipos de tejidos musculares y las células nerviosas.
- La superfamilia O es la más diversa de todas y se conforma por 5 familias:  $\mu\text{O}$ -,  $\delta$ -,  $\omega$ -,  $\kappa$ - y  $\gamma$ -. Las primeras dos tienen como blanco  $\text{Na}_v$  (en sitios distintos a las  $\mu$ -conotoxinas), mientras que las otras interactúan con canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , canales de  $\text{K}^+$  y canales marcapaso respectivamente.
- La superfamilia P está compuesta por una familia de conotoxinas que poseen una secuencia de cisteínas “en nudo” inhibitor. Ésta superfamilia produce parálisis espástica pero su blanco molecular aún no ha sido identificado con exactitud. Las modificaciones postraduccionales en éstas son comunes y muy variadas, aumentando su diversidad.
- La superfamilia S también está compuesta por una única familia, las  $\sigma$ -conotoxinas derivadas de *C. geographus*. Se diferencian principalmente por tener un mayor tamaño (41 aa.) y ser antagonistas de receptores  $5\text{HT}_3$  así como producir respuestas excitatorias neuronales en presencia de serotonina.
- La superfamilia T incluye las familias  $\tau$  y  $\chi$ . Las primeras bloquean canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presinápticos mientras que las  $\chi$ -conotoxinas tiene actividad inhibitoria en transportadores de norepinefrina.
- **La superfamilia I (I-Ctx)** está caracterizada por tener cuatro puentes disulfuro con un arreglo de cisteínas C-C-CC-CC-C-C e inhibir o modificar canales iónicos de células nerviosas. Las I-Ctx se han detectado tanto en organismos vermívoros como piscívoros, diversificándose más allá de las relaciones ecológicas y evolutivas de los taxa. La superfamilia I ha sido menos explorada en comparación con otras en las especies de cónidos. Olivera demostró que en realidad este grupo consiste de dos superfamilias génicas distintas ( $I_1$  e  $I_2$ ), diferenciadas por su secuencia señal, a pesar de que ambas comparten el mismo arreglo de cisteínas. Se sugiere que la superfamilia  $I_1$  posee modificaciones postraduccionales únicas en su extremo C-terminal, mientras que la  $I_2$  carece de una región propéptido, diferenciándose en este aspecto de las otras superfamilias.

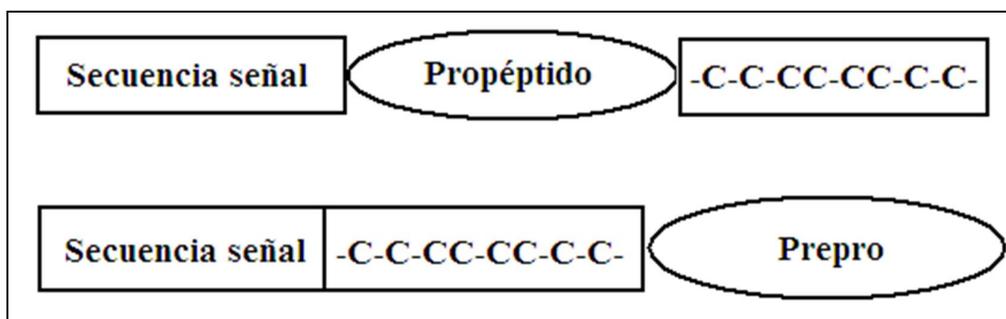


Figura 12. Representación gráfica de las regiones codificadas de las Superfamilias I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>, respectivamente. Modificado de Mondal *et al.*, 2006.

En el caso de las conotoxinas r11a y r11b se ha demostrado que la modificación postraducciona, la isomerización en una fenilalanina, es responsable de la actividad biológica de los péptidos (Mondal *et al.*, 2006).

A pesar de que han sido identificadas una gran cantidad de conotoxinas pertenecientes a la superfamilia I, sólo en tres casos se ha determinado el blanco molecular de éstas: La RXIA tiene como blanco el Nav1.6, un subtipo de canal de Na<sup>2+</sup> activado por voltaje y pertenece a la superfamilia I<sub>1</sub>. Por otra parte, las conotoxinas Btx y ViTX, pertenecientes a la superfamilia I<sub>2</sub> son específicas para canales BK sensibles a voltaje y a la subfamilia *Shaker* de canales de K<sup>+</sup> respectivamente.

Se ha caracterizado una tercera superfamilia, la I<sub>3</sub>, la cual presenta el mismo patrón de cisteínas aunque una secuencia señal distinta a la de las I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> (Yuan *et al.*, 2009).

#### *i.iv.ii Modificaciones postraduccionales*

Amidación del carboxilo terminal: La mayoría de los péptidos del veneno de los cónidos presentan amidación del C-terminal. En particular, las α-conotoxinas (con la excepción de la α-GID) presentan siempre esta MPT, mientras que las γ/γ- conotoxinas carecen de ella. Las tres familias presentan una longitud similar en sus péptidos y cuatro cisteínas, de manera que los puentes disulfuro se establecen entre las Cys 1-3, 2-4 para las α-conotoxinas y 1-4, 2-3 en γ/γ- conotoxinas. Debido a esto se especula que la función de la amidación del carboxilo terminal está fundamentalmente relacionada con el plegamiento protéico y la disposición de los puentes disulfuro.

De igual manera, se ha observado que esta MPT afecta la actividad biológica del péptido, estando reportado que la amidación incrementa la actividad biológica en 50% de una γ-conotoxina en transportadores de norepinefrina.

Hidroxilación de prolinas: La hidroxilación de prolina en 4-hidroxiprolina es una de las MPT más comunes en las conotoxinas. El grupo hidroxilo es

importante en la actividad de la  $\mu$ -conotoxina GIIIA y se piensa que está relacionada con las interacciones en los canales de  $\text{Na}^{2+}$ . Por otra parte se ha demostrado que en el caso de la TVIIA dicha MPT no interviene en la estabilización estructural del péptido.

$\gamma$ -carboxilación del glutamato: Es una de las MPT mejor entendidas en las conotoxinas. Alrededor del 10% de las conotoxinas presentan glutamatos  $\gamma$ -carboxilados que contribuyen a la formación de  $\alpha$  hélices e interacciones con iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

D-epimerización de aminoácidos: La D-epimerización se encuentra en conotifanos y conotoxinas de la superfamilia I.

Brominación del triptófano: Esta MPT está relacionada con la resistencia del péptido a las proteasas. Es posible que la brominación de algunas conotoxinas esté relacionada con un aumento de permeabilidad del péptido para atravesar la barrera hematoencefálica y así llegar al sistema nervioso central de manera más efectiva.

O-glicosilación de serina y treonina: Introducida por glicosil transferasas, está relacionada con la estabilidad estructural así como en el aumento en el transporte del péptido vía transportadores de carbohidratos. Sin embargo, esta hipótesis requiere de investigación para ser confirmada.

Ácido piroglutámico: El ácido piroglutámico en el extremo N-terminal se ha reportado en las  $\mu$ -conotoxinas PIIIA y SmIIIA aunque su función permanece incierta.

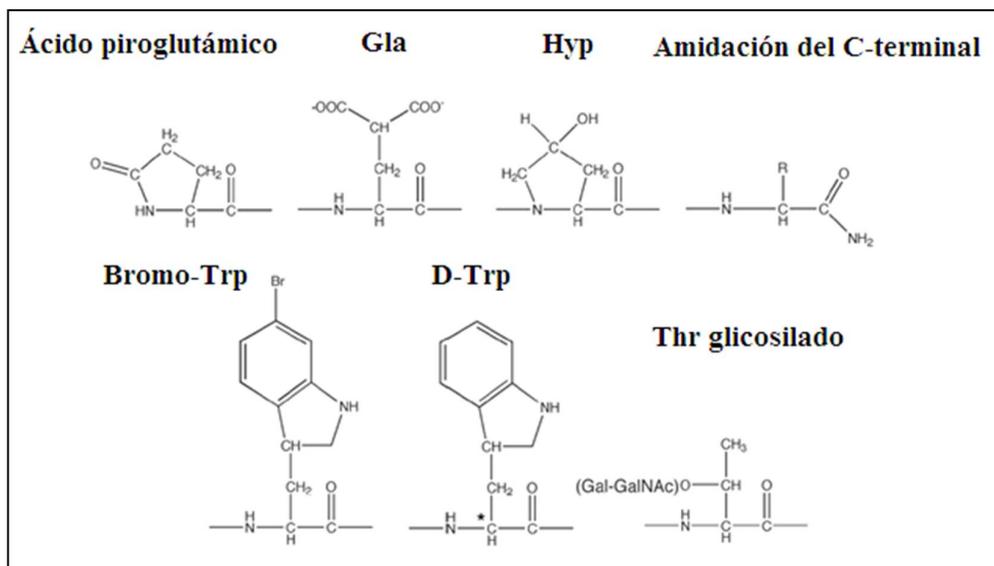


Figura 13. Representaciones esquemáticas de algunas de las MPT. Modificado de Marx, *et al.*, 2006.

### *i.iv.iii Nomenclatura de las conotoxinas*

La nomenclatura que se utiliza para denominar individualmente a estos péptidos se basa en: una letra griega que indica la actividad farmacológica; una o dos letras que se refieren a la especie de origen del péptido; un número romano que indica la categoría de puentes disulfuro; y una letra mayúscula que denota el orden de descubrimiento en dicha categoría. Por ejemplo, la  $\omega$ -conotoxina MVIIA tiene una actividad farmacológica característica de las  $\omega$ -conotoxinas, fue aislada de *C. magus*, pertenece a la categoría VII de puentes disulfuro y fue la primera de ésta en ser descubierta.

En caso de que no se haya establecido la actividad farmacológica del péptido en cuestión se utiliza una nomenclatura distinta: una o dos letras minúsculas para definir la especie de procedencia, un número arábigo para designar la categoría de puentes disulfuro y una letra minúscula para indicar el orden de descubrimiento en dicha categoría. En el caso de la **conotoxina sr11a** se indica que pertenece a *C. spurius* y fue la primera en ser descubierta en la categoría 11.

### *i.iv.iv Biotecnología de los conopéptidos*

**De su fuente natural, las conotoxinas sólo pueden obtenerse en pequeñas cantidades que limitan su disponibilidad para la investigación y aplicaciones médicas.** Para la producción de cantidades mayores de estos péptidos se han desarrollado dos estrategias básicas: **la síntesis química** y **la producción recombinante** en sistemas de expresión heterólogos (Becker & Terlau, 2008).

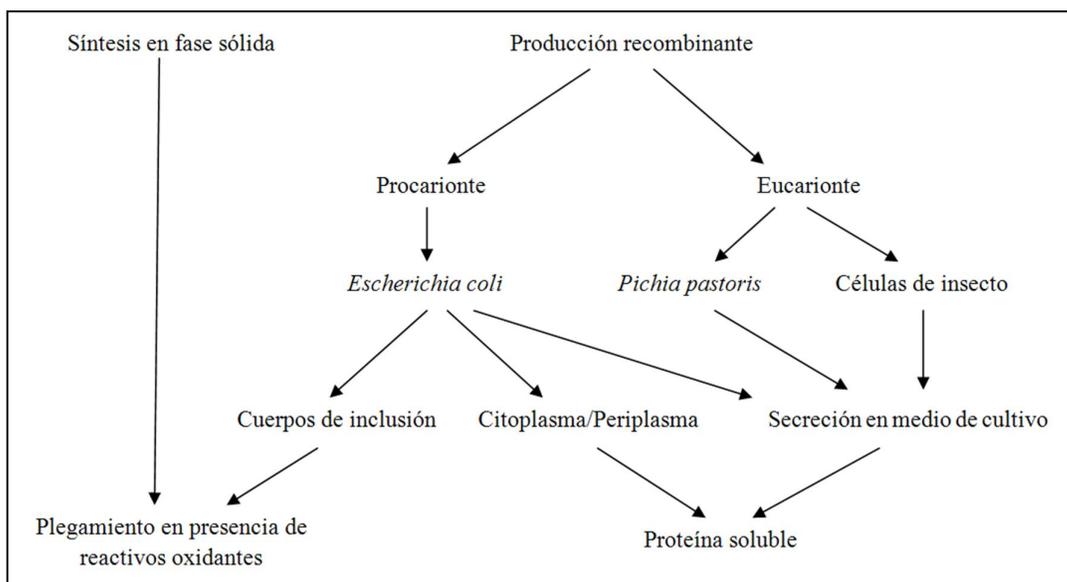


Figura 14. Estrategias para la producción de péptidos ricos en puentes disulfuro. Modificado de Becker & Terlau, 2008.

Debido a las modificaciones postraduccionales ya descritas, **la síntesis química** vía SPPS (Síntesis de péptidos en fase sólida) en soportes de resina es el método más utilizado para la producción de conotoxinas en grandes concentraciones. **Sin embargo, los altos costos de producción y riesgos clínicos que conlleva este proceso lo hacen inviable en muchas ocasiones.**

**Una alternativa efectiva en relación a los costos para la producción de péptidos en grandes concentraciones es la utilización de sistemas de expresión bacterianos o eucariontes.** La maquinaria postraduccionales de estos sistemas de expresión impide la producción de péptidos con las modificaciones postraduccionales presentes en muchos conopéptidos.

**Existen pocos resultados exitosos en relación con la producción recombinante de conotoxinas.** Uno de los principales impedimentos es la incapacidad de realizar estas modificaciones en otros sistemas biológicos de expresión. Sin embargo, aún no se esclarece si estas MPT intervienen en su actividad biológica.

*Escherichia coli* es el hospedero más utilizado y mejor caracterizado para la producción de proteínas recombinantes, debido a los bajos costos de cultivo y rápido crecimiento. Sin embargo, los péptidos pequeños no se sobreexpresan en *E. coli* debido a que son degradados rápidamente por las proteasas celulares o se acumulan en agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión.

Además, el citoplasma celular es un ambiente reductor que impide la formación de puentes disulfuro, incrementado la posibilidad de formación de cuerpos de inclusión. La producción de estos péptidos se ha logrado al expresarlos como proteínas de fusión en conjunto con proteínas acarreadoras de mayor tamaño como la MBP (*Maltose binding protein*), la tioredoxina o la glutatión-S-transferasa, para posteriormente ser purificados a través de cromatografía de inmunoafinidad.

De esta manera ha sido posible la producción recombinante de las conotoxinas  $\mu$ -MVII e It7a al expresarlas en conjunción a las glutatión-S-transferasa y tioredoxina respectivamente.

La utilización adicional de cepas deficientes en proteasas puede ayudar a evadir la degradación proteolítica no específica.

A partir de la proteína de fusión, la toxina debe ser liberada a través de una escisión química o proteolítica realizada entre la proteína acarreadora y la toxina.

Cuando la toxina no se expresa en forma soluble, es necesario solubilizarla a partir de los cuerpos de inclusión con agentes desnaturizantes como urea o clorhidrato de guanidina y plegarla nuevamente por dilución o diálisis en un buffer no desnaturizante. Al igual que en la síntesis química, el plegamiento puede optimizarse por oxidación regenerativa.

De esta manera se ha llevado a cabo el plegamiento del conopéptido recombinante Conk-S1.

Alternativamente, la utilización de cepas deficientes en oxidoreductasas como *E. coli* Origami (Novagen®) ofrecen un ambiente oxidante moderado en el citoplasma, incrementando la fracción proteica plegada adecuadamente. Sin embargo, dichas cepas tienden a producir cantidades bajas de proteína y no se ha reportado la utilización de las mismas en la producción de péptidos pequeños como las conotoxinas.

Otra opción para obtener proteínas de fusión solubles de péptidos ricos en puentes disulfuro es la expresión en el ambiente oxidativo del periplasma, a través de un péptido señal en la secuencia del vector de expresión. Este método ha sido probado con éxito en la expresión periplásmica de dendrotoxinas y toxinas de alacrán como proteínas de fusión en conjunto con la MBP. A pesar de esto, la expresión en periplasma de conotoxinas no ha sido llevada a cabo con éxito debido a que el plegamiento oxidativo en este espacio parece ser eficiente sólo para ciertos patrones de puentes disulfuro.

En la mayoría de los vectores de expresión con sitio de corte específico para proteasas, el polylinker para la secuencia codificante está localizado en dirección 3' de la secuencia de reconocimiento de la proteasa, lo que ocasiona que tras la escisión proteolítica exista la posibilidad de que la toxina liberada contenga residuos N-terminal de aminoácidos adicionales. Además, las proteasas utilizadas pueden cortar en sitios inespecíficos destruyendo el péptido de interés. Por otra parte, los altos costos de inversión en las proteasas son otro factor a considerar en los gastos que conlleva la producción recombinante de péptidos.

En resumen, la producción de proteínas ricas en puentes disulfuro en *E. coli* incluye el plegamiento de éstas a partir de cuerpos de inclusión o la secreción en el espacio periplásmico. Ambas estrategias tienden a un decremento en la concentración final de la proteína.

Una alternativa a la utilización de *E. coli* es la producción de las proteínas ricas en puentes disulfuro en sistemas de expresión de eucariontes. La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* provee de un ambiente intracelular similar al de las células de mamífero y la secreción de la proteína al medio circundante se lleva a cabo con facilidad. Los costos de producción son similares a los utilizados con *E. coli*.

Las células de insecto han sido utilizadas también para la producción de proteínas ricas en puentes disulfuro a través del sistema del baculovirus, como son las células S2 de *Drosophila melanogaster*. Sin embargo los costos del medio de cultivo para estas células hacen que la producción recombinante en estos sistemas sea poco viable (Becker & Terlau, 2008).

## II. ANTECEDENTES

### *Conus spurius*

La concha de *Conus spurius* presenta de 9 a 10 espiras, las tres primeras formando un área aplanada. La abertura es larga y estrecha. El canal sifonal forma una sola muesca. El labio exterior es fino, su opérculo es córneo y pequeño. Presenta un color arena con pequeñas machas romboidales en patrón espiral. El interior de la apertura es blanco.

Tienen una longitud de entre 5 y 8 cm. Habitan las aguas someras próximas a arrecifes en el Golfo de México, Florida y el Mar Caribe (Lira-Galera *et al.*, 1989). Se localiza principalmente en sustratos de arena gruesa y arenas carbonatadas, en un intervalo batimétrico de 17 a 35 m.

Dominio	<b>Eukarya</b>
Reino	<b>Animalia</b>
Phylum	<b>Mollusca</b>
Clase	<b>Gasterópoda</b>
Subclase	<b>Prosobranchia</b>
Orden	<b>Neogasterópoda</b>
Familia	<b>Conidae</b>
Género	<b><i>Conus</i></b>
Especie	<b><i>Conus spurius</i>, Gmelin, 1971</b>

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *C. spurius*



Figura 15. Concha de *C. spurius*; colección del Dr. Estuardo López Vera.

*C. spurius* es un cónido vermívoro de cuyo veneno se han aislado e identificado los siguientes péptidos:

- Conorfamida Sr1: Probable agonista de canales iónicos dependientes del neuropéptido FRMFamida y modulador de canales de sodio epiteliales (Maillo *et al.*, 2002).

- Conorfamida Sr2: Probablemente actúe sobre receptores acoplados a proteínas G, sobre canales de Na activados por FRMFamida o sobre canales iónicos sensibles a la acidez (Aguilar *et al.*, 2008).
- Péptido sr5a: Actúa en el sistema nervioso central de mamíferos y corresponde a la superfamilia T (Aguilar *et al.*, 2006).
- Péptido sr7a: Produce hiperactividad en ratones y parálisis en moluscos. Pertenece a la superfamilia O (Luna-Ramírez *et al.*, 2007).
- Péptidos srIA y srIB: Potencian la actividad de los ACh receptores nicotínicos, tanto en células nerviosas como musculares. Corresponde a la familia  $\alpha$  de conotoxinas (López-Vera *et al.*, 2007).
- **Péptido sr11a**: Pertenece a la superfamilia I y tiene efecto inhibitorio en canales de K dependientes de voltaje (Aguilar *et al.*, 2010).

### ***La conotoxina sr11a***

El péptido sr11a fue la primer I<sub>2</sub>-conotoxina aislada de una especie vermívora proveniente del Mar Caribe (*Conus spurius*), tiene 32 residuos de aminoácidos y presenta modificaciones postraduccionales en dos  $\gamma$ - carboxil glutamato, así como la amidación de la prolina del C-terminal. Presenta similitudes con kBtX (51%) y **actividad inhibitoria en los canales Kv1.2, Kv1.4 y Kv1.6**. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las moléculas inhibitorias de los canales Kv, **la conotoxina sr11a no presenta una diada de residuos de Lys. En contraste, tiene residuos expuestos de Arg (específicamente las Arg17 y Arg29) que sugieren ser la base del farmacóforo** (Aguilar *et al.*, 2010).

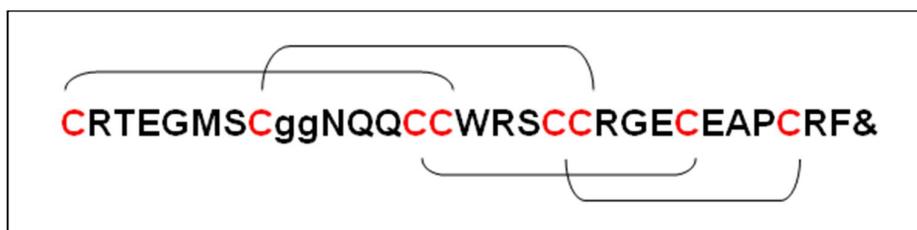


Figura 16. Secuencia de residuos aminoácidos de la sr11a. Se muestra la conectividad entre cisteínas característica de la Superfamilia I: C-C-CC-CC-C-C (g:  $\gamma$ -carboxil glutamato; &: amidación del C-terminal).

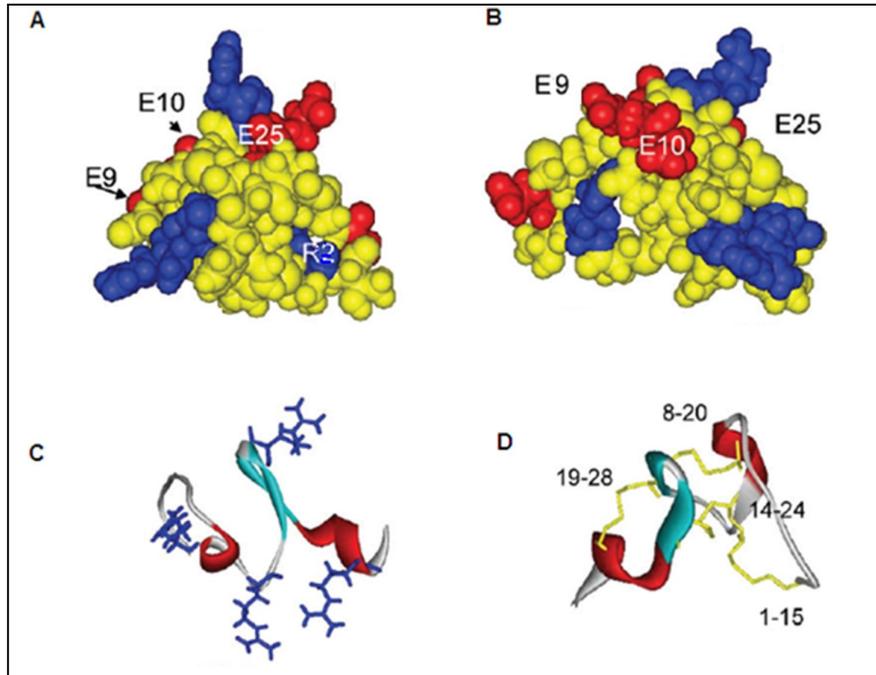


Figura 17. Modelo estructural del péptido sr11a. A. Representación CPK. Los residuos positivos y negativos están coloreados en azul y rojo respectivamente. E9 y E10 corresponden a los  $\gamma$ -carboxiglutamatos. B. Vista previa en rotación vertical de 180°. C.  $\alpha$ -hélices en rojo; láminas  $\beta$  en azul claro; residuos de Arg en azul. D. Puentes disulfuro en amarillo; los números corresponden a la conectividad entre cisteínas.

La conotoxina sr11a fue identificada a partir de la colecta de un ejemplar de *C. spurius* en Isla Arena, Campeche, en Mayo de 2008 (Zamora-Bustillos *et al.*, 2010). El Instituto de Ciencias del Mar en colaboración con la Facultad de Medicina de la UNAM, ha desarrollado una línea de investigación sobre la sr11a (entre otras conotoxinas) para determinar su actividad biológica y sus blancos moleculares. Sin embargo, **se requiere una mayor concentración de conotoxina para poder continuar con los estudios relacionados con la cinética funcional de la toxina, así como los ensayos electrofisiológicos en otros canales de la familia Kv1. Por esta razón se plantea la estrategia recombinante para producir la sr11a.**

Existen pocos resultados exitosos en relación con la producción recombinante de conotoxinas. El principal ejemplo de una conotoxina utilizada como fármaco corresponde al de la  $\mu$ -conotoxina MVIIA (Ziconitide, Prialt®) procedente de *Conus magus*, que ha sido aprobada como tratamiento contra el dolor crónico intratable. En el año de 2006 el grupo de Xia, Z. logró producir dicha conotoxina a través de cepas BL21 de *E. coli* y obtuvieron una forma activa de la misma.

En el año de 2011 el grupo de Bruce y colaboradores obtuvo a través de la levadura *Pichia pastoris* la conotoxina TxVIA recombinante y demostró además que las regiones *prepro* son indispensables para su actividad biológica.

### III. JUSTIFICACIÓN

La conotoxina sr11a presenta una actividad biológica inhibitoria en los canales Kv1.2, Kv1.4 y Kv1.6. Esta familia de canales de potasio, denominados canales tipo *shaker* o rectificadores tardíos, se encuentra distribuida en todo el organismo.

El canal Kv1.2 se expresa en cerebro, médula espinal, células de Schwann, atrio, ventrículo, retina, músculo liso y células PC12, mientras que el Kv1.6 se expresa en cerebro, colón, células germinales, corazón, pulmón y oligodendrocitos (Gutman, 2005).

El canal Kv1.4 se expresa en cerebro, pulmón canceroso, músculo esquelético, corazón e islotes pancreáticos. **Hasta la fecha no existe otra toxina que bloqué de manera específica este canal.**

Debido a esto, la sr11a se presenta como una herramienta farmacológica potencial al interactuar de manera específica con estos canales, permitiendo el estudio de su estructura, función y regulación fisiológica; además, tiene potencial farmacológico en el tratamiento de patologías relacionadas.

**La producción recombinante de la sr11a permitiría la realización de estos estudios sin necesidad de colectar la toxina de su fuente natural, la cual resulta costosa e insuficiente. Por otra parte, existen pocas conotoxinas producidas exitosamente por técnicas de DNA recombinante, por lo que la producción de la sr11a contribuiría al desarrollo de técnicas que permitan la producción de proteínas recombinantes de bajo peso molecular.**

### IV. OBJETIVOS

#### *General*

Diseñar y desarrollar las estrategias necesarias para la producción de la conotoxina sr11a a través de técnicas de DNA recombinante en un sistema de expresión procarionte.

### ***Particulares***

- Replicar los vectores pBSK LE216 y pET22b.
- Diseñar los oligonucleótidos iniciadores para la PCR.
- Optimizar las condiciones de amplificación por PCR de la secuencia LE216 que está contenida en el vector pBSK LE216, modificando la temperatura de alineación y las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>.
- Ligar la secuencia LE216 del vector pBSK LE216 al vector de expresión pET22b.
- Elegir y transformar diversas cepas de expresión de *E. coli* con el plásmido recombinante pET22b-LE216.

## **V. METODOLOGÍA**

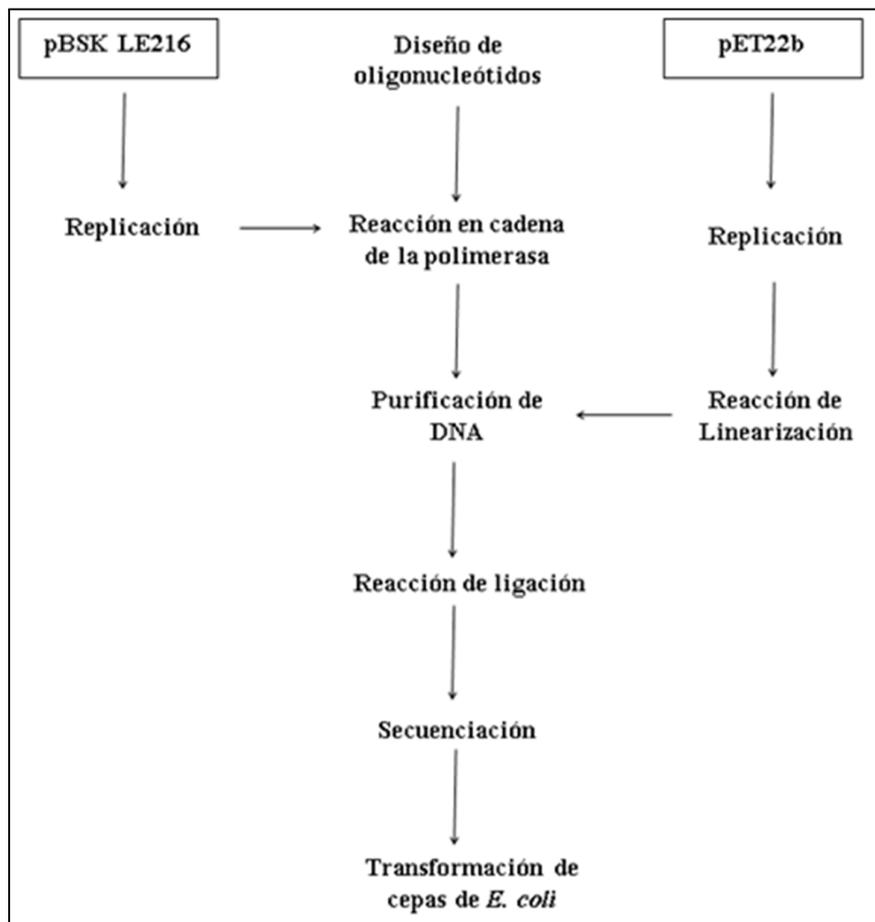


Figura 18. Diagrama de flujo de la metodología empleada. Todos los protocolos se explican a detalle en el apartado *Protocolos*.

#### **v.i      *Replicación del vector pBSK LE216***

El vector pBSK LE216 fue sintetizado por Epoch Biolabs® y contiene inserta **la secuencia LE216 que codifica para la conotoxina sr11a**. La secuencia presenta modificados los codones preferenciales para *E. coli*.

Se transformaron células competentes DH5α y JM109 con el vector pBSK LE216 por medio de un choque térmico. Las bacterias fueron cultivadas en medio LB y SOC con ampicilina, respectivamente.

Se purificó el DNA con el Plasmid Midi Prep Kit (QIAGEN®) y se hizo una prueba de linearización con EcoRI. Se realizó una Maxi Prep de una de las muestras DH-5α y se purificó el DNA con el Plasmid Maxi Prep Kit (QIAGEN®).

Se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260nm. Se realizaron reacciones de restricción con EcoRI y XhoI para verificar el peso molecular del plásmido.

#### **v.ii      *Replicación del vector pET22b***

El vector de expresión pET22b fue proporcionado por la Dra. Nuria Sánchez Puig del Laboratorio de Bioquímica 3 del Instituto de Química, UNAM. Se transformaron células DH-5α por medio de un choque térmico y se replicó y purificó el DNA con el Plasmid Midi Prep Kit (QIAGEN®). Se realizaron reacciones de restricción con EcoRI y NcoI para corroborar que el DNA correspondiera al pET22b.

#### **v.iii      *Diseño de los oligonucleótidos***

Los oligonucleótidos para realizar la PCR fueron diseñados para el vector de expresión pET22b y sintetizados por los laboratorios Invitrogen®.

#### **v.iv      *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Se realizaron varias PCR con la finalidad de optimizar la cantidad de DNA amplificado. Se realizaron variaciones en la concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizando 0.5, 1.5 y 2.5 mM. También se alteró la temperatura de alineación en 55, 58 y 61°C. Una vez elegida la mejor temperatura de alineación se variaron las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> utilizando 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 mM.

#### **v.v      *Linearización del vector pET22b***

Se hicieron reacciones de restricción con el vector pET22b y el amplificado de las PCR utilizando las enzimas de restricción EcoRI y NcoI. Se adicionó fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina para evitar la recircularización del pET22b.

#### **v.vi      *Purificación de DNA***

Las muestras de PCR (gen sr11a) y del vector pET22b linearizado se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% y se purificaron a partir de éste con el PureLink Quick Gel Extraction Kit (INVITROGEN®). Se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260nm.

#### **v.vii      *Inserción de la secuencia LE216 en el vector pET22b***

Se realizó la ligación del pET22b y la secuencia LE216 acorde con las proporciones de la T4 DNA Ligase (PROMEGA®). A este nuevo vector se le denominó pET22b-LE216.

Se transformaron células DH-5 $\alpha$  con el producto de la ligación y se incubaron en medio LB con ampicilina. El DNA plasmídico se aisló por el método de lisis alcalina. Se realizaron reacciones de restricción con SalI y MluI para corroborar que la ligación fuera efectiva. Se volvió a realizar otra Midi Prep para tener suficiente DNA para mandarlo secuenciar.

#### **v.viii      *Secuenciación***

El DNA fue secuenciado por los laboratorios Laragen®.

#### **v.ix      *Transformación de E. coli con el plásmido recombinante pET22b-LE216***

Se eligieron diversas cepas de *E. coli* para realizar la transformación bacteriana.

Se eligieron y prepararon células competentes con el método de RbCl de las siguientes cepas. Las características particulares de cada cepa se muestran en la parte de resultados:

- BL21
- C41
- Tunner

Las tres cepas fueron transformadas por choque térmico con el pET22b-LE216 e incubadas en medio TY-2X con ampicilina.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Nota aclaratoria:** Las secuencias aquí presentadas correspondientes a la LE216, sr11a y los oligonucleótidos iniciadores se encuentran en proceso de patente y son propiedad intelectual de la Dra. Laura Irma Escobar Pérez y su equipo de investigación en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UNAM.

### vi.i Replicación del vector pBSK LE216

El vector de replicación pBSK LE216 tiene una longitud de 3096pb. La secuencia LE216 comprende desde el sitio 652 hasta el 885 (234pb). Esta secuencia codifica para la conotoxina sr11a y está modificada acorde con los codones preferenciales de *E. coli*.

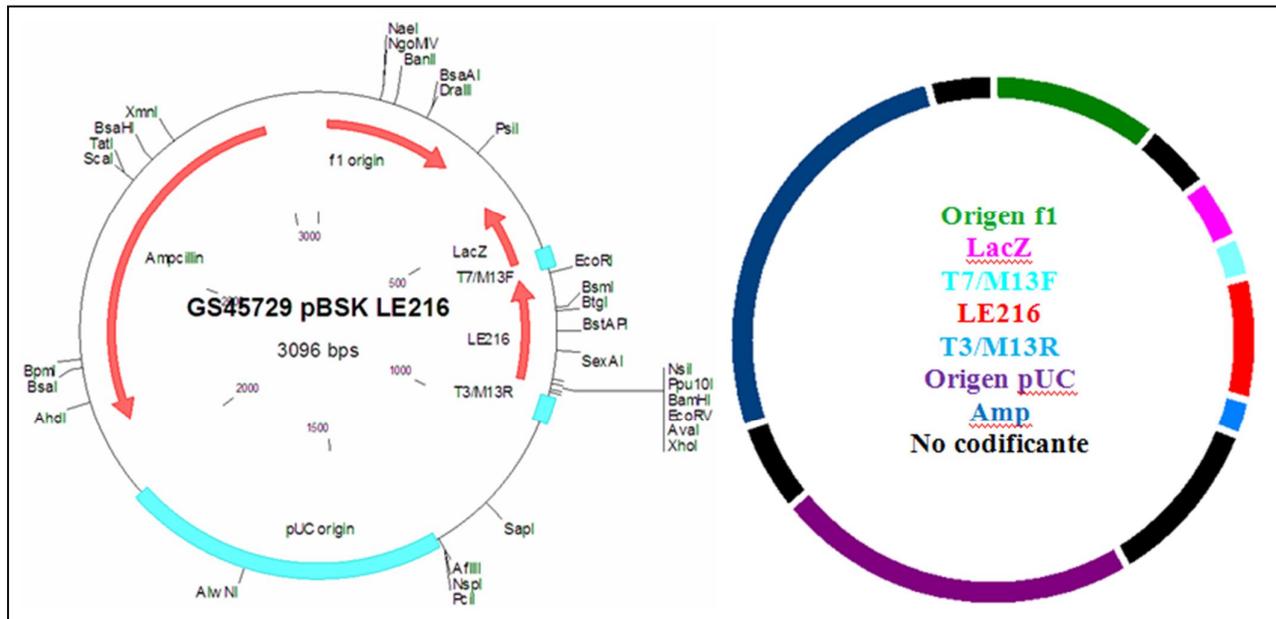


Figura 19. Representación esquemática de los distintos componentes del pBSK LE216. La secuencia LE216 (652-885pb) corresponde a la secuencia codificante de la conotoxina sr11a.

El pBSK LE216 comprende los siguientes componentes:

- Origen f1: Origen de replicación monocatenario.
- LacZ: Codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Se utiliza como gen reportero; cuando las bacterias son crecidas en medio con X-gal, adquieren una coloración azul.
- LE216: Secuencia sintética que codifica la conotoxina sr11a. Presenta los codones preferenciales para *E. coli*.

- Origen pUC: Origen de replicación bicatenario de alta copia.
- Amp: Gen de resistencia a la ampicilina. Permite el crecimiento de las bacterias en un medio selectivo con ampicilina.

#### Secuencia nativa sr11a

3' ATG ATG TTT TGT GTG ACG TCA GTC CGC TGT TTC CTG  
CTG GTC ATC GTT TTT CTG AAC TTG GTT GTG CTT ACC  
AAT GCG TGC AGA ACT GAA GGA ATG TCC TGC GAA GAG  
AAT CAG CAA TGC TGT TGG CGT TCT TGC TGT AGG GGA  
GAA TGC GAA GCT CCG TGT CGA TTT GGT CCT GGA AAG  
AGG GCG CAA CTC CAA GAA TTC TTT CAA CAT CGT TGA  
5'

#### Secuencia LE216

3' GGA TCC CAT ATG CAT ATG TTT TGC GTG ACC AGC GTT  
CGT TGC TTC CTG CTG GTT ATT GTT TTC CTG AAC CTG  
GTA GTT CTG ACA AAT GCG TGC CGT ACT GAA GGC ATG  
AGT TGC GAA GAA AAT CAA CAA TGC TGC TGG CGT TCT  
TGC TGC CGT GGC GAA TGC GAG GCA CCA TGT CGT TTC  
GGC CCA GGC AAA CGT GCT CAG TTA CAG GAA TTT TTC  
CAG CAT CGT TAA GAA TTC 5'

----- Secuencia señal

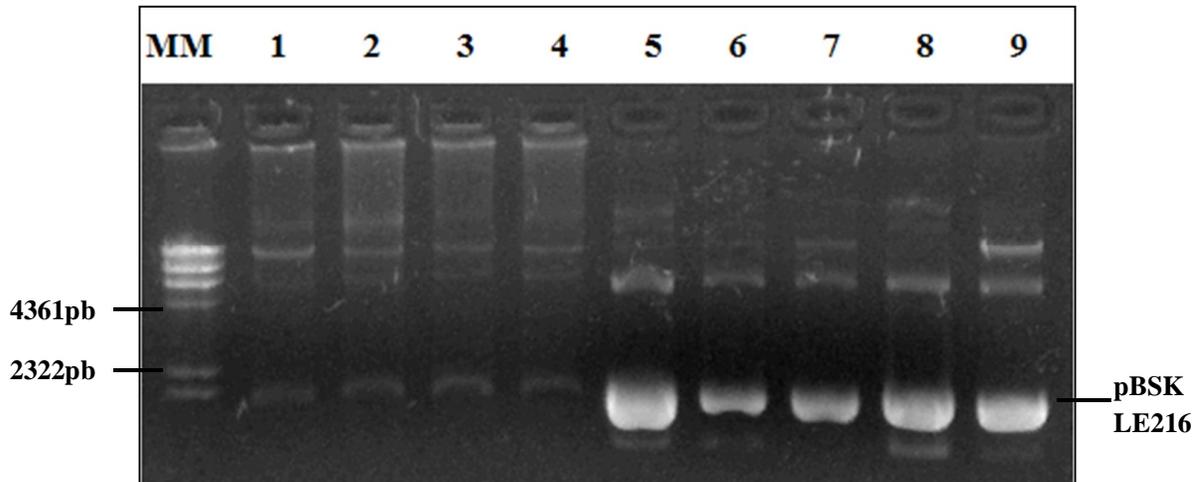
**ATG** Toxina madura

\_\_\_\_\_ Región Pre - Pro

Figura 20. Secuencia nucleotídica nativa sr11a y sintética LE216. La segunda presenta modificados los codones preferenciales de *E. coli*.

A pesar de poseer la secuencia señal, la región *prepro* y la parte de la toxina madura, sólo ésta última será amplificada durante las PCR. La secuencia se sintetizó completa para poder tener opciones en caso de que exista un pegamiento incorrecto o una proteína sin actividad biológica.

Las bacterias transformadas con el pBSK LE216 crecieron en el medio de cultivo. Posterior a la lisis alcalina y purificación del DNA se corrió un gel de agarosa al 1%.



MM	Marcador molecular
1	JM109-A
2	JM109-B
3	JM109-C
4	JM109-D
5	DH5α-B
6	DH5α-C
7	DH5α-D
8	DH5α-E
9	DH5α-F

Figura. 21 Electroforesis de DNA en gel de 1% agarosa. Se observa el pBSK LE216 superenrollado. La cepa DH5α replicó en mucha mayor concentración el vector que la JM109.

Por su mayor concentración, se seleccionaron las muestras JM109-B, JM109-C, DH5α-B y DH5α-F para realizar una prueba de linearización con EcoRI.

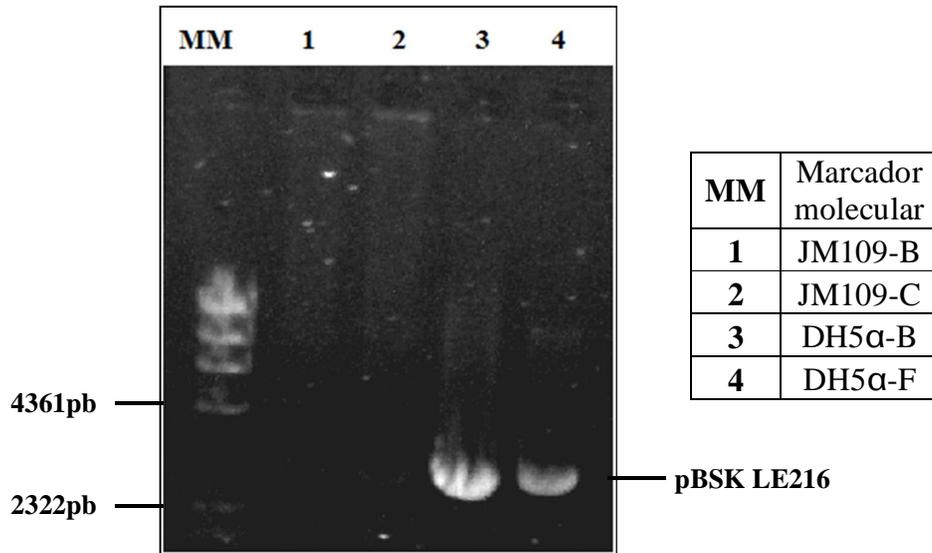


Figura 22. Linearización del pBSK LE216 con EcoRI. Se observa que en las muestras JM109 la concentración es prácticamente nula. El DNA de la muestra DH5α-B permanece superenrollado.

Se eligió la muestra DH5α-F para realizar una Maxi Prep. Tras purificar el DNA se cuantificó su concentración por espectrofotometría de UV. Debido al gran volumen de muestra, se dividió en dos partes (a y b) y se cuantificó por separado, dando como resultado **DH5α-F<sub>a</sub> = 0.7375μg/μL** y **DH5α-F<sub>b</sub> = 0.4375μg/μL**. Este material fue el utilizado para realizar las PCR.

Se realizó una reacción de restricción con EcoRI y XhoI para verificar que el DNA observado en la electroforesis corresponda al pBSK LE216. Los tamaños esperados son de 2850pb y un fragmento de 246pb.

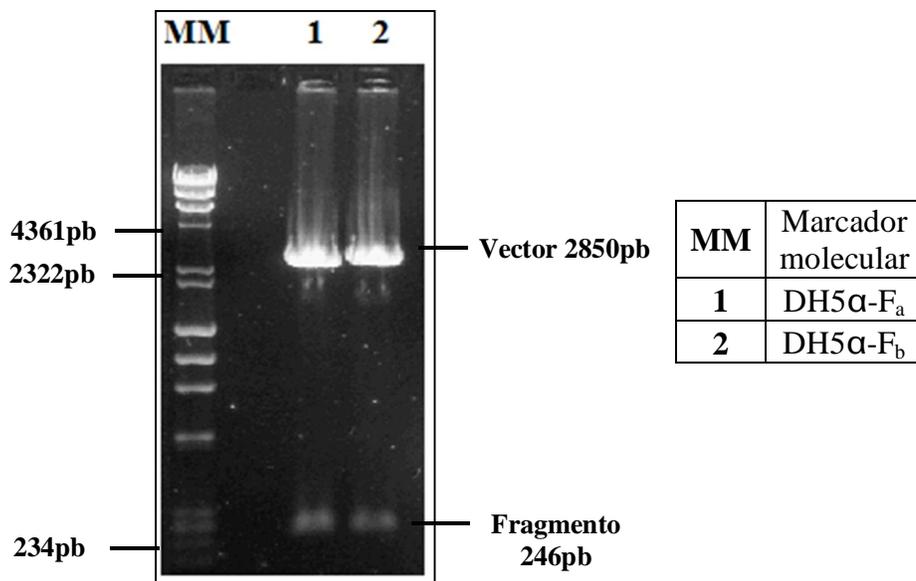


Figura 23. Restricción del pBSK LE216 con EcoRI y XhoI. Se muestran los pesos esperados de 2850 y 246pb.

**vi.ii Replicación del vector pET22b**

El vector de expresión pET22b tiene una longitud de 5493pb. La secuencia LE216 se insertará entre los sitios de corte EcoRI (192) y NcoI (220).

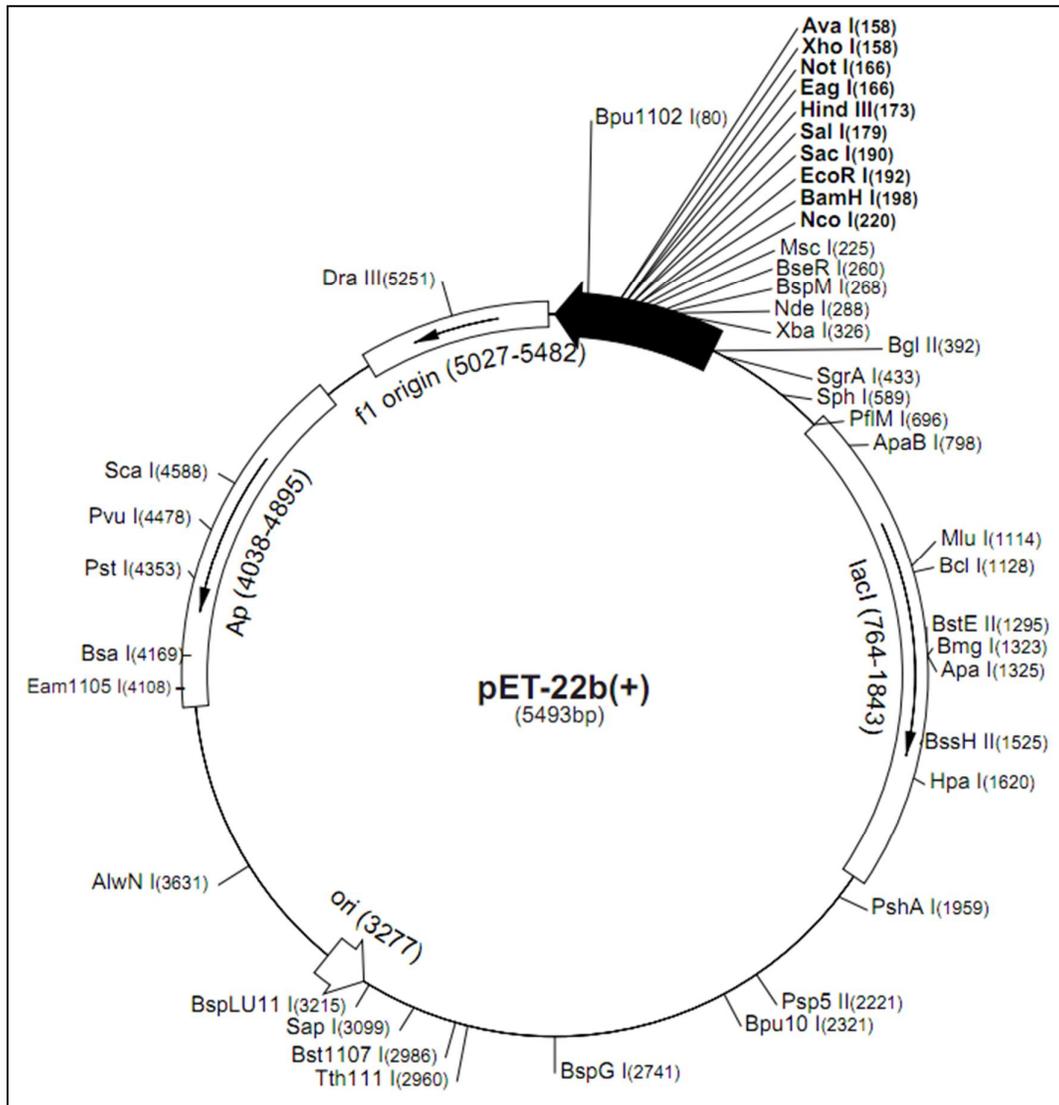


Figura 24. Vector de expresión pET22b.



Figura 25. pET22b en su región de polylinker (80 – 392pb). La secuencia LE216 se insertará entre los sitios NcoI y EcoRI.

El pET22b comprende los siguientes elementos:

- Promotor T7: Promotor de la T7 RNA polimerasa.
- Operador Lac: Operador del gen LacI (764-1843pb).
- Rbs: Sitio de unión ribosomal.
- **Secuencia pelB: Secuencia codificante de los aminoácidos que dirige la proteína de fusión a periplasma, donde esta secuencia es escindida por una proteasa específica.**
- 6xHis-Tag: Cola de polihistidinas. Necesaria para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad.
- Terminador T7: Terminador de la T7 RNA polimerasa.

Debido a que la expresión de conotoxinas en citoplasma promueve la formación de cuerpos de inclusión, **se eligió un vector que exprese las proteínas recombinantes en el espacio periplásmico.**

**En el vector pET22b la secuencia pelB redirige la proteína recombinante a periplasma, donde el entorno oxidativo promueve el plegamiento de la misma.** Una vez en periplasma, la pelB es escindida por proteasas específicas.

Se transformaron células DH5 $\alpha$  con el pET22b que crecieron en el medio selectivo. Se preparó una Midi Prep a partir de éstas. Tras la purificación del DNA se realizó una reacción de restricción con EcoRI y NcoI para corroborar que el DNA observado correspondiese al pET22b. La concentración final de pET22b replicado fue de 0.2125 $\mu$ g/ $\mu$ L.

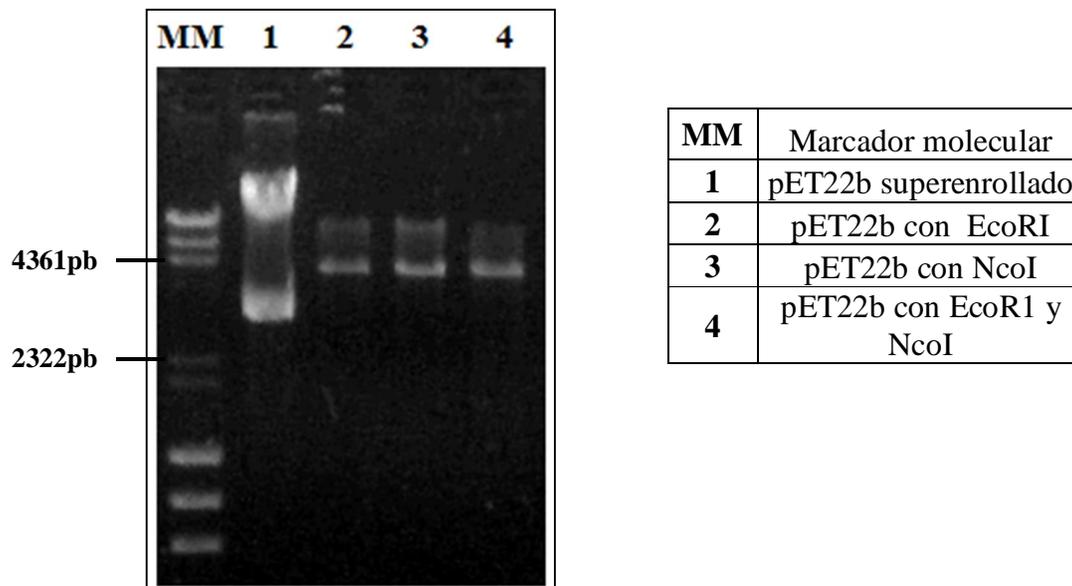


Figura 26. Reacciones de restricción del pET22b. Se observa una marcada diferencia entre el DNA superenrollado y el linearizado. No se observa el fragmento de escisión de la doble restricción (4) debido a que es sumamente diminuto (28pb).

**vi.iii Diseño de los oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos iniciadores para la PCR fueron sintetizados por Invitrogen® y presentan el siguiente diseño:

- Oligo Lil-2  
3' **ggaattc**tta**TGGGCCGAAACGACATGGTGCC** 5'
- Oligo Lil-3  
3' **gcatggg**CCACCACCACCACCAC**GAAAACCTGTACTTCC**  
**AGGGTTGCCGTACTGAAGGCATGAGTTGCG** 5'

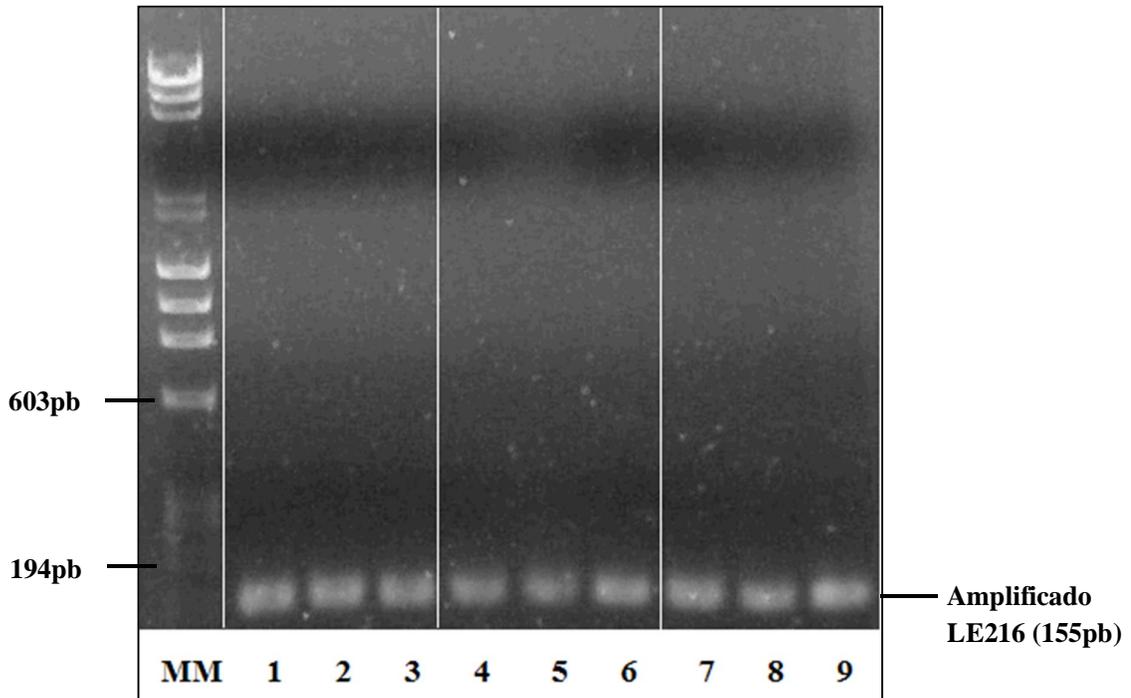
Dónde:

<b>TGC</b>	Parte de la secuencia LE216. Se requiere para lograr el apareamiento de los iniciadores con el molde
<b>tta</b>	Codón de término
<b>gaattc</b>	Sitio de corte de EcoRI

<b>ccatgg</b>	Sitio de corte de NcoI
<b>GAA</b>	Secuencia TEV. Indica un sitio de escisión proteolítica
<b>CCA</b>	6xHis-Tag. Necesario para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad
<b>gc</b>	GC Clamp. Necesario para dar una mayor fuerza de unión y estabilidad entre los iniciadores y el molde

**vi.iv Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se realizaron tres variaciones de temperatura de alineación (55, 58 y 61°C) y tres variaciones en la concentración de MgCl<sub>2</sub> para optimizar la cantidad de DNA amplificado en la PCR.



	MM	Marcador molecular
55°C	1	0.5mM MgCl <sub>2</sub>
	2	1.5mM MgCl <sub>2</sub>
	3	2.5mM MgCl <sub>2</sub>
58°C	4	0.5mM MgCl <sub>2</sub>
	5	1.5mM MgCl <sub>2</sub>
	6	2.5mM MgCl <sub>2</sub>
61°C	7	0.5mM MgCl <sub>2</sub>
	8	1.5mM MgCl <sub>2</sub>
	9	2.5mM MgCl <sub>2</sub>

Figura 27. Amplificados de PCR con distintas temperaturas de alineación y distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub>.

Se seleccionó los 61°C como mejor temperatura de alineación. Sin embargo, la cantidad de amplificado en todas las muestras es relativamente similar. Se realizaron más PCR utilizando esta temperatura y variando la concentración de MgCl<sub>2</sub> en 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5mM.

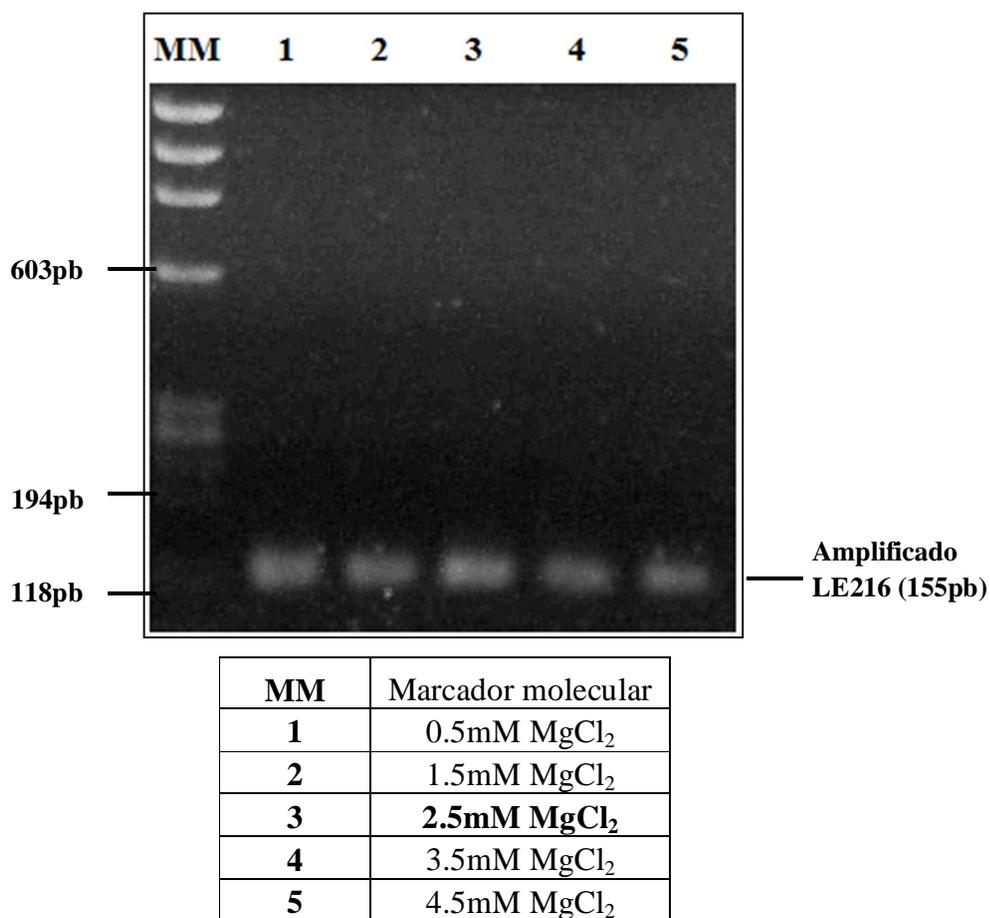


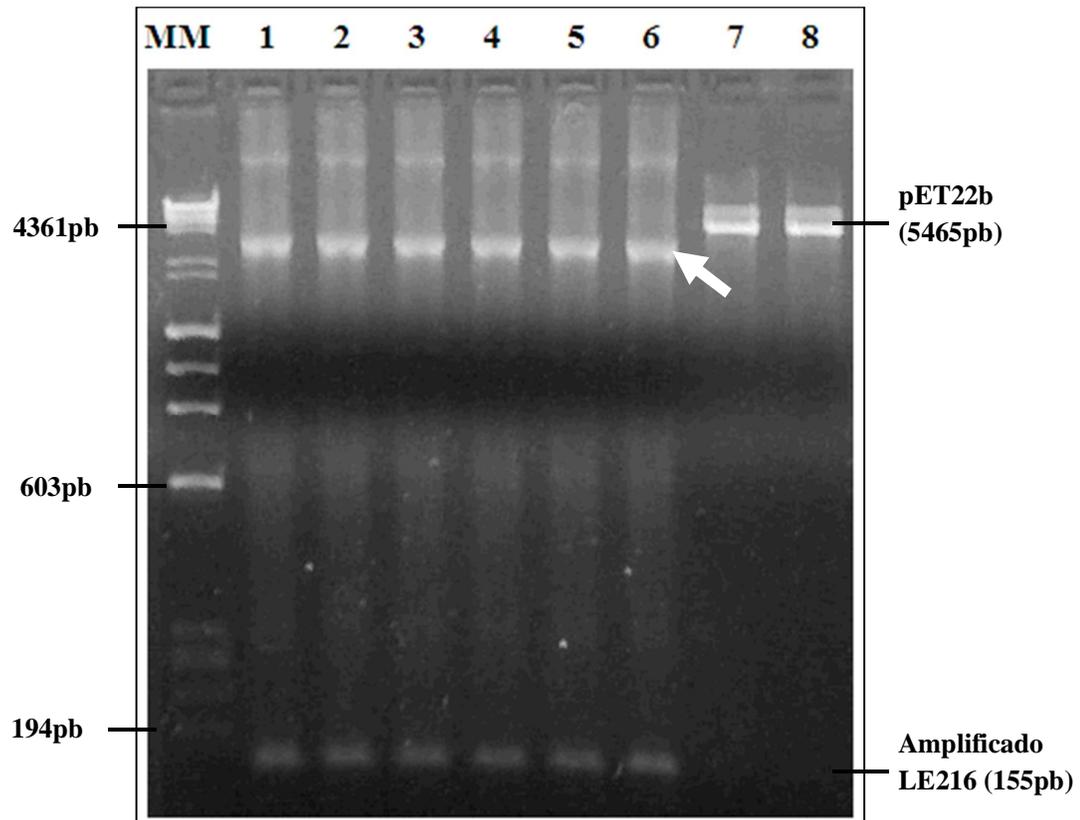
Figura 28. Amplificados de PCR con distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y 61°C como temperatura de alineación.

Con base en estos resultados se determinó que las mejores condiciones de amplificación corresponden a 61°C como temperatura de alineación y 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>.

#### vi.v *Linearización del vector pET22b*

Se realizaron reacciones de restricción en los amplificados de PCR y en el vector pET22b. Se utilizaron las endonucleasas de restricción EcoRI y NcoI. La

reacción del pET22b fue adicionada con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización.

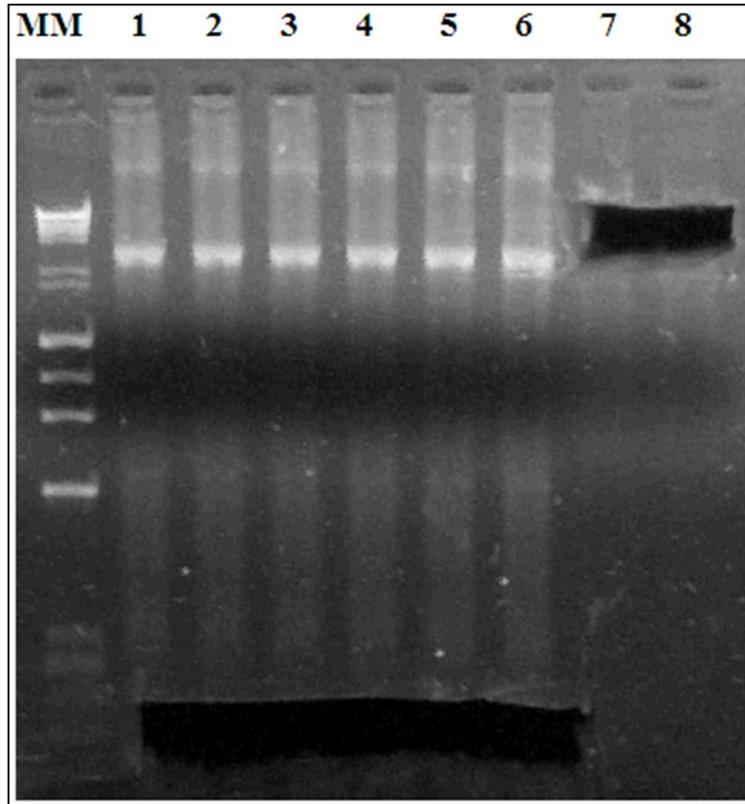


<b>MM</b>	Marcador molecular
<b>1 - 6</b>	Reacciones de PCR
<b>7 - 8</b>	pET22b

Figura 29. Reacciones de restricción con EcoRI y NcoI. Se observan los tamaños esperados para los amplificadores de PCR y el vector. La flecha indica una gran presencia de DNA inespecífico (~3000pb) en las PCR, probablemente debido a contaminación de los reactivos.

#### *vi.vi Purificación de DNA*

Se purificó el DNA de los amplificadores de PCR y el vector pET22b con el PureLink Quick Gel Extraction Kit (INVITROGEN®).



MM	Marcador molecular
1 - 6	Reacciones de PCR
7 - 8	pET22b

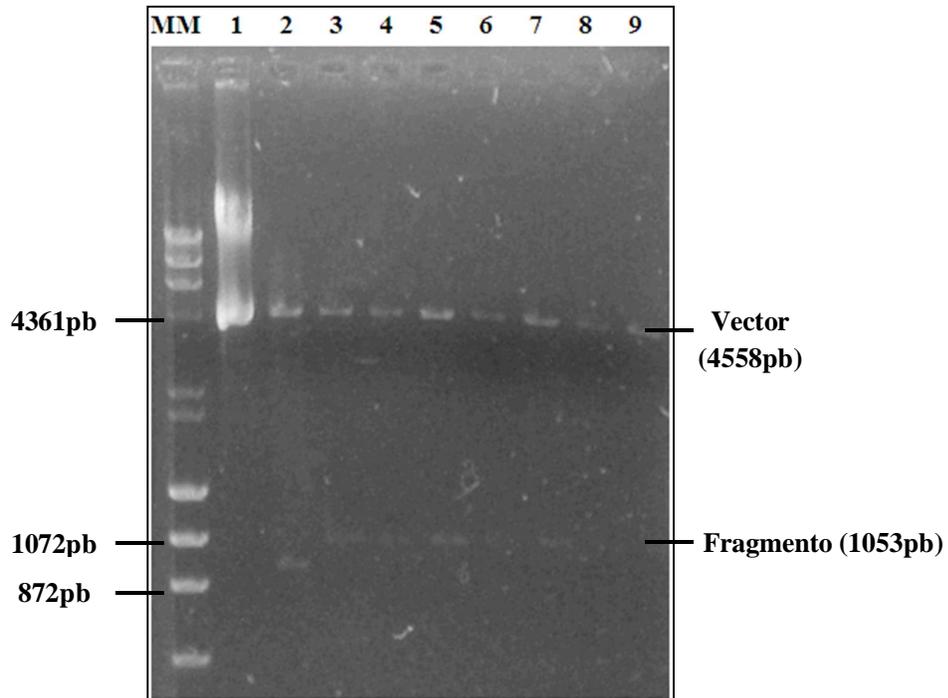
Figura 30. Purificación del DNA en gel de 1% agarosa. Se observan los huecos del gel donde estaba el amplificado de las PCR y el pET22b. El DNA inespecífico permanece en el gel.

Tras la purificación, se cuantificó la concentración de DNA por medio de espectrofotometría de UV. Se determinó una concentración de **1.1ng/μL** para los productos de PCR y **4.5ng/μL** para el pET22b.

#### *vi.vii Inserción de la LE216 en el vector pET22b*

Con base en las concentraciones de DNA obtenidas se realizó la ligación de los amplificados de PCR (secuencia LE216) con el vector de expresión pET22b. Se utilizó el protocolo de la T4 DNA Ligase (PROMEGA®).

Las bacterias DH5α transformadas con el producto de ligación (pET22b LE216) crecieron en el medio selectivo. Se realizó una lisis alcalina para recuperar el DNA plasmídico y se realizó una digestión con Sall y MluI para corroborar que la ligación fuera exitosa. Los tamaños de **4558** y **1053pb** se observaron en el gel de electroforesis.



<b>MM</b>	Marcador molecular
<b>1</b>	pET22b superenrollado
<b>2</b>	pET22b con MluI y Sall
<b>3 - 9</b>	<b>Producto de ligación pET22b LE216 con MluI y Sall</b>

Figura 31. Reacciones de restricción con MluI y Sall. 1. Se muestra el pET22b superenrollado (5493pb); 2. Digestión del pET22b con MluI y Sall y los tamaños del vector (4558pb) y el fragmento (935pb); 3-9. Digestión del pET22b LE216 con MluI y Sall y los tamaños esperados del vector (4558pb) y el fragmento (1053pb).

#### *vi.viii    Secuenciación*

Se seleccionó la muestra del carril 5 de la figura anterior y se mandó secuenciar en los laboratorios Laragen®. La secuenciación reveló la correcta inserción de la LE216 en el pET22b.

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTAGAATAATTTTGTCTTAACCTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACC  
 TGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGGCACCACCA  
 CCACCACCACGAAACCTGTACTTCCAGGCTTGCCTACTGAAGGCATGAGTTGCCAAGAAAAT  
 CAACAATGCTGCTGGCGTTCTTGCTGCCGTGGCGAATGCGAGGCACCATGTCTGTTTCGG  
 CCCATAA GAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAG  
 ATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATA  
 ACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACCTATATCCGGATTGGCG  
 AATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC  
 ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCGCCACGTTCCGCCGGCTTT  
 CCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCCTTACGGCACCTCGACCCCA  
 AAAAATTGATTAGGGTGTGTTACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGAC  
 GTTGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTC  
 TATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAA  
 AATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTANNTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGC  
 GGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAA

ATG	Codón de inicio
AAA	PelB
CCATGG	NcoI
CAC	6xHis-Tag
GAA	Secuencia TEV
TGC	Secuencia LE216
GAATTC	EcoRI
TGA	Codón de término

Figura 32. Resultado de la secuenciación del vector recombinante pET22b-LE216. Se observa que la región entre EcoRI y NcoI presenta la secuencia LE216 (sr11a codificante) así como las correspondientes TEV y 6xHis-Tag (necesarias para la purificación de la proteína).

### *vi.i Transformación de E. coli con el plásmido recombinante pET22b-LE216*

Se eligieron y prepararon células competentes con el método de RbCl de las siguientes cepas con base en sus características:

- BL21: Cepa deficiente en proteasas. Reduce el riesgo de degradación de las proteínas recombinantes al disminuir la eficiencia de la maquinaria proteolítica celular.
- C41: Cepa derivada de la BL21. Presenta una mutación no determinada que evita la muerte celular asociada con la producción de toxinas recombinantes.
- Tunner: Cepa con una deleción en el LacZY que permite la difusión uniforme de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en todas las células del cultivo e induce una síntesis proteica homogénea en el mismo.

Las tres cepas fueron transformadas por choque térmico con el pET22b-LE216 e incubadas en medio TY-2X con ampicilina. Todas crecieron en los medios selectivos y presentaron un gran número de colonias.

## VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### *Conclusiones*

El vector pBSK LE216 fue replicado exitosamente en células JM109 y DH-5 $\alpha$ , siendo mayor su concentración en estas últimas. El DNA plasmídico purificado se dividió en dos muestras con una concentración de 0.7375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.4375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  respectivamente.

La replicación del vector pET22b también fue exitosa en células DH-5 $\alpha$ , obteniéndose una concentración final de 0.2125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

La purificación de DNA a partir del gel de agarosa es un procedimiento durante el cual se pierde una gran cantidad de muestra, por lo que debe ser realizado con cuidado.

El diseño de los oligonucleótidos cebadores fue el adecuado, por lo que la amplificación de la secuencia LE216 resultó eficiente durante las PCR.

Dentro de los parámetros establecidos, las mejores condiciones de amplificación de la LE216 corresponden a 61 $^{\circ}\text{C}$  como temperatura de alineación y 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

La concentración final del producto de PCR fue de 1.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ , mientras que la de la reacción de linearización del pET22b fue de 4.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

La secuenciación del vector pET22b-LE216 presenta las secuencias LE216, TEV y la 6xHis-Tag, lo que corrobora el éxito de la reacción de ligación.

Las cepas BL21, C41 y Tunner crecieron en el medio selectivo por lo que la transformación bacteriana con el PET22b-sr11a fue llevada a cabo eficientemente.

El diseño de los oligonucleótidos, el vector de expresión elegido y las técnicas aplicadas durante este proyecto han resultado eficientes para la conclusión del mismo.

### *Perspectivas*

En las tres cepas transformadas (BL21, C41 y Tunner) se deberá realizar una cinética proteica induciendo la expresión recombinante con IPTG. Las células serán lisadas por medio de sonicación para posteriormente realizar el

western blot con el objeto de corroborar la expresión de la secuencia LE216. Se planea que en dicho procedimiento se utilicen cultivos de 6, 12, 18 y 24 h de duración.

Una vez corroborada la expresión de la proteína sr11a recombinante se proseguiría a realizar una maxiprep de las células transformadas y la posterior purificación de la proteína por cromatografía de afinidad.

Una vez obtenida la proteína se realizarían los ensayos electrofisiológicos correspondientes para analizar la actividad biológica de la sr11a recombinante en diversas variedades de canales Kv, incluyendo los Kv 1.2, 1.4 y 1.6 donde la proteína nativa presenta actividad inhibitoria.

## VIII. PROTOCOLOS

### *viii.i Cuantificación de DNA en UV*

1. Se toman 2 $\mu$ L de muestra y se le agregan 498 $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O.
2. Se lee la absorbancia a 280nm.
3. Se utilizan las siguientes fórmulas:

$$X = (\text{ABS}) (50\mu\text{g/mL})/0.6$$

$$Y = (X) (0.5)$$

$$Z = Y / \mu\text{L DNA} = \text{Concentración de DNA } \mu\text{g/mL}$$

### *viii.ii Electroforesis de DNA en gel de agarosa 1%*

1. Disolver por calentamiento 0.25g de agarosa en 27mL de TBE1x.
2. Agregar 1.4 $\mu$ L de Bromuro de Etidio y vaciar en la cámara del gel.
3. Las muestras se cargan con un volumen 1:5 de Buffer de Carga y se corren a 100v.

### *viii.iii Método de lisis alcalina*

1. Tener la solución III en hielo.
2. Tomar 4mL de cultivo bacteriano.
3. Centrifugar 3.5mL a 5,000rpm durante 5min. a 4°C. Al 0.5mL restante agregarle 50 $\mu$ L de glicerol estéril y guardarlo a -70°C.

4. Resuspender en 100µL de solución I y transferir a un Eppendorf. Dejar 5 min. a temperatura ambiente.
5. Agregar 200µL de solución II fresca. Dejar 5 min. en hielo.
6. Agregar 150µL de solución III. Dejar 10 min. en hielo.
7. Centrifugar 10 min. a 14,000 rpm a 4°C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
8. Agregar 1/10 de volumen de Tris-HCl pH8.0 1M.
9. Agregar 1 volumen de fenol-cloroformo.
10. Vórtex 15s.
11. Centrifugar 5 min. a 5,000rpm a temperatura ambiente. Recuperar la fase superior. Repetir paso 9.
12. Agregar 2 ½ volúmenes de 100% ETOH frío.
13. Dejar 15 min. a -80°C o una noche a -20°C.
14. Centrifugar a 14,000rpm durante 20 min. a 4°C. Decantar y lavar con 80% ETOH.
15. Secar lo mejor posible.
16. Resuspender en 40µL de H<sub>2</sub>O<sub>BM</sub>.

#### Solución I:

- 50mM glucol
- 25mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 10mM EDTA (pH 8.0)

#### Solución II:

- NaOH 0.2N
- SDS 1%

#### Solución III:

- KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> 5M 60mL
- Ácido acético glacial 11.5mL
- dH<sub>2</sub>O 28.5mL

#### **viii.iv *Plasmid Midi y Maxi Prep Kit (QIAGEN®)***

1. Tomar una colonia de un cultivo de células en medio sólido e inocular con ella un cultivo inicial de 2 o 5mL de medio líquido. Incubar ~8 h a 37°C en agitación vigorosa (~300rpm).
2. Diluir el cultivo inicial en 1/500 o 1/1000 en medio selectivo. Incubar a 37°C durante 12 – 16 h en agitación vigorosa (~300rpm).
3. Centrifugar a 6000 x g durante 15 min. a 4°C.
4. Resuspender el pellet en 4 o 10mL de Buffer P1.
5. Añadir 4 o 10mL de Buffer P2; mezclar por inversión de 4 a 6 veces e incubar a temperatura ambiente por 5 min.

6. Añadir 4 o 10mL de Buffer P3; mezclar inmediatamente por inversión de 4 a 6 veces e incubar en hielo durante 20 min.
7. Centrifugar a  $\geq 12,000 \times g$  por 30 min. a 4°C. Remover el sobrenadante que contiene el DNA.
8. Centrifugar el sobrenadante a  $\geq 12,000 \times g$  por 15 min. a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
9. Equilibrar la QIAGEN-tip 100 o QIAGEN-tip 500 añadiendo 4 o 10mL de Buffer QBT y esperando que entre a la resina por gravedad.
10. Añadir el sobrenadante en la QIAGEN-tip con 2x10mL o 2x30mL de Buffer QC.
11. Eluir el DNA con 5 o 15mL de Buffer QF.
12. Precipitar el DNA añadiendo 3.5 o 10.5 mL (0.7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar y centrifugar a  $\geq 15,000 \times g$  por 30 min. a 4°C. Decantar el sobrenadante.
13. Lavar el pellet de DNA con 2 o 5mL de 70% etanol a temperatura ambiente y centrifugar a  $\geq 15,000 \times g$  por 10 min. Decantar el sobrenadante si disolver el pellet.
14. Dejar secar el pellet de 5 a 10 min. y disolverlo en H<sub>2</sub>O BM.

**viii.v *Preparación de células competentes con el método de RbCl***

1. Preparar las soluciones A y B un día antes. Filtrar las soluciones antes de usarlas.
2. Inocular 5mL de medio LB con una colonia bacteriana o con 10 $\mu$ L del stock de glicerol. Incubar toda la noche a 37°C con agitación constante.
3. Inocular 20mL de Medio LB con 0.2mL de cultivo bacteriano por tetraplicado.
4. Crecer las células hasta alcanzar un valor D. O. 600nm.
5. Centrifugar por 5 min. a 4 000rpm a 4°C en un tubo estéril.
6. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 1mL de solución A (fría sobre el hielo). Llevar las células a un volumen final de 10mL con la solución A. Centrifugarlas por 5 min. a 4,000rpm a 4°C.
7. Decantar el sobrenadante. Resuspender las células en 1mL de solución B (fría sobre el hielo). Llevar las células a un volumen final de 10mL con la solución B.
8. Incubar en hielo por 30 min. Centrifugar las células durante 5 min. a 4,000rpm a 4°C.
9. Decantar el sobrenadante y secar el tubo perfectamente. Suavemente, resuspender las células en 2mL de sol. B.
10. Hacer alícuotas de 0.2mL en tubos con 20 $\mu$ L de glicerol estéril. Mezclar por inversión 3 veces y congelar las células en hielo seco inmediatamente. Guardar a -70°C.

Soluciones:

- A) 10mM MOPS pH=7.0  
10mM RbCl
- B) 100mM MOPS pH=6.5  
50mM CaCl<sub>2</sub>  
10mM RbCl

*viii.vi PureLink Quick Gel Extraction Kit (INVITROGEN)*

1. Cortar el área del gel que contiene el DNA de interés.
2. Pesar el fragmento de gel y colocarlo en un tubo de polipropileno de microcentrífuga. Añadir 3 volúmenes de Buffer de Solubilización.
3. Colocar la muestra en el termoblock a 50°C. Incubar durante al menos 10 min. Mezclar por inversión cada 3 min.
4. Tras la disolución, incubar por otros 5 min.
5. Colocar una Columna de Extracción dentro de un Tubo de Lavado y decantar la mezcla de gel y DNA en el centro de la columna.
6. Centrifugar a >12,000 x g durante 1 min.
7. Añadir 500 – 700 µL de Buffer de Lavado con etanol.
8. Centrifugar >12,000 x g durante 1 min y tirar el sobrenadante.
9. Colocar la columna en un Tubo de Recuperación.
10. Añadir 50µL de Buffer de Elución en el centro de la columna.
11. Incubar durante 1 min. a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 12,000 x g durante 1 min. para eluir el DNA en el Tubo de Recuperación.
13. Almacenar el DNA.

*viii.vii Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*

<b>REACTIVOS</b>	<b>µL</b>
H <sub>2</sub> O (BM)	37, 36, 35, 34, 33
Buffer TAQ 10X	5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5
dNTP's	1
Oligo 1	1
Oligo 2	1
Taq Polimerasa	0.5
DNA Templado	4
	<b>50</b>

Programa:

94°C	5 min
94°C	1 min
55, 58, 61°C	1min
72°C	30 s
72°C	10 min
4°C	∞

X 25 ciclos

**viii.viii Reacciones con Endonucleasas de Restricción**

*Linearización del pBSK LE216 con EcoRI\**

<b>Reactivos</b>	<b>μL</b>
H <sub>2</sub> O (BM)	11
Buffer 3	2
DNA (pBSK LE216)	5
EcoRI	2
	<b>20</b>

*Restricción del pBSK LE216 con EcoRI y XhoI*

<b>Reactivos</b>	<b>μL</b>
H <sub>2</sub> O (BM)	11
Buffer 2	2
DNA (pBSK LE216)	5
EcoRI	1
XhoI	1
	<b>20</b>

*Restricción del pET22b con EcoRI y NcoI\*\**

<b>Reactivos</b>	<b>μL</b>
H <sub>2</sub> O (BM)	7
Buffer 3	1
DNA (pET22b)	1
EcoRI	0.5
NcoI	0.5
	<b>10</b>

*Restricción del pET22b-LE216 con MluI y Sall*

<b>Reactivos</b>	<b>μL</b>
H <sub>2</sub> O (BM)	15.5
Buffer 3	2
DNA (pET22b)	1
EcoR1	0.75
XhoI	0.75
	<b>20</b>

\* Se adiciona 1μL de fosfatasa alcalina para evitar la recircularización del vector (Nota: no es necesario desactivarla debido a que durante la purificación del DNA ésta enzima se pierde.)

\*\* En el caso de las reacciones del pET22b con una sola de las enzimas (EcoR1 o NcoI) se siguió el mismo protocolo compensando el volumen de la enzima faltante (0.5μL) con H<sub>2</sub>O BM.

Todas las reacciones se incubaron durante 3 h a 37°C.

*viii.ix Reacción de Ligación*

<b>Reactivos</b>	<b>μL</b>
dH <sub>2</sub> O	0
Buffer 10x	3
ATP 10mM	0.8
sr11a	8
pET22b	22.2
T4 ligasa	1
	<b>35</b>

- La reacción se incuba durante 3 h a temperatura ambiente.
- Se realiza la inactivación de la T4 ligasa por calentamiento a 70°C durante 10 min.

*viii.x Siembra de bacterias en medio selectivo (Ampicilina 1:1000)*

1. Tomar los 100μL de células transformadas y ponerlas en el centro de la caja. Esparcir con un agitador de vidrio estéril.

2. Dejar la caja 30 min. boca arriba para que el medio se impregne.
3. Incubar a 37°C durante ~16 h.

#### **viii.xi Transformación de células competentes por choque térmico**

1. Sacar las células competentes (200µL c/tubo) del REVCO (-70°C). Descongelarlas en hielo durante 30 min.
2. Añadir 0.5 µL de plásmido o los 25µL de reacción de restricción a cada tubo de células competentes.
3. Incubar 30 min. en hielo.
4. Dar choque térmico en termoblock a 42°C durante 1.5 min.
5. Poner en hielo por 1.5 min.
6. Agregar 1mL de medio líquido a cada tubo.
7. Mezclar suavemente por inversión 5 veces.
8. Incubar 60 min a 37°C en termoblock
9. Centrifugar a 2,500rpm durante 5 min. a 4°C.
10. Tirar sobrenadante en cloro. Resuspender el pellet en 100µL de medio líquido.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

Aguilar, M. B., L. I. Pérez-Reyes, Z. López, E. P. de la Coterá, A. Falcón, C. Ayala, M. Galván, C. Salvador & L. I. Escobar. **Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels.** Peptides 2010; 31(7): 1287 – 1291.

Aguilar, M. B., K. S. Luna-Ramírez, D. Echeverría, A. Falcón, B. M. Olivera, E. P. Heimer de la Coterá & M. Maillo. **Conorfamide Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks.** Peptides 2008; 29(2): 186 – 195.

Aguilar, M. B., L. Lezama-Monfil, M. Maillo, H. Pedraza-Lara, E. López-Vera & E. P. Heimer de la Coterá. **A biologically active hydrophobic T-1 conotoxin from the venom of *Conus spurius*.** Peptides 2006; 27(3): 500 – 505.

Armishaw, C. J. & P. F. Alewood. **Conotoxins as research tools and drug leads.** Current Protein and Peptide Science 2005; 6: 221 – 240.

Becker, S. & H. Terlau. **Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production.** Applied Microbiology and Biotechnology 2008; 79(1): 1 – 9.

Bingham, J. P., E. Mitsunaga & Z. L. Bergeron. **Drugs from slugs—Past, present and future perspectives of  $\omega$ -conotoxin research.** Chemico-Biological Interactions 2010; 183(1): 1 – 18.

Bruce, C., E. C. Fitches, N. Chougule, H. A. Bell & J. A. Gatehouse. **Recombinant conotoxin, TxVIA, produced in yeast has insecticidal activity.** Toxicon 2011; 58(1): 93 – 100.

Brusca, R. C. & G. J. Brusca. **Invertebrates.** Sinauer Associates, 2a. Edición 2003. 936 p.

Chen, P., J. E. Garret, M. Watkins & B. M. Olivera. **Purification and characterization of a novel excitatory peptide from *Conus distans* venom that defines a novel gene superfamily of conotoxins.** Toxicon 2008; 52(1): 139 – 145.

Duda Jr., T.F. & A.J. Kohn. **Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*.** Molecular Phylogenetics and Evolution 2005; 34(2): 257 – 272.

Flores-Torres, A. **Purificación y caracterización de péptidos del veneno del caracol marino *Conus delessertii*.** Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM 2009. 109 p.

Gutman, G.A., K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stühmer & X. Wang. **International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels.** Pharmacological Reviews 2005; 57(4): 473 – 508.

Jimenez, E.C., B. M. Olivera & R. W. Teichert.  **$\alpha$ C-conotoxin PrXA: a new family of nicotinic acetylcholine receptor antagonists.** Biochemistry 2007; 46(30): 8717 – 8724.

Lira-Galera, I. E., C. Müdspacher-Ziehl & J. L. Cifuentes-Lemus. **Guía ilustrada de animales venenosos de México y el Caribe.** Limusa, Editores Noriega, México D. F. 1989. 105 p.

López-Vera, E., M. B. Aguilar, E. Schiavon, C. Marinzi, E. Ortiz, R. Restano-Cassulini, C. V. Batista, L. D. Possani, E. P. Heimer de la Cotera, F. Peri, B. Becerril & E. Wanke. **Novel alpha-conotoxins from *Conus spurius* and the alpha-conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity**

**inhibition of nicotinic acetylcholine receptors.** Federation of European Biochemical Societies Journal 2007; 274(15): 3972 – 3985.

Loughnan, M., A. Nicke, A. Jones C. I. Schroeder, S. T. Nevin D. J. Adams, P. F. Alewood & R. J. Lewis. **Identification of a novel class of nicotinic receptor antagonists: dimeric conotoxins VxXIIA, VxXIIB, and VxXIIC from *Conus vexillum*.** The Journal of biologic chemistry 2006; 281(34): 24745 – 24755.

Luna-Ramírez, K. S., M. B. Aguilar, A. Falcón, E. P. Heimer de la Cotera, B. M. Olivera, M. Maillo. **An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks.** Peptides 2007; 28(1): 24 – 30.

Maillo, M., M. B. Aguilar, E. López-Vera, A. G. Craig, G. Bulaj, B. M. Olivera & E. P. Heimer de la Cotera. **Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides.** Toxicon 2002; 40(4): 401 – 407.

Marx, U. C., L. N. Daly & D. J. Craik. **NMR of conotoxins: structural features and an analysis of chemical shifts of post-translationally modified amino acids.** Magnetic Resonance in Chemistry: MRC 2006; 44: S41 – S50.

Meiglitsch, P. A. & F. R. Schram. **Invertebrate Zoology.** Oxford University Press, 3a. Edición 1991. 640 p.

Mondal, S., R. M. Babu, R. Bhavna & S. Ramakumar. **I-conotoxin superfamily revisited.** Journal of Peptide Science 2006; 12(11): 679 – 685.

Norelle, D. & D. J. Craik. **Structural Studies of Conotoxins.** IUBMB Life 2009; 61(2): 144 – 150.

Olivera, B. M. & R. W. Teichert. **Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: a model for concerted pharmacological discovery.** Molecular Interventions 2007; 7(5): 251 – 260.

Olivera, B.M., J. Rivier, C. Clark, C. A. Ramilo, G. P. Corpuz, F. C. Abogadie, E. E. Mena, S. R. Woodward, D. R. Hillyard & L. J. Cruz. **Diversity of *Conus* neuropeptides.** Science 1990; 249(4966): 257 – 263.

Olivera, B. M.. ***Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design. 50 million years of neuropharmacology.** Molecular biology of the cell 1997; 8: 2101 – 2109.

Olivera, B. M.. ***Conus* venom peptides: Reflection of the biology clades and species.** Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 2002; 33: 25 – 47.

Peng, C., S. Tang, C. Pi, J. Liu, F. Wang, L. Wang, W. Zhou & A. Xu. **Discovery of a novel class of conotoxin from *Conus litteratus*, It14a with a unique cysteine pattern.** Peptides 2006; 27(9): 2174–2181.

Rupert, E. E. & R. D. Barnes. **Invertebrate Zoology.** Saunders College Publishing, 7a. Edición 2003. 1008 p.

Terlau, H. & B. M. Olivera. **Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides.** Physiological Reviews 2004; 84(1) 41 – 68.

Trussell, G.C. & R. J. Etter. **Integrating genetic and environmental forces that shape the evolution of geographic variation in a marine snail.** Genetica 2001; 112-113: 321 – 327.

Xia, Z., Y. Chen, Y. Zhu, F. Wang, X. Xu & J. Zhan. **Recombinant  $\omega$ -Conotoxin MVIIA Possesses Strong Analgesic Activity.** Biodrugs 2006; 20(5): 275 – 281.

Yuan, D. D., L. Liu, X. X. Shao, C. Peng, C. W. Chi & Z. Y. Guo. **New conotoxins define the novel I3-superfamily.** Peptides 2009; 30(5): 861 – 865.

Yuan, D., L. Liu, X. Shao, C. Peng, C. Chi & Z. Guo. **Isolation and cloning of a conotoxin with novel cysteine pattern from *Conus characteristicus*.** Peptides 2008; 29(9): 1521 – 1525.

Zamora-Bustillos R., M. B. Aguilar & A. Falcón. **Identification, by molecular cloning, of a novel type of I2superfamily conotoxin precursor and two novel I2conotoxins from the wormhunter snail *Conus spurius* from the Gulf of México.** Peptides 2010; 31: 384 – 393.

Zhang, L., C. P. Chou & M. Moo-Young. **Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system.** Biotechnology Advances 2011; 29(6): 923 – 929.

www.coneshell.com Página consultada en Febrero de 2012.