



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**Caracterización electrofisiológica de α -conotoxinas sintéticas
sobre receptores nicotínicos de acetilcolina**

Tesis

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

Biól. Minerva Reynoso Jiménez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Estuardo López Vera

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Ciudad Universitaria

COMITÉ TUTOR:

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Instituto de Neurobiología

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica de Sistemas Arrecifales

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Instituto de Química

Dr. José Federico del Río Portilla

Instituto de Química

MÉXICO, CD. MX., JULIO, 2020



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.



Caracterización electrofisiológica de α -conotoxinas sintéticas sobre receptores nicotínicos de acetilcolina

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(Biología Marina)

PRESENTA:
Biól. Minerva Reynoso Jiménez

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. José Estuardo López Vera
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Ciudad Universitaria

COMITÉ TUTOR:
Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez
Instituto de Neurobiología

Dra. Judith Sánchez Rodríguez
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica de Sistemas Arrecifales

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros
Instituto de Química

Dr. José Federico del Río Portilla
Instituto de Química

MÉXICO, CD. MX., JULIO, 2020

Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por permitir mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo a mis estudios con la beca de manutención con número de CVU 863872.

Al Dr. José Estuardo López Vera por permitirme el ingreso al laboratorio de Toxinología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por su apoyo académico, tiempo, dedicación, consejos y guía en este proyecto de investigación.

Al Dr. Manuel Aguilar Ramírez por las observaciones que realizó, las dudas que me ayudó a resolver y por hacerme tener más curiosidad sobre otro tipo de conotoxinas. A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez por los comentarios, observaciones y dudas que me ayudaron a ampliar mi panorama. Al Dr. José Federico del Río Portilla y al Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros por aceptar formar parte de mi Comité Tutorial, por supervisar, dar continuidad y realizar observaciones tanto al trabajo experimental como en el escrito.

A la Dra. Fabiola Hernández Vázquez por la paciencia que ha tenido conmigo desde nivel licenciatura y por los consejos y observaciones realizadas en el presente trabajo.

Al M. en C. Brian Urbano Alonso por sumergirme en el mundo de la malacología además por él llegué al laboratorio de Toxinología Marina, gracias totales.

Finalmente quiero agradecer al personal de la Coordinación de Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología: Diana Juárez Bustos, Guadalupe Godoy Medina, Yazmín Valenzuela Velázquez y Gabriela Almaraz Mejía por el apoyo brindado con respecto a los trámites y documentación.

Agradecimientos personales

A mis padres, Francisco y Sandra, por siempre insistir en que debo seguir adelante en todos los ámbitos de mi vida y por todo el apoyo incondicional que me han ofrecido a lo largo del camino. Los amo.

A mi hermana Vero por esas pláticas nocturnas sobre el rumbo que han tomado nuestras vidas y por los momentos bonitos que hemos vivido juntas.

A Mariel Mora González por estar a mi lado desde hace más de diez años riendo y llorando, y por estar en los momentos más inimaginables de mi vida.

A Dulce Hernández y Daniel Martínez por ser esas personas que me cambian el humor rápidamente siempre sacándome una sonrisa y una carcajada.

A Ramiro Ramos por hacer el posgrado más llevadero, por esas tardes de música en tu laboratorio maldiciendo todo a nuestro alrededor, por las aventuras que en poco tiempo vivimos juntos y por las discusiones sobre el norte y el centro del país. Te extraño mucho.

A mis amados Arantza y Marco por siempre hacerme reír con sus comentarios y anécdotas.

A mis compañeros del laboratorio: Xime, por haberme recibido en el lab y aguantar mis tonterías; Angie, por todos los consejos que me diste y esas pláticas que me permitieron seguir adelante. Te quiero mucho; a Luis Na⁺ porque siempre estabas dispuesto al chisme y a Daniela por enseñarme que aun enseñando puedo seguir aprendiendo.

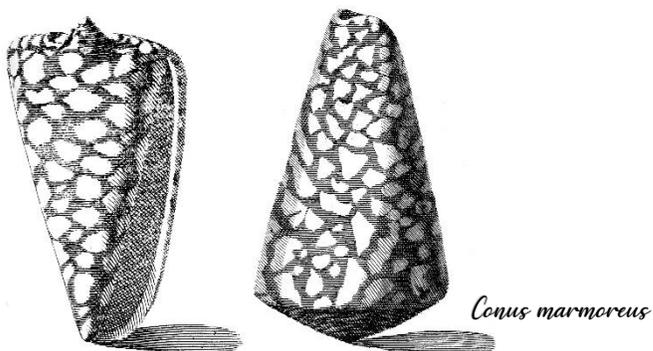
Finalmente quiero agradecer nuevamente al Dr. Estuardo por aceptarme en el laboratorio después de tanta insistencia de mi parte, por la nueva música y nuevas bandas que me enseñó y por todos esos litros de café que lo esperaban al llegar al laboratorio.

“El mar es todo. Cubre siete décimas del globo terrestre. Su aliento es puro y saludable. Es un inmenso desierto, donde el hombre nunca está solo, porque siente vida por todos lados”

- Julio Verne.

“El buen maestro es el que, mientras repite lo antiguo, es capaz de encontrar en ello lo nuevo”

- Confucio.



Índice general

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	4
Biología de <i>Conus</i>	4
Aparato venenoso de <i>Conus</i>	5
Conotoxinas	6
Modificaciones postraduccionales	7
Formación de enlaces disulfuro	8
Clasificación de conotoxinas	10
Receptores nicotínicos de Acetilcolina (RnACh)	10
Conotoxinas que interactúan con Receptores nicotínicos de Acetilcolina	14
Superfamilia A	14
Superfamilia B3	15
Superfamilia D	15
Superfamilia J	15
Superfamilia M	16
Superfamilia S.....	16
α -conotoxinas	16
Subclase α -3/5	17
Subclase α -4/3	17
Subclase α -4/4	18
Subclase α -4/6	18
Subclase α -4/7	19
Subclase α -5/5	19
Estudio de las conotoxinas	22
Justificación	23
Hipótesis	23

Objetivos	23
Objetivo general:.....	23
Objetivos específicos:.....	23
Materiales y métodos	24
Plegamiento de conotoxinas	24
Separación de α -conotoxinas por RP-HPLC	25
Expresión heteróloga	26
Registros electrofisiológicos	26
Resultados	28
Plegamiento de conotoxinas	28
Evaluación electrofisiológica	33
Curva dosis-respuesta	40
Discusión	41
Conclusiones	49
Perspectivas	50
Bibliografía	51

Índice de Figuras

- Figura 1. Ejemplo de la diversidad de la Superfamilia Conoidea compuesta por las familias Conidae, Turridae y Terebridae; clasificados de acuerdo a las características de su concha y rádula. Modificado de Puillandre & Holford, 20105
- Figura 2. (A) Esquema general del aparato venenoso de *Conus*, modificado de Olivera, 2002. (B) Microscopía electrónica de barrido de diente radular en forma de arpón de *C. fergusoni*. ...6
- Figura 3. Ejemplos de modificaciones postraduccionales presentes en las conotoxinas modificado de Buczek et al., 2005.8
- Figura 4. Formación de enlaces disulfuro. Modificado de Gilbert, 2013.8
- Figura 5. Posibles isoformas que presentan las α -conotoxinas, siendo las regiones X_m y X_n residuos de aminoácidos diferentes a la cisteína, también denominados asa intercisteína.9
- Figura 6. Receptor nicotínico de acetilcolina neuronal $\alpha 4\beta 2$ de *Homo sapiens*. PDB [5KXI] A) Muestra el receptor a través de la membrana donde los segmentos de cada subunidad están embebidos en el espacio transmembranal. B) Vista superior del receptor donde se observan de distintos colores las cinco subunidades que lo conforman y el poro que se forma al interior de estas. Elaboración propia.11
- Figura 7.. Procesos de síntesis, transporte y degradación de la acetilcolina en el botón sináptico. Acetilcolina (ACh); Transportador de Acetilcolina Vesicular (VAcHT); Proteína transportadora de la Colina (ChT); Acetil coenzima A (AcCoA); Acetilcolintransferasa (ChAT); Acetilcolinesterasa (AChE) y Acetato (Ac). Modificado de Fisher & Wonnacott, 2012.13
- Figura 8. Ovocitos de *Xenopus laevis* en estadio de desarrollo V y VII donde se observa tanto el polo animal (zona oscura) como el polo vegetal (zona clara) bien definidos.....26
- Figura 9. Perfiles cromatográficos de las pruebas piloto donde se observan los tiempos en los cuales se silenció la reacción (5, 10, 30 y 60 min) para B y C; para cada corrida se usaron 2 nmoles del péptido A1. A) Péptido lineal (*). B) Reacciones redox con [0.5 mM GSH/5 mM GSSG]. C) Reacciones redox con [1 mM GSH/1 mM GSSG]. El gradiente utilizado para todas las reacciones va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min.28
- Figura 10.. Perfil cromatográfico de los reactivos utilizados durante la reacción redox (Blanco).29
- Figura 11. Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A1. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los números indican los productos colectados.....29

Figura 12. Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A2. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los números indican los productos colectados.....	30
Figura 13.. Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A3. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los números indican los productos colectados.....	30
<i>Figura 14.</i> Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A4. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 mL/min. Los números indican los productos colectados.	31
Figura 15. Corrientes de $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> donde se observa el pulso de acetilcolina seguido de la incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A2 producto 3 [10 μ M]	35
Figura 16. Corrientes de $\alpha 7$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> donde se observa el pulso de acetilcolina seguido de la incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A3 producto 2 [10 μ M].	36
Figura 17. Corrientes de $\alpha 3\beta 2$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> , las flechas indican el primer pulso de acetilcolina tras incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A4 producto 2 [10 μ M].	37
Figura 18. Corrientes de $\alpha 3\beta 2$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> , las flechas indican el primer pulso de acetilcolina tras incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A4 producto 3 [10 μ M].	38
Figura 19. Corrientes de $\alpha 3\beta 2$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> , las flechas indican el primer pulso de acetilcolina tras incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A4 producto 4 [10 μ M].	39
Figura 20. Curva dosis-respuesta para los tres productos con actividad sobre RnACh neuronal $\alpha 3\beta 2$ de la conotoxina A4.	40

Índice de Tablas

Tabla 1. Subunidades que pueden conformar un receptor nicotínico de acetilcolina en mamíferos..	12
Tabla 2. Superfamilias de conotoxinas que tienen como blanco molecular los RnACh. m/n, refiere al espacio entre la segunda y tercera cisteína, y la tercera y cuarta cisteína respectivamente. r, Ratón (<i>Mus musculus</i>); R, Rata (<i>Rattus norvegicus</i>); h, Humano (<i>Homo sapiens</i>); g, Gallo (<i>Gallus gallus</i>) (Abraham & Lewis, 2018; Azam & McIntosh, 2009; Robinson & Norton, 2014; ConoServer, 2019). IC ₅₀ ; Concentración necesaria que requiere un compuesto para inhibir un proceso biológico a la mitad (Aykul & Martinez-Hackert, 2016).....	21
Tabla 3. Secuencias de las 4 α -conotoxinas sintéticas obtenidas por transcriptómica.	24
Tabla 4. Condiciones usadas para plegamiento oxidativo de un paso. EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado.	25
Tabla 5. Rendimiento en unidades de los productos obtenidas de cada α -conotoxina (A1, A2, A3 y A4) teniendo como referencia 5 nmoles de la α -conotoxina RgIA (16,829,353).....	32
Tabla 6. Porcentaje de inhibición de los productos obtenidos del plegamiento de las α -conotoxinas sintéticas sobre RnACh probados en 3 ovocitos diferentes.	34
Tabla 7. Comparación de secuencias de α -conotoxinas sintéticas (A1, A2, A3 y A4) con respecto a α -conotoxinas 4/7 con actividad sobre los RnACh neuronales $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$; donde en rojo se señalan los residuos de Cisteína que le confieren la clasificación de su subclase; en verde y amarillo se señalan los residuos conservados de Serina y Prolina, respectivamente, entre las diferentes conotoxinas; y en azul se señalan los residuos con característica no polar.	45

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
5-HT ₃	5-hidroxitriptamina
Å	Angstrom
Ac	Acetato
AcCoA	Acetil coenzima A
Acetil Co-A	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo acuoso
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
C ó Cys	Cisteína
Ca ²⁺	Ion calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
cDNA	DNA complementario
ChAT	Acetilcolintransferasa
ChT	Proteína transportadora de la Colina
COOH-terminal	Carboxilo terminal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gallo (<i>Gallus gallus</i>)
Gln	Glutamina
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
h	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
HEK293	Células embrionarias de riñón humano 293
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria
K ⁺	Ion potasio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar

mm	Milímetros
mRNA	RNA mensajero
mV	Milivoltios
Na ⁺	Ion sodio
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
NH ₂ -terminal	Amino terminal
nM	Concentración nanomolar
nm	Nanometros
NMDA	N-metil-D-aspartato
nmol	Nanomoles
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrógeno
pM	Concentración picomolar
r	Ratón (<i>Mus musculus</i>)
R	Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)
RnACh	Receptores nicotínicos de acetilcolina
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography)
Ser	Serina
-SH	Grupo tiol o sulfhidrilo
SNC	Sistema nervioso central
TEVC	Fijación de voltaje con dos electrodos (Two-Electrode Voltage Clamp)
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
Tyr	Tirosina
v/v	Volumen/volumen
VAcHT	Transportador de Acetilcolina Vesicular
V _m	Potencial de membrana celular
WoRMS	World Register of Marine Species
X _m	Loop intercisteína <i>m</i> o loop I

X_n	Loop intercisteína n o loop II
μM	Concentración micromolar
μm	Micrometros

Resumen

Existen organismos dentro del phylum Mollusca que han desarrollado a lo largo de la historia evolutiva mecanismos que les han permitido defenderse de depredadores y cazar a sus presas. Ejemplo de esto son los integrantes del género *Conus*, que cuentan con un aparato que es capaz de sintetizar veneno compuesto de pequeñas toxinas, en su mayoría proteicas, comúnmente denominadas conotoxinas y que presentan gran afinidad por sus blancos moleculares. Dentro de estas conotoxinas destacan las pertenecientes a la familia de las α -conotoxinas que se unen con una alta afinidad a los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh).

Debido a que la síntesis de las conotoxinas se lleva a cabo en el ducto del aparato venenoso, se realizaron estudios transcriptómicos obteniéndose 4 secuencias similares a α -conotoxinas de diferentes especies de *Conus*: *C. capitaneus*, *C. eburneus*, *C. rolani* y *C. lenavati*.

El presente trabajo se centró en identificar las mejores condiciones de plegamiento para estas conotoxinas y obtener las tres isoformas posibles (globular, listón y cuentas) por medio de plegamiento oxidativo en un paso utilizando diferentes concentraciones de glutatión oxidado y reducido. Además, se identificó el efecto de éstas sobre tres diferentes RnACh (dos neuronales: $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 2$, y el muscular adulto: $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$). Los resultados indican que las diversas isoformas de la conotoxina A4 presentan actividad inhibitoria mayor a 80% sobre el subtipo $\alpha 3\beta 2$ del RnACh.

Abstract

There are organisms within the phylum Mollusca that have developed throughout evolutionary history mechanisms that have allowed them to defend themselves from predators and hunt their prey. An example of these are the members of the genus *Conus* which possess an apparatus that is capable of synthesizing venom composed of small toxins, mainly proteic, commonly referred to as conotoxins and have great affinity for their molecular targets. Within these conotoxins, stand out those belonging to the α -conotoxins family that bind with high affinity to the nicotinic acetylcholine receptors (nAChR).

Due to the fact that the synthesis of the conotoxins is carried out in the duct of the venomous apparatus, transcriptomics studies were conducted obtaining 4 sequences similar to α -conotoxins from different species of *Conus*: *C. capitaneus*, *C. eburneus*, *C. rolani* and *C. lenavati*.

The present study focused on identifying the best folding conditions for these conotoxins and obtaining the three possible isoforms (globular, ribbon and beads) through one-step oxidative folding using different ratio of oxidized and reduced glutathione. Furthermore, their effect on three different nAChR (two neuronal: $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 2$, and adult muscle subtype ($\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$) was identified. The results indicate that the different isoforms of the conotoxin A4 display inhibitory activity higher than 80% on subtype $\alpha 3\beta 2$ of nAChR.

Introducción

La tierra está constituida por diferentes ecosistemas, en ocasiones bastante hostiles, en donde los organismos que residen ahí deben competir por los recursos para su supervivencia (Calvete, 2017). Es por ello que durante el proceso evolutivo de distintos grupos animales - desde invertebrados como artrópodos, equinodermos y moluscos, hasta vertebrados como peces, reptiles, anfibios e incluso mamíferos- han originado diversas estrategias para la defensa y captura de la presa; en algunos casos esta estrategia involucra una maquinaria sofisticada para la producción de veneno con el fin de inmovilizar a su depredador o ingerir a su presa. El veneno es una mezcla de toxinas producidas por un organismo, derivado del metabolismo para envenenar a otra especie por medio de un mecanismo diseñado para inyectar las toxinas a su presa (Hodgson, 2012). Estas sustancias generan una cadena de sucesos bioquímicos dentro del organismo, que afectan sus procesos vitales como permeabilidad de las membranas, circulación sanguínea o transmisión neuromuscular que pueden derivar a su muerte (Calvete, 2017; Castañeda Pasarón, 2000).

La naturaleza química de las toxinas que constituyen los venenos incluyen enzimas, proteínas, péptidos con efectos neurotóxicos y cardiotoxicos, pequeñas moléculas como aminos biogénicas, alcaloides, glicósidos y terpenos que con frecuencia presentan actividad biológica para usos farmacéuticos (Hodgson, 2012). Es por ello que se han desarrollado diferentes metodologías para detectar aquellas toxinas biomédicamente relevantes que presentan actividad en la membrana del sistema nervioso central (SNC), en canales iónicos, como agentes anticancerígenos, inhibidores de crecimiento tumoral, antivirales, agentes antiinflamatorios y metabolitos que afectan los procesos mediados por microfilamentos (Desjardine *et al.*, 2007).

Dentro de los organismos productores de veneno están los caracoles marinos cónidos, pertenecientes al género *Conus*, que presentan una gran cantidad de compuestos activos, denominados conotoxinas, que son considerados como una fuente emergente de péptidos terapéuticos (Lebbe *et al.*, 2014).

Antecedentes

Biología de *Conus*

Clasificación del género en MolluscaBase (2018). *Conus* Linnaeus, 1758. World Register of Marine Species (WoRMS):

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Gastropoda

Orden: Neogastropoda

Superfamilia: Conoidea

Familia: Conidae

Género: *Conus*

Los caracoles cónidos son gasterópodos pertenecientes a la familia Conidae y junto con las familias Terebridae y Turridae forman parte de la superfamilia Conoidea. Éstos se caracterizan por ser caracoles marinos, en su mayoría venenosos (Olivera, 2002; Olivera *et al.*, 2013).

Dentro de la familia Conidae se encuentra el género *Conus* que comprende aproximadamente 700 especies. Este género es miembro de la superfamilia Conoidea, la cual es la más diversa y compleja taxonómicamente (Figura 1) (Gao *et al.*, 2017). Los organismos pertenecientes al género se distribuyen en aguas tropicales y subtropicales principalmente en la región del Indo-Pacífico; se les encuentran desde aguas profundas hasta la zona intermareal, asociados a litorales rocosos, arrecifes de coral y fondos arenosos (Dutertre *et al.*, 2016; Uribe *et al.*, 2017).

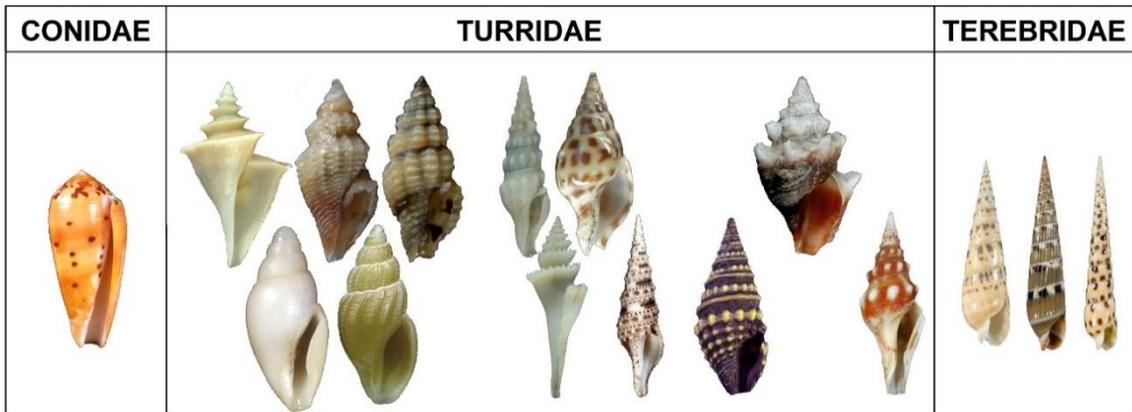


Figura 1. Ejemplo de la diversidad de la Superfamilia Conoidea compuesta por las familias Conidae, Turridae y Terebridae; clasificados de acuerdo a las características de su concha y rádula. Modificado de Puillandre & Holford, 2010

Su gran diversidad ha permitido que el género desarrolle potentes venenos para la defensa contra depredadores y la captura de su presa; clasificándolos según sus hábitos alimenticios en vermívoros, aquellos que consumen poliquetos; molusquívoros, alimentándose de otros moluscos; y piscívoros, que se alimentan de peces (Biass *et al.*, 2015; Dutertre *et al.*, 2016).

Para ello han desarrollado un mecanismo capaz de paralizar a sus presas efectivamente, que incluye un veneno compuesto de péptidos neurotóxicos e inyectado gracias a un sofisticado aparato venenoso que cuenta con un diente radular en forma de arpón y que sirve como aguja hipodérmica (Kumar *et al.*, 2015; Uribe *et al.*, 2017).

Aparato venenoso de *Conus*

Como se ha mencionado anteriormente, y debido a que su desplazamiento es relativamente lento, estos caracoles cónidos cuentan con un aparato venenoso especializado que les permite inmovilizar a su presa rápidamente (Safavi-Hemami *et al.*, 2010). Éste se compone de un diente radular hueco similar a un arpón el cual se conecta al bulbo venenoso por medio de un ducto venenoso tubular como se observa en la Figura 2 (Akondi *et al.*, 2014); es en esta última estructura en donde se produce la mezcla de componentes biológicamente activos

denominados conotoxinas que posteriormente serán inyectados a la presa o depredador (Akondi *et al.*, 2014; Dutertre *et al.*, 2016).

Rajabi *et al.* (2016) describen que la producción y suministro del veneno de *Conus* involucra tres pasos generales:

- 1) Síntesis, procesamiento y empaquetamiento de toxinas peptídicas.
- 2) Generación y almacenamiento del diente radular para su posterior transferencia a la punta de la probóscide.
- 3) Inserción final de la rádula e inyección del veneno.

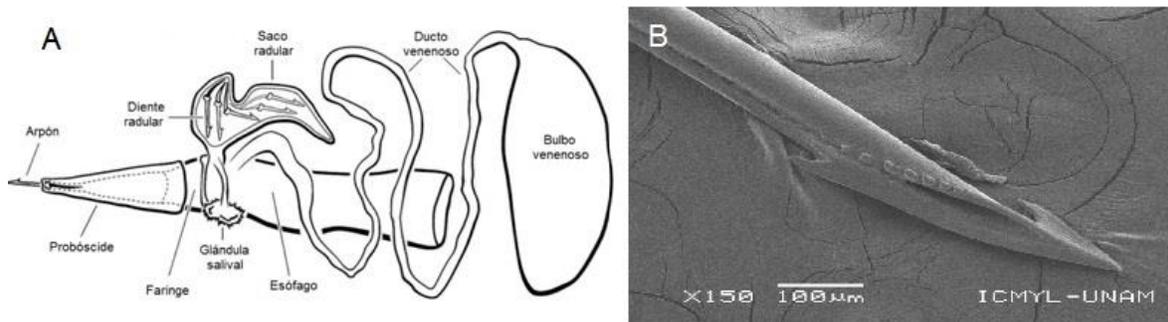


Figura 2. (A) Esquema general del aparato venenoso de *Conus*, modificado de Olivera, 2002. (B) Microscopía electrónica de barrido de diente radular en forma de arpón de *C. fergusonii*.

Conotoxinas

Los venenos de los cónidos son muy complejos, ya que cada especie puede expresar de 50 a 200 toxinas peptídicas de entre 12 a 35 aminoácidos (Olivera *et al.*, 2014). Los componentes del veneno se conocen como conopéptidos, compuestos por péptidos pobres en enlaces disulfuro que pueden contener de uno a ninguno; y en conotoxinas, que se encuentran compuestos de múltiples enlaces disulfuros, siendo ésta su característica estructural más importante y predominante (Akondi *et al.*, 2014; McIntosh *et al.*, 1999).

Estos compuestos se sintetizan en las células epiteliales del conducto venenoso, se expresan como proteínas precursoras en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Mir *et al.*, 2016); estas proteínas precursoras se encuentran organizadas con una secuencia señal, denominada región pre, en la sección NH₂-terminal, seguida de una pro-región, la región de la toxina madura (generalmente rica en residuos de cisteína) y una región COOH-terminal; tras una actividad proteolítica obligatoria que se encarga de escindir el precursor se genera la

toxina madura (Terlau & Olivera, 2004; Watkins *et al.*, 2006). Tanto la secuencia señal (pre-región) como la región pro en la sección del amino terminal se encuentran altamente conservadas, mientras que la región de la toxina madura es hipervariable por la presencia de múltiples residuos de aminoácidos entre los residuos de cisteínas. Estas toxinas peptídicas presentan un alto grado de modificaciones postraduccionales lo que incrementa su diversidad y por ende expande el repertorio estructural (Jakubowski *et al.*, 2006; Kaponó *et al.*, 2013).

Las conotoxinas muestran una gran diversidad molecular habiendo evolucionado en todo el grupo filogenético y a través de las estrategias de alimentación de *Conus*. Esta multiplicidad se ve reflejada en la clasificación de al menos 16 superfamilias genéticamente distintas y además las conotoxinas se categorizan con respecto a su patrón de cisteína y blanco farmacológico (Lebbe *et al.*, 2014).

Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales de los aminoácidos son modificaciones covalentes típicas de las cadenas laterales o grupo R. Éstas se conocen por tener una influencia considerable en la estructura y bioactividad del péptido (Espíritu *et al.*, 2013).

Las conotoxinas son los productos génicos mayormente modificados postraduccionalmente que se conocen con respecto a otras proteínas. Sus modificaciones incluyen la formación de enlaces disulfuro y algunas modificaciones postraduccionales comunes como amidación del C-terminal, γ -carboxilación del glutamato, sulfatación de la tirosina, ciclación del glutamato (piroglutamato), formación de residuos de hidroxiprolina, bromación del triptófano y glicosilación de la serina y treonina como se muestra en la Figura 3 (Buczek *et al.*, 2005; Jakubowski *et al.*, 2006). Cambios en la estructura tridimensional del péptido provistos por estas modificaciones dan como resultado una especificidad óptima de unión para isoformas y subtipos de receptores, lo cual es importante para la inmovilización de la presa.

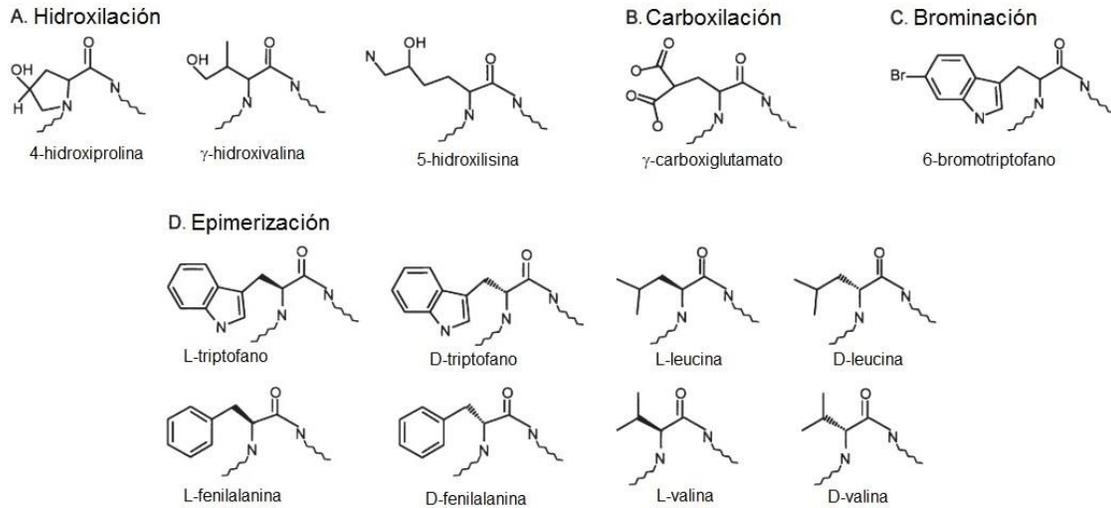


Figura 3. Ejemplos de modificaciones postraduccionales presentes en las conotoxinas modificadas de Buczek *et al.*, 2005.

Formación de enlaces disulfuro

De forma general las proteínas y péptidos derivados de células excretoras deben mantener su función en el ambiente extracelular, el cual puede ser hostil para estas moléculas. Es por ello que han desarrollado mecanismos para prevenir la desnaturalización o degradación proteolítica, siendo uno de éstos la formación de puentes disulfuro (Bulaj, 2005).

La formación de estos enlaces disulfuro involucra la reacción del grupo tiol (-SH) de la cadena lateral de dos residuos de cisteína ubicados en la posición espacial adecuada, donde el anión S^- de un grupo sulfhidrilo actúa como nucleófilo y ataca la cadena lateral de la segunda cisteína y así formar un enlace disulfuro como se muestra en la Figura 4 (Gilbert, 2013; Rajpal & Arvan, 2013).

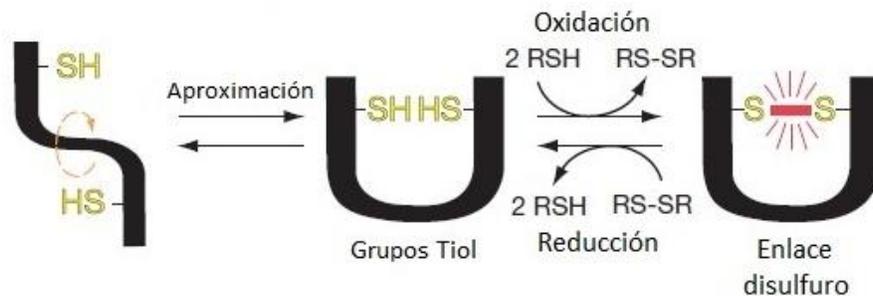


Figura 4. Formación de enlaces disulfuro. Modificado de Gilbert, 2013.

En células eucariontes, específicamente en el lumen del retículo endoplásmico, la reacción es catalizada por una enzima del tipo oxidoreductasa, como lo es la proteína disulfuro isomerasa que actúa como un aceptor de electrones en la oxidación o como un donante de electrones durante el rompimiento del enlace disulfuro o reducción y además puede isomerizar enlaces disulfuro en su estado reducido u oxidado (Elgaard *et al.*, 2018; Espiritu *et al.*, 2013).

En el caso de las conotoxinas, su estructura primaria muestra patrones específicos de cisteína que generan asas de aminoácidos responsables por su especificidad al receptor; esta interacción entre la conotoxina y el receptor depende de la estructura terciaria bien definida del péptido y es estabilizada por enlaces disulfuro; es por ello que el éxito farmacológico de las conotoxinas puede atribuirse a su especificidad al receptor y selectividad de isoformas (Espiritu *et al.*, 2013).

En el caso específico de las α -conotoxinas, al presentar cuatro residuos de cisteínas se pueden generar tres posibles isoformas: globular, listón o cuentas (Figura 5) (Muttenthaler *et al.*, 2011).

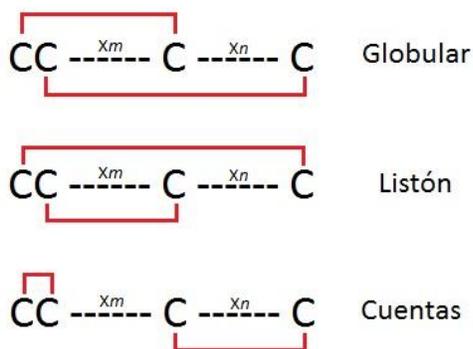


Figura 5. Posibles isoformas que presentan las α -conotoxinas, siendo las regiones X_m y X_n residuos de aminoácidos diferentes a la cisteína, también denominados asa intercisteína.

Clasificación de conotoxinas

Dependiendo de las características bioquímicas, la similitud en la secuencia señal, el patrón de cisteínas que generan los enlaces disulfuro y el blanco molecular las conotoxinas se pueden clasificar en:

- Superfamilias: Se basa en la secuencia señal conservada del precursor (Akondi *et al.*, 2014; Halai & Craik, 2009; Mir *et al.*, 2016)
- Familias: Ya sea en familias estructurales, que se basan en el arreglo de cisteínas localizada en la región madura del precursor (Halai & Craik, 2009; Mir *et al.*, 2016); o en familias farmacológicas, el cual depende del blanco molecular o actividad fisiológica (Akondi *et al.*, 2014; Mir *et al.*, 2016).

Como consecuencia de la diversidad de las conotoxinas éstas presentan un amplio rango de blancos moleculares como son canales iónicos de Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , receptores adrenérgicos, receptores acoplados a proteínas G o receptores nicotínicos de acetilcolina, entre otros; lo que además les confiere la propiedad de servir como una herramienta molecular para el estudio de los canales antes mencionados (Daly & Craik, 2009; Muttenthaler *et al.*, 2011; Robinson & Norton, 2014).

Receptores nicotínicos de Acetilcolina (RnACh)

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh) son proteínas membranales pertenecientes a los miembros de canales catiónicos activados por ligando y median la transmisión sináptica. Se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del sistema nervioso central y periférico en vertebrados (Lebbe *et al.*, 2016). Además, participan en funciones fisiológicas como cognición, actividad motora y analgesia; y en condiciones patológicas como el Alzheimer, Parkinson, epilepsia, depresión, autismo, esquizofrenia, entre otros. Su apertura está controlada por neurotransmisores endógenos como la acetilcolina o por ligandos exógenos como la nicotina (Gotti *et al.*, 2006).

Éstos se componen de pentámeros de subunidades individuales formando un poro central en donde cada subunidad está conformada por 4 segmentos transmembranales como se observa en la Figura 6. El amino terminal permanece en el dominio extracelular seguido por tres segmentos transmembranales; un asa citoplasmática se localiza entre el segmento S3 y S4; y finalmente el carboxilo terminal en el lado extracelular (Taylor, 2012).

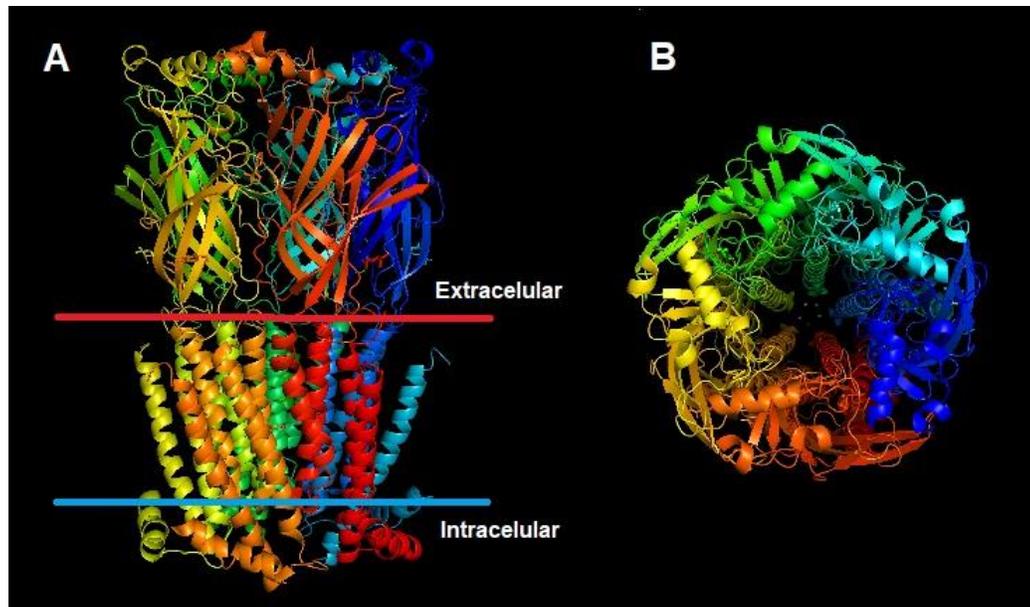


Figura 6. Receptor nicotínico de acetilcolina neuronal $\alpha 4\beta 2$ de *Homo sapiens*. PDB [5KXI] A) Muestra el receptor a través de la membrana donde los segmentos de cada subunidad están embebidos en el espacio transmembranal. B) Vista superior del receptor donde se observan de distintos colores las cinco subunidades que lo conforman y el poro que se forma al interior de estas. Elaboración propia.

Existen dos tipos de RnACh en vertebrados: aquellos que se ubican en la parte postsináptica de la placa neuromuscular (musculares) y aquellos presentes en la parte pre y postsináptica del sistema nervioso central y periférico (neuronaes) (López-Vera, 2010).

Con respecto a los receptores musculares las subunidades necesarias son $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ para el subtipo fetal, mientras que para el subtipo adulto la subunidad γ se sustituye por ϵ ; en esta estructura los dos sitios de unión de la acetilcolina se encuentran en las interfases α/δ y en α/γ ó α/ϵ . En el caso de los receptores neuronaes se encuentran conformados por diferentes combinaciones de las subunidades α_{2-9} y β_{2-4} . Diferente constitución en los

pentámeros forma una variedad compleja de subtipos de RnACh que les confiere propiedades farmacológicas y biofísicas diferentes (Lebbe *et al.*, 2016; Taylor, 2012).

El sitio de unión al ligando de los RnACh neuronales se encuentra en la interfase extracelular entre las subunidades α y β ; la primera subunidad es la que contribuye la cara principal (+) mientras que la subunidad β contribuye su cara complementaria (-).

En los mamíferos se han clonado 16 subunidades diferentes, implicadas en la formación del poro las cuales se presentan en la Tabla 1:

Nombre de las subunidades	Número de subunidades diferentes
α	9
β	4
γ	1
δ	1
ϵ	1

Tabla 1. Subunidades que pueden conformar un receptor nicotínico de acetilcolina en mamíferos.

El RnACh puede presentar tres estados conformacionales: abierto, reposo y desensibilizado. La unión de moléculas agonistas al sitio de unión al ligando o sitio ortostérico desencadena una serie de pequeños cambios conformacionales en los canales que permiten el paso de un estado en reposo a una conformación abierta. Con respecto a los estados de reposo y desensibilizado, éstos no conducen cationes. En el estado abierto el receptor conduce Na^+ , K^+ y Ca^{2+} al interior de la célula provocando una despolarización de la membrana postsináptica e incrementa la excitabilidad neuronal (Hurst *et al.*, 2013). Al unirse la acetilcolina al receptor éste cambia rápidamente de un estado de reposo a uno abierto; sin embargo cuando el receptor se mantiene expuesto a su ligando por más tiempo entra en un estado desensibilizado (Dani, 2016; Karlin, 2010).

El ligando natural que permite la apertura del receptor es la acetilcolina la cual se sintetiza a partir de dos precursores, la acetil coenzima A (acetil-CoA) y la colina con ayuda de la colina O-acetiltransferasa. El primero se sintetiza predominantemente a través del complejo piruvato deshidrogenasa, mientras que la mayor fuente de la colina es aquella derivada de la hidrólisis de la acetilcolina mediada por las acetilcolinesterasa (Fisher & Wonnacott, 2012). El neurotransmisor se libera por la fusión de las vesículas con la membrana celular e interactúa con los RnACh. La acetilcolina es un compuesto químicamente estable que puede persistir en la hendidura sináptica; su eliminación es lenta por lo que la acetilcolinesterasa se encuentra presente en la misma lo que divide la acetilcolina en acetato y colina; el primero se descompone mientras que el segundo es transportado al citosol partiendo de la hendidura sináptica gracias a un transportador de alta afinidad por la colina (Pohanka, 2012). El proceso de síntesis, transporte y degradación de la acetilcolina se observa en la Figura 7.

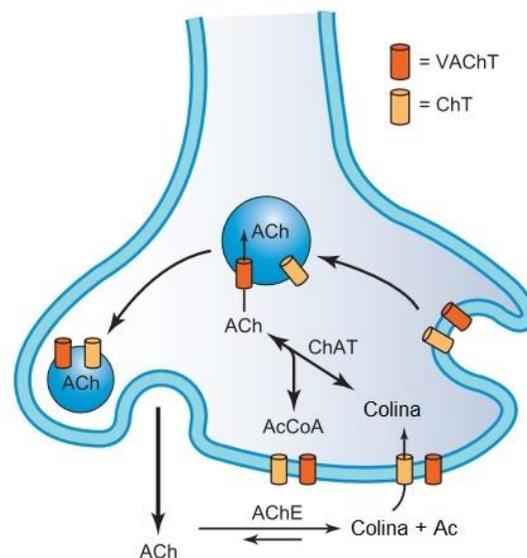


Figura 7. Procesos de síntesis, transporte y degradación de la acetilcolina en el botón sináptico. Acetilcolina (ACh); Transportador de Acetilcolina Vesicular (VAcHT); Proteína transportadora de la Colina (ChT); Acetil coenzima A (AcCoA); Acetilcolintransferasa (ChAT); Acetilcolinesterasa (AChE) y Acetato (Ac). Modificado de Fisher & Wonnacott, 2012.

Conotoxinas que interactúan con Receptores nicotínicos de Acetilcolina

Se entiende por canales dependientes de ligando a aquellas proteínas transmembranales que se abren en respuesta a la unión de su mensajero químico, como un neurotransmisor, induciendo un cambio conformacional en el mismo para permitir el paso de iones (Mir *et al.*, 2016).

Muchas conotoxinas inhiben de manera antagónica este tipo de canales incluyendo receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh), de 5-hidroxitriptamina (5-HT₃) y de N-metil-D-aspartato (NMDA), también pueden afectar en forma agonista al receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA).

Dentro del veneno de todas las especies de *Conus* que se han investigado se han encontrado al menos una conotoxina que inhibe la actividad de los RnACh en la unión neuromuscular lo que permite la interrupción de la transmisión sináptica con el fin de paralizar a la presa o depredador (Lewis *et al.*, 2012; McIntosh *et al.*, 1999; Norton & Olivera, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente las conotoxinas se clasifican en superfamilias y a su vez se clasifican en familias donde se incluyen péptidos que presentan un arreglo de cisteínas similar y blancos farmacológicos homólogos.

Específicamente las conotoxinas que tienen como blanco molecular los RnACh pertenecen a la superfamilia A; sin embargo, existen conotoxinas que son específicas para estos receptores que pertenecen a otras superfamilias (Tabla 2) y por ende los patrones de cisteínas son distintos (Abraham & Lewis, 2018).

Superfamilia A

Esta superfamilia fue la primera en describirse, cuya característica es la presencia de 4 residuos de cisteína dispuestos de la siguiente manera: CC-C-C, lo cual provee dos enlaces disulfuro. Los péptidos aquí clasificados tienen como blancos moleculares diferentes subtipos

de RnACh neuronales y musculares y se les conoce como α -conotoxinas (Dutertre *et al.*, 2013; Robinson & Norton, 2014). En esta superfamilia se agrupan la mayoría de las α -conotoxinas y de las cuales se hablará más adelante.

Superfamilia B3

Esta superfamilia cuenta con un nuevo patrón de cisteínas: C-CC-C, el cual está presente en la conotoxina α -VxXXIVA de *Conus vexillum* (resultado de la secuenciación aleatoria de la librería de cDNA preparada del ducto venenoso) la cual fue sintetizada con los tres posibles arreglos de enlaces disulfuro y mostró una afinidad μ M por el subtipo α 9 α 10 de los RnACh (Abraham & Lewis, 2018; Luo *et al.*, 2013; Robinson & Norton, 2014).

Superfamilia D

Los primeros péptidos identificados para esta superfamilia se aislaron de también de la especie *C. vexillum* y están compuestos por cadenas de 47 aminoácidos e incluyen modificaciones postraduccionales como la hidroxilación de la prolina y la carboxilación del ácido glutámico. Cuentan con 10 residuos de cisteína con el patrón: C-CC-C-CC-C-C-C-C; estas conotoxinas forman dímeros covalentes.

Las conotoxinas VxXXA, VxXXB y VxXXC presentan actividad antagónica no competitiva sobre RnACh neuronales que contengan los subtipos α 7 y β 2 (Abraham & Lewis, 2018; Loughnan *et al.*, 2009; Loughnan *et al.*, 2006; Robinson & Norton, 2014).

Superfamilia J

pI14a (PIXIVA) fue la primera conotoxina caracterizada que inhibe tanto a canales dependiente de voltaje (canal Kv1.6) como a canales dependiente de ligando (RnACh neuronal y muscular). Tiene un tamaño de 25 residuos de aminoácido con amidación del C-terminal, el patrón de cisteína está compuesto por: C-C-C-C, lo que lo cataloga en una superfamilia diferente a la A (Abraham & Lewis, 2018; Imperial *et al.*, 2006).

Superfamilia M

El patrón de cisteína que presentan los miembros que integran esta superfamilia es CC-C-C-CC. Dentro de ésta se halla la familia de las ψ -conotoxinas que son antagonistas no competitivos de los RnACh, es decir, se unen a un sitio diferente al que lo hacen las α -conotoxinas (Abraham & Lewis, 2018; Lluisma *et al.*, 2007; Robinson & Norton, 2014).

Superfamilia S

La conotoxina RVIIIA (de *C. radiatus*) fue el primer inhibidor de RnACh muscular en ser aislado de una superfamilia diferente a la A. El péptido tiene un tamaño de 47 aminoácidos, dentro del cual hay 10 residuos de cisteína y conectividad en los enlaces disulfuro desconocida (C-C-C-C-C-C-C-C) (Abraham & Lewis, 2018; Teichert *et al.*, 2005).

α -conotoxinas

Como se indicó anteriormente, la mayoría de las α -conotoxinas pertenecen a la Superfamilia A. Muchas de estas conotoxinas actúan sobre el sitio de unión de la acetilcolina de forma competitiva; exceptuando la α -conotoxina AuIB que en su conformación globular actúa de forma no competitiva y a aquellas conotoxinas pertenecientes a la Superfamilia D y M, por lo que son selectivas para los diferentes subtipos musculares y neuronales de RnACh. Se cree que en casi todos los venenos de *Conus* existe al menos una α -conotoxina implicada en la captura de la presa inhibiendo la transmisión colinérgica en las uniones neuromusculares (Grishin *et al.*, 2010; Lebbe *et al.*, 2014).

El marco característico de esta familia está dado por CC- X_m -C- X_n -C, donde m y n representan diferente número de residuos de aminoácidos distintos a la cisteínas y esta característica que ha servido para agruparlas en diferentes subclases estructurales (m/n : 3/5, 4/3, 4/4, 4/5, 4/6, 4/7 y 5/5) ya que se ha demostrado que el tamaño de éste se correlaciona con su selectividad farmacológica (Lebbe *et al.*, 2014; M. L. Loughnan & Alewood, 2004).

Aunque sus conformaciones tridimensionales son altamente conservadas las cuatro cisteínas pueden producir tres posibles uniones disulfuro diferentes: globulares, con uniones I-III y II-IV; listón, unidas entre I-IV y II-III; y cuentas con enlaces disulfuro entre las cisteínas I-II y III-IV (figura 5). Además, algunos residuos intercisteínas pueden estar modificados postraduccionalmente lo que conlleva a cambios profundos en la especificidad del subtipo de receptor que tienen como blanco molecular (Armishaw, 2010).

Las α -conotoxinas han ayudado significativamente a la caracterización de los subtipos de nACh de forma *in vivo* e *in vitro*, además estos péptidos específicos poseen un potencial terapéutico (Lebbe *et al.*, 2014).

Subclase α -3/5

Las conotoxinas pertenecientes a esta subclase se han encontrado solamente en caracoles cónidos piscívoros. Este tipo de conotoxinas son antagonistas selectivos de los receptores nicotínicos de acetilcolina musculares interrumpiendo la transmisión neuromuscular provocando la parálisis de la presa (Lewis *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2007).

Por muchos años se han estudiado las α -conotoxinas GI, MI y SI (de *Conus geographus*, *C. magus* y *C. striatus*, respectivamente) y se observó que son conotoxinas neuromusculares con toxicidad y propiedades de unión dependientes en gran medida de la especie; usualmente tienen muy poco o nulo efecto en los receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales; esto se debe a que estas conotoxinas presentan una alta afinidad por los sitios de unión al ligando que se localizan en las interfaces de las subunidades α/γ o α/δ (Janes, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Subclase α -4/3

En 1994 McIntosh descubrió y caracterizó la α -conotoxina Iml del caracol vermívoro *C. imperialis* perteneciente a la subclase 4/3. Aunque presenta los característicos enlaces disulfuro y actividad antagónica comunes a su clase, se descubrió que su secuencia, tamaño y

especificidad al blanco molecular diferían notablemente ya que presenta actividad en receptores musculares de rana, pero no en ratón. Además, se observó baja afinidad por receptores musculares humanos expresados en células HEK293 y también tras realizarse inyecciones de la conotoxina en ratas y ratones se inducían convulsiones lo que llevó a la hipótesis de que el blanco molecular en mamíferos de lmi son receptores neuronales (Dutton & Craik, 2001).

La caracterización farmacológica de esta conotoxina muestra una IC₅₀ de 220 nM sobre el RnACh homomérico $\alpha 7$ de *Rattus norvegicus*, mostrando una mayor afinidad que por el receptor $\alpha 9$ con una IC₅₀ de 1.8 μ M de la misma especie (Azam & McIntosh, 2009).

Subclase α -4/4

La primera conotoxina descrita perteneciente a esta subclase es la BuIA de *C. bullatus*, un caracol cónido piscívoro del Indo-Pacífico; ésta se identificó usando las secciones conservadas de una secuencia señal de una α -conotoxina y la región 3' de la secuencia no traducida para así clonar un nuevo gen del organismo (Azam *et al.*, 2005).

BuIA es una conotoxina con cuatro residuos de aminoácidos tanto en el asa *m* como en el *n*; además, presenta actividad sobre una amplia cantidad de RnACh neuronales, con una mayor potencia de bloqueo sobre receptores que contengan la subunidad $\alpha 6$ y en menor grado aquellos con la subunidad $\alpha 3$. Posteriormente se caracterizó otra conotoxina la α -PIB de *C. purpurascens* que a diferencia de BuIA tiene actividad sobre RnACh del tipo muscular (Janes, 2005; López-Vera *et al.*, 2007).

Subclase α -4/6

Hasta el 2005 la conotoxina AuIB de *C. aulicus* era el único miembro de esta subclase con actividad inhibitoria sobre los RnACh neuronales específicamente bloqueando el subtipo $\alpha 3\beta 4$ con un arreglo en sus enlaces disulfuro de listón (Cys I – Cys IV, Cys II – Cys III) en vez de la forma globular (Cys I – Cys III, Cys II – Cys IV) o nativa (Janes, 2005).

Contrario a la isoforma de la conotoxina anterior en 2015 se identificó la conotoxina VilA de *C. virgo* con una conformación de tipo globular (Cys I – Cys III, Cys II – Cys IV) y con actividad sobre otro subtipo de RnACh neuronal, el $\alpha 3\beta 2$ (Li *et al.*, 2015).

Subclase α -4/7

Esta subclase conforma a los antagonistas más comunes de los RnACh neuronales en los venenos de *Conus*; sin embargo, la conotoxina EI de *C. ermineus* es una excepción ya que tiene como blanco molecular la interfase α/δ y α/γ de los RnACh musculares en mamíferos; esta afinidad está dada por dos residuos de aminoácidos que no se encuentran presentes en conotoxinas neuronales: la Tyr 6, donde casi invariablemente hay una Ser en aquellas conotoxinas neuronales; y Gln 16 (Janes, 2005; Nicke *et al.*, 2004).

Subclase α -5/5

En 2014 se reportó una conotoxina de 16 residuos de aminoácido de *C. australis* denominada AusIA que a diferencia de las demás subclases de α -conotoxinas conocidas presenta 5 residuos de aminoácidos tanto en el asa *m* como en el asa *n*.

Se probaron dos isoformas de AusIA (globular y listón) sobre diferentes subtipos de RnACh neuronales y se encontró que bloquean al receptor neuronal $\alpha 7$ con diferentes afinidades. La isoforma de listón (no nativa) es más estable en comparación de la isoforma globular (Lebbe *et al.*, 2014).

<i>m/n</i>	Especie	α -conotoxina	Blanco molecular	IC ₅₀
Superfamilia A				
3/5	<i>Conus geographus</i>	GI	(α) ₂ β 1 γ δ r	20 nM
4/3	<i>Conus imperialis</i>	ImI	α 7 h	595 nM
			α 3 β 2 h	40.8 nM
		ImII	α 7 h	571 nM
			α 3 β 2 h	9.61 μ M
	<i>Conus regius</i>	RglA	α 9 α 10 R	8.47 nM
			α 7 R	4.66 μ M
4/4	<i>Conus bullatus</i>	BulA	α 7 R	272 nM
			α 3 β 2 R	5.72 nM
			α 6/ α 3 β 2 R	258 pM
4/6	<i>Conus aulicus</i>	AulB	α 3 β 4 R	750 nM
4/7	<i>Conus magus</i>	MII	α 3 β 2 h	4.4 nM \pm 1.2
	<i>Conus purpurascens</i>	PIA	α 6/ α 3 β 2 β 3 h	1.7 nM \pm 1
			α 6/ α 3 β 4 h	12.6 nM \pm 6
	<i>Conus omaria</i>	OmIA	α 7 R	27.1 nM \pm 12
			α 3 β 2 R	11 nM \pm 6
	<i>Conus geographus</i>	GIC	α 3 β 2 h	1.1 nM
			α 4 β 2 h	309 nM
			α 3 β 4 h	755 nM
	<i>Conus episcopatus</i>	Epl	α 7 R	30 nM
	<i>Conus pennaceus</i>	PnlA	α 7 h	510 nM
	<i>Conus pergrandis</i>	PelA	α 3 β 2 R	19.2 nM \pm 2.1
			α 9 α 10 R	33 nM \pm 5
<i>Conus textile</i>	TxlA	α 3 β 2 R	2 nM \pm 0.4	
<i>Conus arenatus</i>	ArIA	α 7 R	6.02 nM	

			$\alpha 3\beta 2$ R	18 nM
5/5	<i>Conus australis</i>	AusIA	$\alpha 7$ g	Globular 11.68 $\mu\text{M} \pm 1.53$
				Listón 9.67 $\mu\text{M} \pm$ 0.01
Superfamilia B3				
	<i>Conus vexillum</i>	VxXXIVA	$(\alpha)_2\beta 1\gamma\delta$ r	6.6 μM
			$\alpha 9\alpha 10$ R	1.2 $\mu\text{M} \pm 0.5$
Superfamilia D				
	<i>Conus vexillum</i>	VxXXB	$\alpha 7$ R	400 pM ± 200
			$\alpha 4\beta 2$ R	228 nM ± 84
			$\alpha 3\beta 2$ R	8.4 nM ± 1.8
	<i>Conus generalis</i>	GeXXA	$\alpha 9\alpha 10$ h	28 nM
Superfamilia J				
	<i>Conus planorbis</i>	PIXIVA	$(\alpha)_2\beta 1\varepsilon\delta$ r	540 nM
			$\alpha 3\beta 4$ R	8.7 μM
Superfamilia M				
	<i>Conus parius</i>	PrIIIE	$(\alpha)_2\beta 1\varepsilon\delta$ r	245 nM
Superfamilia S				
	<i>Conus radiatus</i>	RVIIIA	$(\alpha)_2\beta 1\gamma\delta$ h	33 nM
			$(\alpha)_2\beta 1\varepsilon\delta$ h	100 nM

Tabla 2. Superfamilias de conotoxinas que tienen como blanco molecular los RnACh. *m/n*, refiere al espacio entre la segunda y tercera cisteína, y la tercera y cuarta cisteína respectivamente. r, Ratón (*Mus musculus*); R, Rata (*Rattus norvegicus*); h, Humano (*Homo sapiens*); g, Gallo (*Gallus gallus*) (Abraham & Lewis, 2018; Azam & McIntosh, 2009; Robinson & Norton, 2014; ConoServer, 2019). IC₅₀; Concentración necesaria que requiere un compuesto para inhibir un proceso biológico a la mitad (Aykul & Martinez-Hackert, 2016).

Estudio de las conotoxinas

De forma tradicional la caracterización de las conotoxinas se realiza mediante la separación de los componentes del veneno por técnicas de cromatografía, seguida por estudios de la bioactividad; es decir, los venenos son evaluados identificando la actividad biológica que presenten ciertas fracciones cromatográficas en diferentes preparaciones biológicas (inyecciones en ratón, cultivos celulares, ensayos electrofisiológicos) para posteriormente seguir con la purificación y caracterización de las mismas (Prashanth *et al.*, 2012).

Esta aproximación de estudio requiere de un cierto número de caracoles, cuya colecta, en ocasiones, no es fácil y existe la preocupación de una sobrecaptura de algunas especies y causar un daño ecológico. Si bien, no existe un estudio estadístico en extenso sobre esto, se sabe que el número de especímenes colectados para cada investigación en la mayoría de los laboratorios oscila entre decenas e incluso un solo organismo por especie de forma anual (Dutertre & Lewis, 2012). Es por ello y dada la importancia y aplicación que tienen estas toxinas que es deseable una segunda aproximación de estudio para limitar la cantidad de organismos requeridos. Por tanto métodos basados en la transcriptómica o proteómica del ducto venenoso han demostrado ser eficaces y de alto rendimiento para identificar una gran cantidad de secuencias de conotoxinas (Fu *et al.*, 2018).

Justificación

El conocimiento generado hasta el momento indica que dependiendo del número y tipo de aminoácidos intercisteínas que conforman las α -conotoxinas presentan una selectividad hacia diferentes subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina. Es por ello que se busca descubrir herramientas moleculares a partir de organismos de origen marino, en este caso de moluscos pertenecientes al género *Conus*, que permitan entender los procesos básicos que subyacen en la función y disfunción de los diversos subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina involucrados en diversas patologías humanas.

Hipótesis

Estudios transcriptómicos a partir de 4 especies de *Conus* (*Conus capitaneus*, *C. eburneus*, *C. rolani* y *C. lenavati*) presentan toxinas con secuencias similares a las α -conotoxinas que tendrán como blancos moleculares distintos subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina.

Objetivos

Objetivo general:

Establecer las mejores condiciones de plegamiento para las 4 α -conotoxinas sintéticas y determinar si existe modulación de los RnACh.

Objetivos específicos:

- Identificar el plegamiento de las 4 α -conotoxinas sintéticas.
- Evaluar las conotoxinas resultantes sobre distintos subtipos de RnACh.
- Determinar la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las α -conotoxinas sintéticas.

Materiales y métodos

Plegamiento de conotoxinas

Como se ha dicho anteriormente las α -conotoxinas presentan dos enlaces disulfuro lo que le da estabilidad y mantiene una conformación bioactiva en las moléculas (Gyanda *et al.*, 2013), es por ello que los péptidos lineales de las α -conotoxinas sintéticas en el presente trabajo (Tabla 3) se sometieron a un ambiente redox para potenciar la generación de enlaces disulfuro y por ende obtener las tres posibles isoformas de éstas. Es de mencionar que las 4 α -conotoxinas pertenecen a la subclase 4/7.

Especie	Nombre	Secuencia
<i>C. capitaneus</i> <i>C. eburneus</i>	A1	GLWVECCADPPCRQNNMEHC PAN
<i>C. rolani</i> <i>C. lenavati</i>	A2	CCEDPPCQQNNMQHC PAN
<i>C. rolani</i>	A3	DKGCCSNRVC SMDHPELCRGK
<i>C. lenavati</i>	A4	GCCSNPPCIANHPEIC

Tabla 3. Secuencias de las 4 α -conotoxinas sintéticas obtenidas por transcriptómica.

Para optimizar las condiciones de plegamiento para estas conotoxinas se realizó de forma piloto diferentes reacciones redox a temperatura ambiente sobre el péptido lineal A1 con distintas concentraciones de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), 1 mM GSH/1 mM GSSG y 0.5 mM GSH/ 5 mM GSSG; las reacciones fueron detenidas a los 5, 10, 30 y 60 minutos con ácido fórmico a una concentración final de 8% y los productos del plegamiento purificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (denominada comúnmente RP-HPLC por sus siglas en inglés; Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) para identificar el producto con mayor rendimiento obtenido. Para cada reacción se usaron 2 nmoles del péptido lineal A1 derivados de una muestra inicial con 40 nmoles resuspendida en 600 μ l de solución A (0.1% (v/v) TFA en H₂O grado HPLC) del cual se usó para cada reacción redox 30 μ l.

Tras realizar las pruebas piloto se observó que la mejor condición de plegamiento para estas conotoxinas está dada por la concentración 1 mM GSH/1 mM GSSG por 60 minutos. Debido a que las demás α -conotoxinas a estudiar (A2, A3 y A4) pertenecen a la misma subclase estructural 4/7 se asume que presentan el mismo arreglo de enlaces disulfuro por lo cual no se realizaron pruebas piloto de plegamiento con los péptido antes mencionados.

Las condiciones de plegamiento oxidativo por un paso se llevaron a cabo según lo descrito en la Tabla 4 a temperatura ambiente por 1 hora; utilizando 26 nmoles para A1, 50 nmoles para A2, 40 nmoles para A3 y 60 nmoles para A4.

0.1 M Tris-HCl pH 7.5
1 mM EDTA pH 7.5
1 mM GSH/1 mM GSSG
Péptido
Agua al volumen final (1 ml)
Ácido fórmico a concentración final 8%

Tabla 4. Condiciones usadas para plegamiento oxidativo de un paso. EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado.

Separación de α -conotoxinas por RP-HPLC

Debido a la naturaleza peptídica de las conotoxinas, éstas fueron separadas por la técnica de RP-HPLC usando una columna analítica C18 Vydac (218TP54, 4.6 x 250 mm, 5 μ m tamaño de partícula, tamaño de poro 300 Å) y provista de una precolumna (4.6 x 10 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) con un gradiente lineal de 10 a 60% de solución B con flujo de 1ml/min en 60 min. Las soluciones usadas para esta separación son las siguientes:

- (A) 0.1% (v/v) TFA en H₂O grado HPLC.
- (B) 0.1% (v/v) TFA en 60% de ACN (acetonitrilo acuoso).

La absorbancia fue monitoreada a una longitud de onda de 220 nm y 280 nm.

Expresión heteróloga

Se expresaron diferentes subtipos de RnACh tanto neuronales como musculares en ovocitos aislados de *Xenopus laevis* en estadio de desarrollo V y VI (Figura 8), mediante la inyección del material genético con el uso del nanoinyector Nanoliter 2000 (World Precision Instruments).

Los subtipos neuronales expresados fueron: $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 2$ inyectando en el citoplasma 50 y 20 ng de mRNA total respectivamente; mientras que se inyectó 27 ng de cDNA total para el subtipo muscular adulto ($\alpha 1$) $_2\beta 1\delta\epsilon$ al núcleo de la célula, localizado en la parte apical del polo animal.

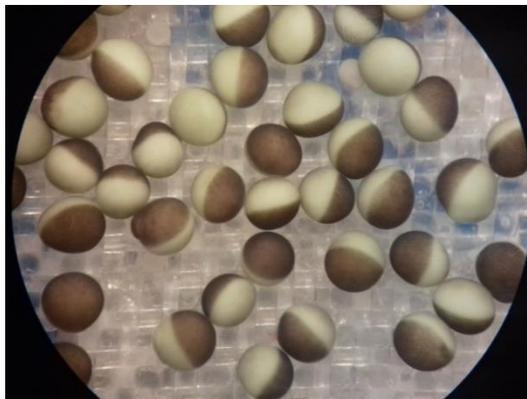


Figura 8. Ovocitos de *Xenopus laevis* en estadio de desarrollo V y VII donde se observa tanto el polo animal (zona oscura) como el polo vegetal (zona clara) bien definidos.

Registros electrofisiológicos

Para confirmar la expresión de los RnACh se utilizó la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC por sus siglas en inglés; Two-Electrode Voltage Clamp) sobre los ovocitos de *X. laevis* inyectados con material genético. El voltaje se fijó a -70 mV y se perfundieron a 1 ml/min con una solución extracelular compuesta de: 96 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ y 5 mM HEPES (pH 7.1-7.5).

Las corrientes se generaron con concentraciones de acetilcolina de 200, 100 y 20 μ M para $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ y ($\alpha 1$) $_2\beta 1\delta\epsilon$, respectivamente, aplicando un pulso, a un flujo de 1 ml/min de

un segundo de duración una vez por minuto para cada concentración a temperatura ambiente.

Se probaron los productos colectados por RP-HPLC de cada una de las 4 α -conotoxinas (Tabla 5) a una concentración de 10 μ M sobre los tres diferentes subtipos de RnACh con el fin de identificar la presencia de actividad. Los productos de las α -conotoxinas se aplicaron individualmente en la cámara de registro (con un volumen de 30 μ L) incubándose por 5 min. Posteriormente se vuelve a generar pulsos de ACh y perfusión de la solución ND96.

Identificadas aquellas α -conotoxinas con actividad inhibitoria sobre el subtipo de RnACh neuronal $\alpha 3\beta 2$ se obtuvieron las curvas dosis respuesta y los valores de la concentración media inhibitoria (IC_{50} por sus siglas en inglés; Half Maximal Inhibitory Concentration) para cada producto obtenido probando cinco concentraciones diferentes por triplicado. Las curvas fueron generadas mediante el programa GraphPad Prism 5 usando el modelo variable dado por la siguiente ecuación:

$$y = \frac{Min + (Max - Min)}{1 + 10^{((logIC_{50} - x)(pendiente\ de\ Hill))}}$$

Donde:

Min = Respuesta inhibitoria mínima.

Max = Respuesta inhibitoria máxima.

logIC₅₀ = logaritmo de la concentración media inhibitoria.

x = logaritmo de las concentraciones de las conotoxinas inhibitorias.

Pendiente de Hill = Constante determinada para conotoxina.

Este modelo no asume que exista una pendiente estándar (con valor de -1.0) por lo que ésta se ajusta a los datos obtenidos (Motulsky, 2007).

Resultados

Plegamiento de conotoxinas

Las pruebas piloto con las diferentes concentraciones de glutatión oxidado y reducido indican que el mejor rendimiento para la obtención de las diferentes isoformas de la α -conotoxinas sintéticas se da con 1 mM GSH/1 mM GSSG, como se observa en la Figura 9 B y C, por lo que se procedió a realizar la reacción redox con los demás péptidos debido a la semejanza de su estructura perteneciente a la subclase 4/7. Tras promover el plegamiento de las α -conotoxinas sintéticas colocándolas en un ambiente redox cuyo cromatograma de blanco de reactivos se muestra en la Figura 10, como se mencionó anteriormente, y separando los productos por RP-HPLC se colectaron los mayoritarios que se muestran en los perfiles cromatográficos de las Figuras 11 a 14 y se marcan numéricamente los productos colectados.

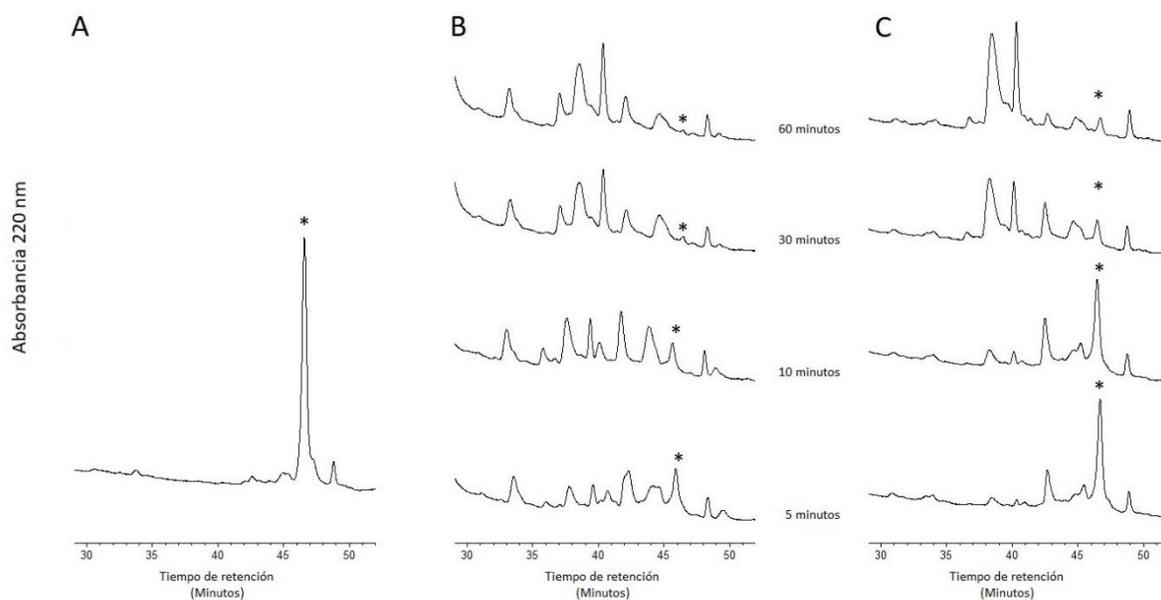


Figura 9. Perfiles cromatográficos de las pruebas piloto donde se observan los tiempos en los cuales se silenció la reacción (5, 10, 30 y 60 min) para B y C; para cada corrida se usaron 2 nmoles del péptido A1. A) Péptido lineal (*). B) Reacciones redox con [0.5 mM GSH/5 mM GSSG]. C) Reacciones redox con [1 mM GSH/1 mM GSSG]. El gradiente utilizado para todas las reacciones va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min.

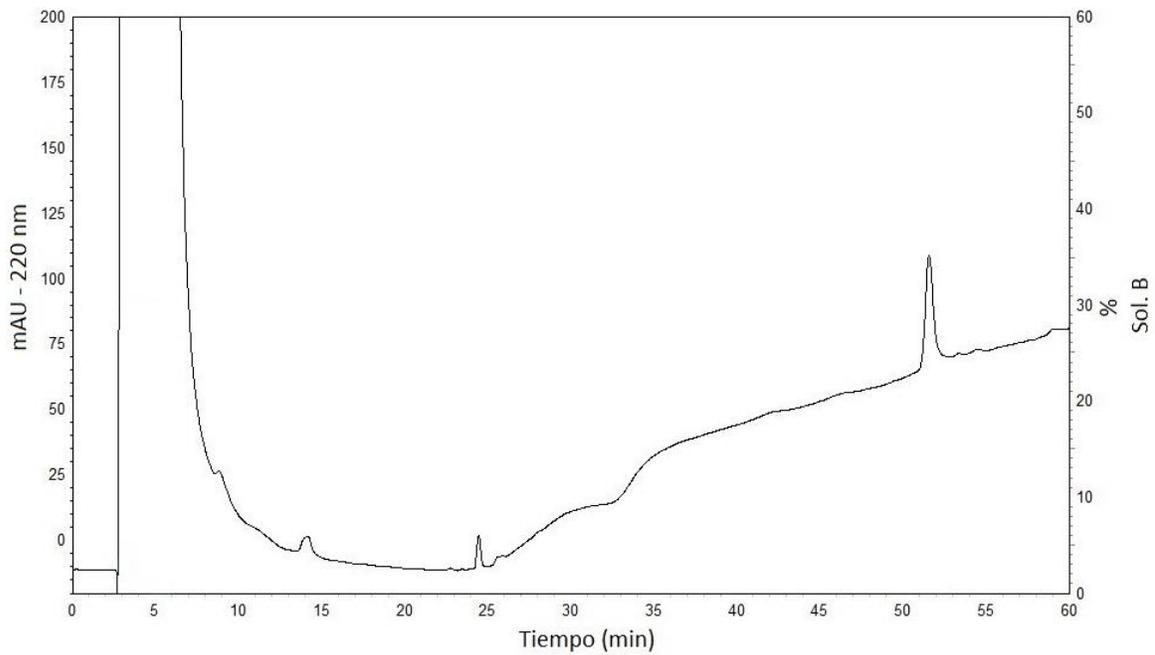


Figura 10.. Perfil cromatográfico de los reactivos utilizados durante la reacción redox (Blanco).

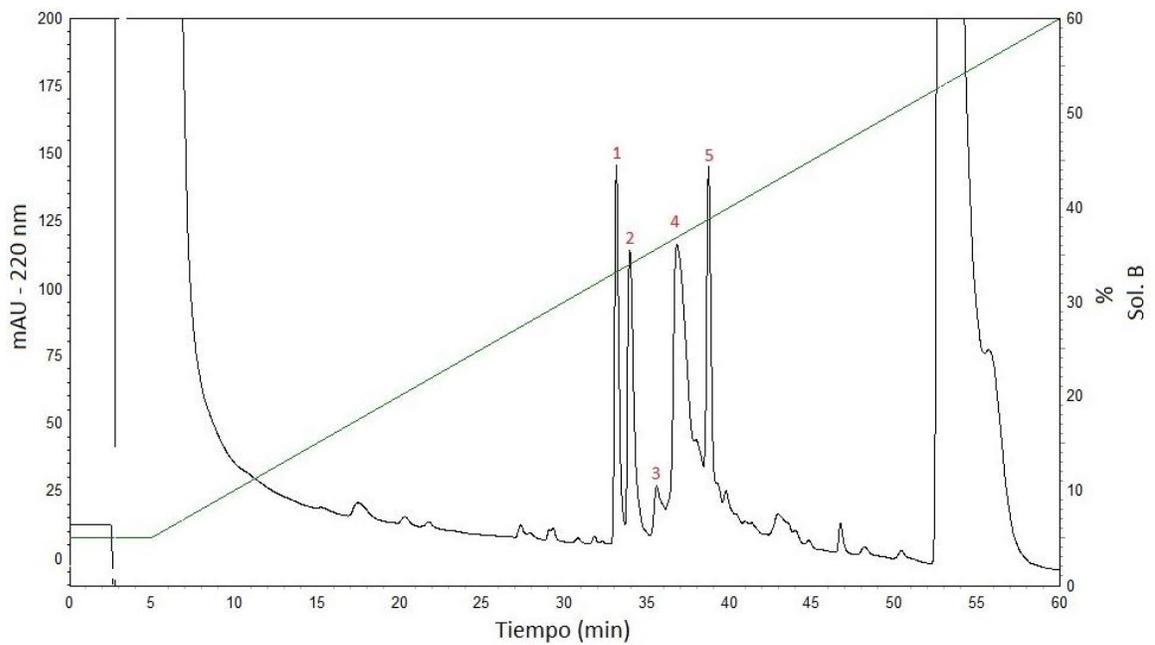


Figura 11. Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A1. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los números indican los productos colectados.

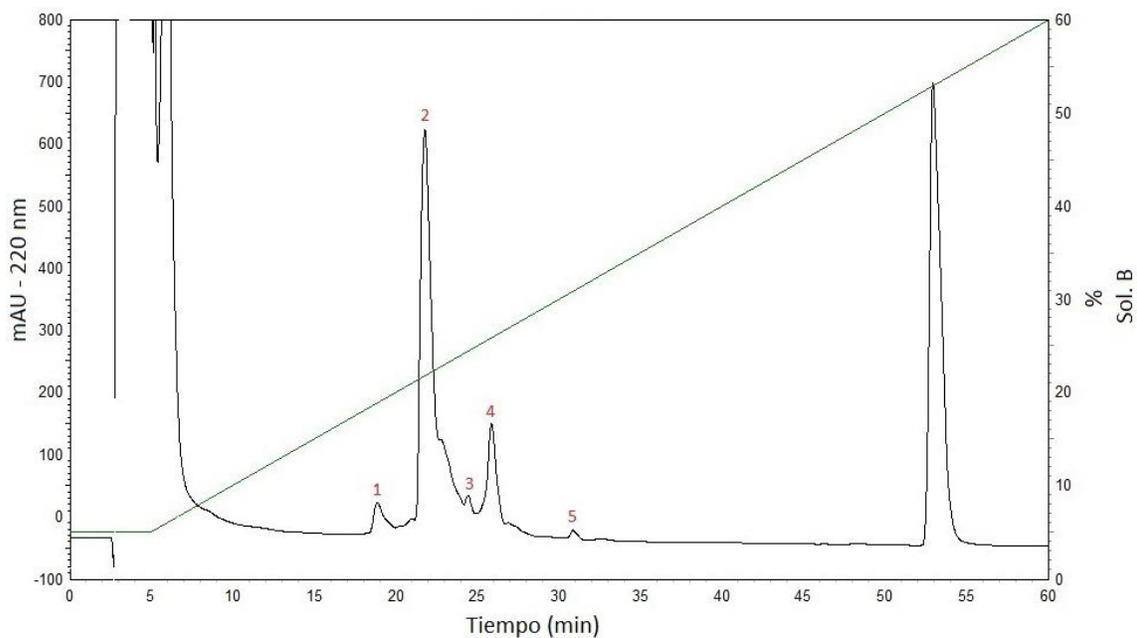


Figura 12. Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A2. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los números indican los productos colectados.

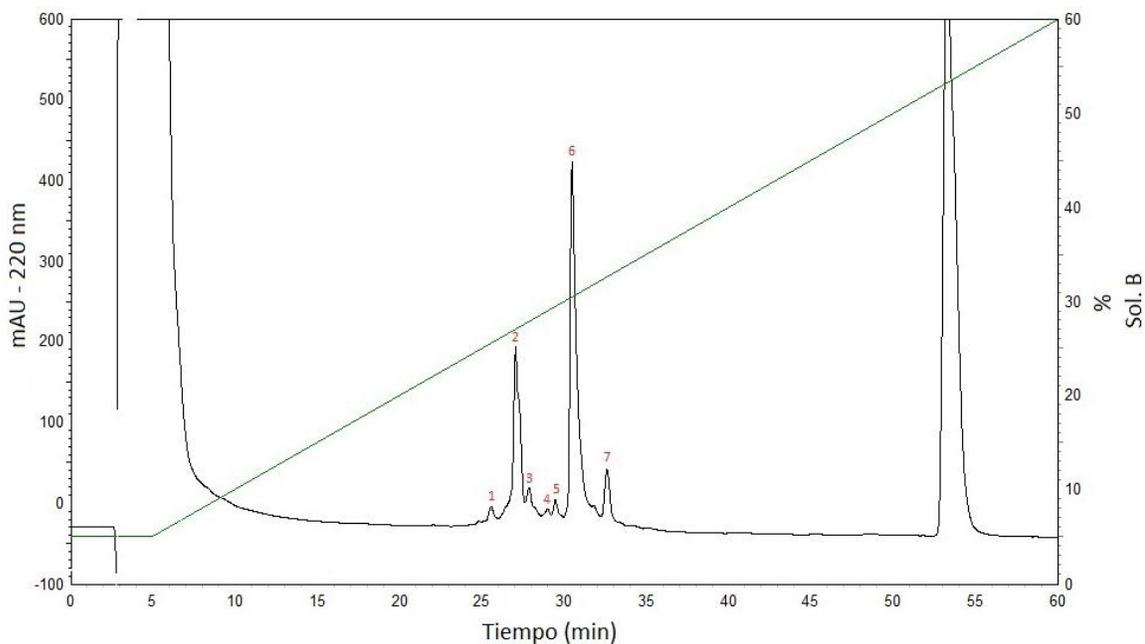


Figura 13.. Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A3. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 ml/min. Los números indican los productos colectados.

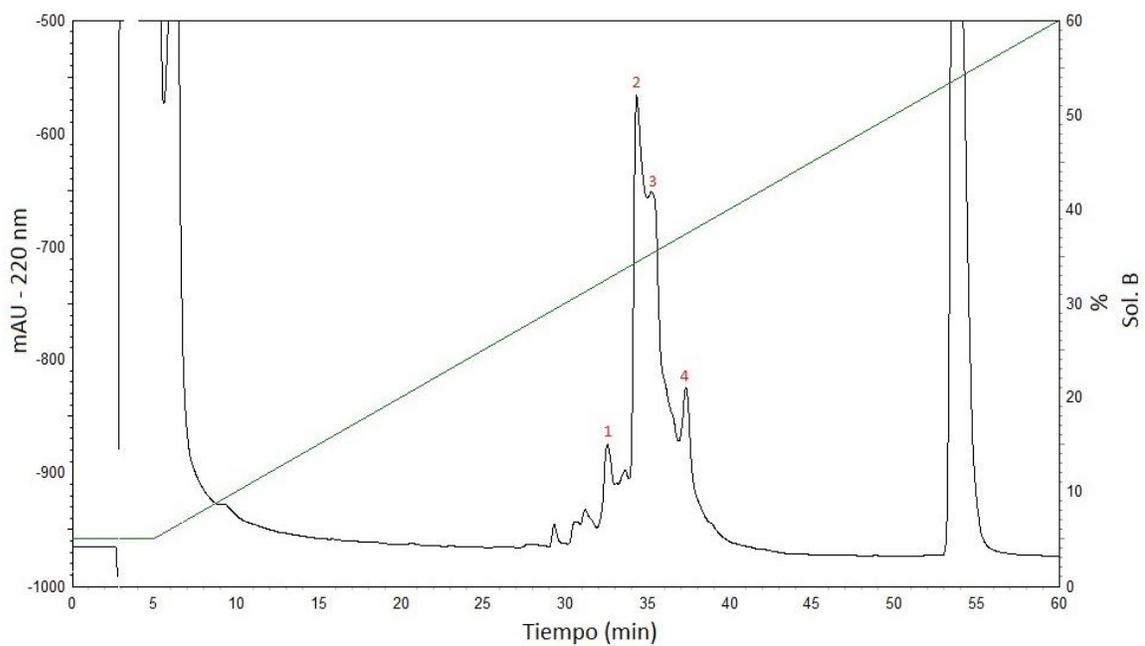


Figura 14. Perfil cromatográfico de la α -conotoxina A4. Monitoreo realizado a una longitud de onda de 220nm. La línea verde indica el gradiente que va de 10 a 60% de solución B en 60 minutos con un flujo de 1 mL/min. Los números indican los productos colectados.

Se calculó la cantidad en nanomoles (nmoles) de los productos obtenidos tras la separación de los mismos tomando como referencia el área bajo la curva de 5 nmoles de una conotoxina conocida (α -conotoxina RgIA) la cual es de 16,829,353 unidades. En la Tabla 5, se indica el área bajo la curva para cada producto de cada péptido y su equivalencia en nanomoles.

A1		
Producto 1	5,627,092	1.01 nmoles
Producto 2	6,527,651	1.17 nmoles
Producto 3	1,820,916	0.32 nmoles
Producto 4	16,978,552	3.06 nmoles
A2		
Producto 1	19,338,773	4.46 nmoles
Producto 2	99,502,435	22.97 nmoles
Producto 3	8,583,383	1.98 nmoles
Producto 4	37,092,088	8.56 nmoles
Producto 5	8,788,295	2.02 nmoles
A3		
Producto 2	19,081,178	3.81 nmoles
Producto 6	30,752,135	6.15 nmoles
A4		
Producto 1	9,641,851	2.72 nmoles
Producto 2	45,069,211	12.73 nmoles
Producto 3	47,821,658	13.51 nmoles
Producto 4	22,361,071	6.32 nmoles

Tabla 5. Rendimiento en unidades de los productos obtenidas de cada α -conotoxina (A1, A2, A3 y A4) teniendo como referencia 5 nmoles de la α -conotoxina RgIA (16,829,353).

Evaluación electrofisiológica

Uno de los objetivos de la presente investigación es determinar si las α -conotoxinas sintéticas de la subclase 4/7 están correctamente plegadas, para ello, un acercamiento es evaluar la actividad antagónica sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina de cada una de las isoformas. El subtipo de RnACh $\alpha 7$ es el blanco molecular de mayor afinidad para esta subclase de α -conotoxinas, sin embargo, se utilizaron el subtipo neuronal $\alpha 3\beta 2$ y el subtipo muscular adulto $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ como blancos alternos para evaluar la selectividad de acción sobre los RnACh.

En la Tabla 6 se presenta la actividad que se obtuvo de las diferentes conformaciones para cada una de las α -conotoxinas sintéticas plegadas sobre los distintos subtipos de RnACh. El cálculo de la inhibición se realizó comparando la amplitud de corriente del primer pulso de ACh tras la aplicación y reposo de 5 minutos en ND96 1X con respecto a la amplitud promedio de 3 corrientes control generadas por pulsos de acetilcolina antes de evaluar los productos obtenidos por RP-HPLC.

	Subtipos		
	$\alpha 7$	$\alpha 3\beta 2$	$(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$
A1	% de inhibición		
Producto 1 [10 μ M]	0	0	0
Producto 2 [10 μ M]	0	0	0
Producto 3 [10 μ M]	0	0	0
Producto 4 [10 μ M]	0	0	0
A2	% de inhibición		
Producto 1 [10 μ M]	0	0	0

Producto 2 [10 μM]	0	0	0
Producto 3 [10 μM]	0	0	35
Producto 4 [10 μM]	0	0	0
Producto 5 [10 μM]	0	0	0
A3	% de inhibición		
Producto 2 [10 μM]	37	0	0
Producto 6 [10 μM]	0	0	0
A4	% de inhibición		
Producto 1 [10 μM]	0	0	0
Producto 2 [10 μM]	0	98	0
Producto 3 [10 μM]	0	98	0
Producto 4 [10 μM]	0	80	0

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de los productos obtenidos del plegamiento de las α -conotoxinas sintéticas sobre RnACh probados en 3 ovocitos diferentes.

De los ensayos electrofisiológicos se observó una actividad inhibitoria de 35% por el producto 3 de la α -conotoxina A2 con una concentración final de 10 μM sobre el subtipo muscular adulto $(\alpha_1)_2\beta_1\delta\epsilon$ (Figura 15).

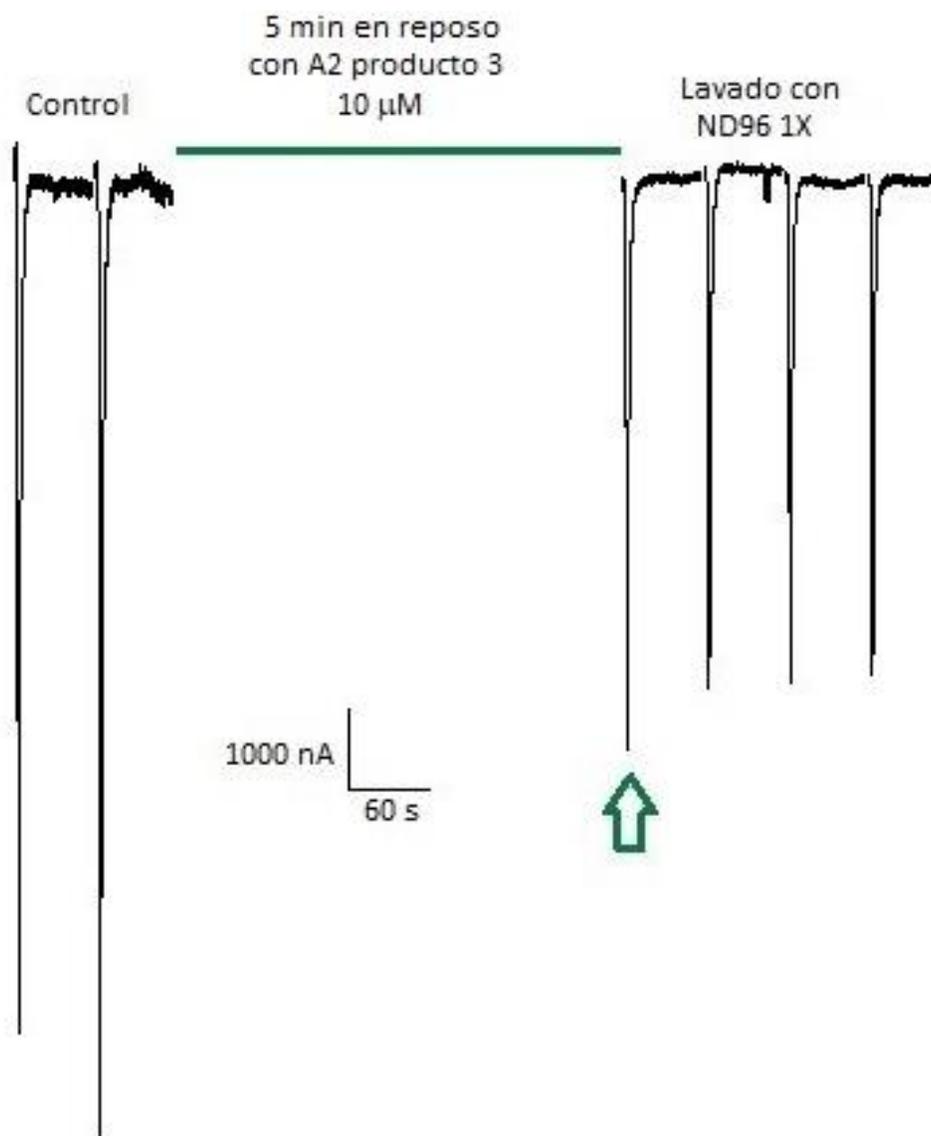


Figura 15. Corrientes de $(\alpha_1)_2\beta_1\delta\epsilon$ en ovocitos de *X. laevis* donde se observa el pulso de acetilcolina seguido de la incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A2 producto 3 [10 μM]

Para el caso del subtipo neuronal $\alpha 7$ se observó una actividad inhibitoria reversible de 37% del producto 2 de la α -conotoxina A3 con concentración final de 10 μM como se observa en la Figura 16.

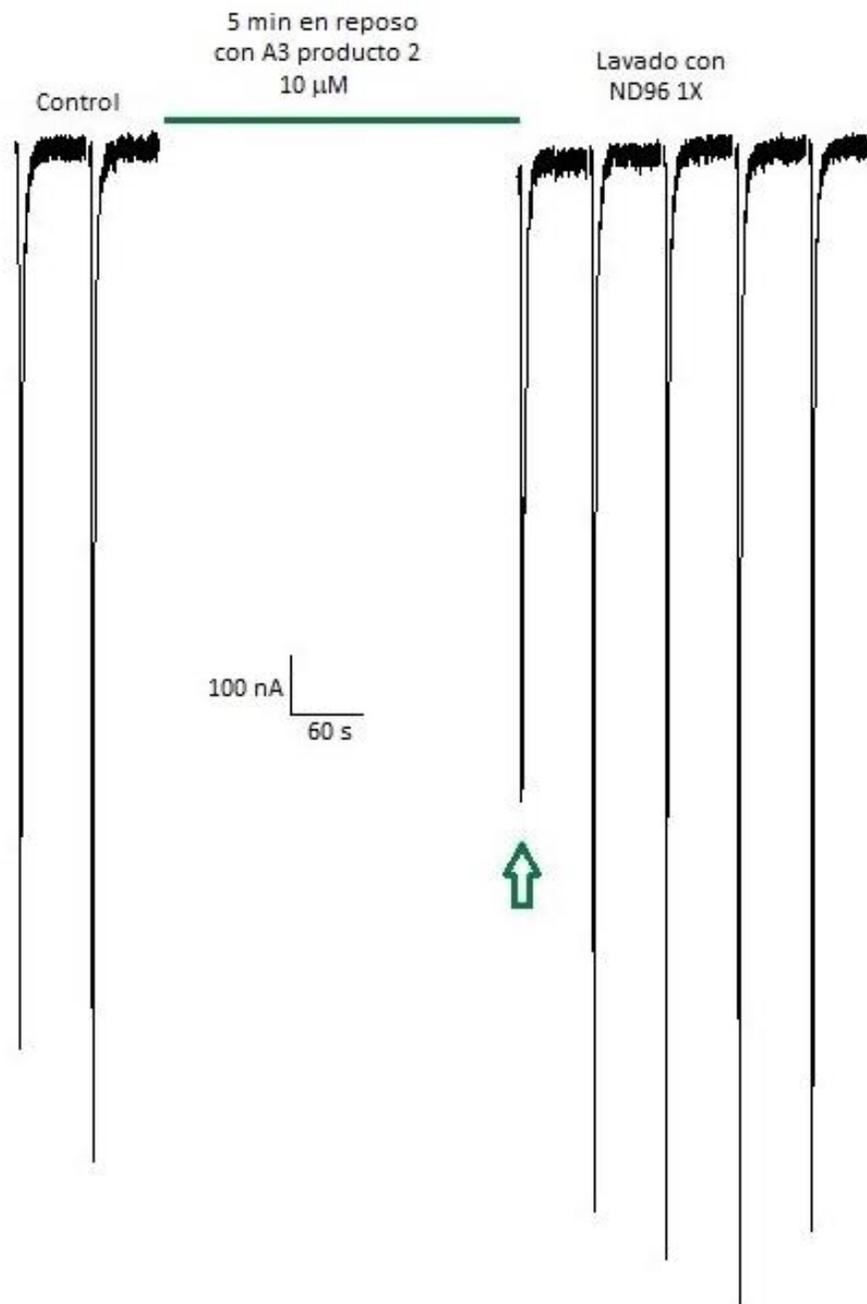


Figura 16. Corrientes de $\alpha 7$ en ovocitos de *X. laevis* donde se observa el pulso de acetilcolina seguido de la incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A3 producto 2 [10 μM].

Finalmente, para el subtipo de RnACh neuronal $\alpha 3\beta 2$ se observó que 3 de los 4 productos colectados de la α -conotoxina denominada A4 presentan actividad inhibitoria reversible mayor a 80% en los tres casos a una concentración final de 10 μM (Figuras 17 a 19). Es de destacar que a comparación de los productos 2 y 3 el producto 4 presenta una menor inhibición, pero de igual forma se disocia del receptor de manera lenta.

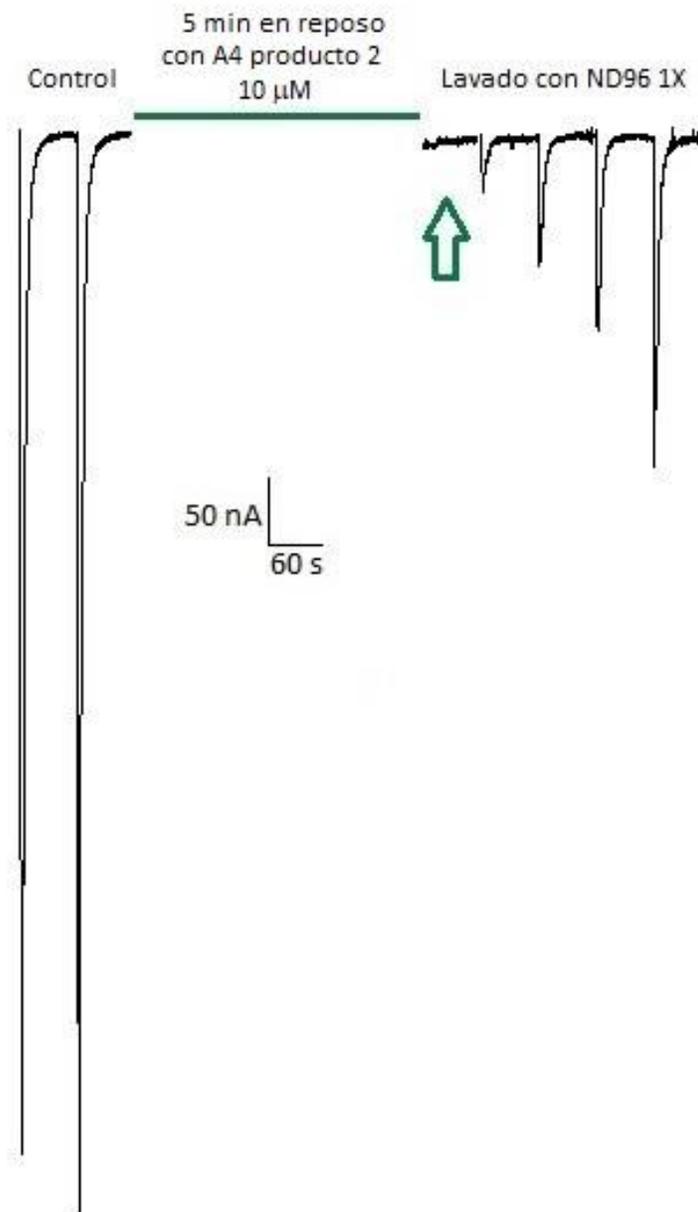


Figura 17. Corrientes de $\alpha 3\beta 2$ en ovocitos de *X. laevis*, las flechas indican el primer pulso de acetilcolina tras incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A4 producto 2 [10 μM].

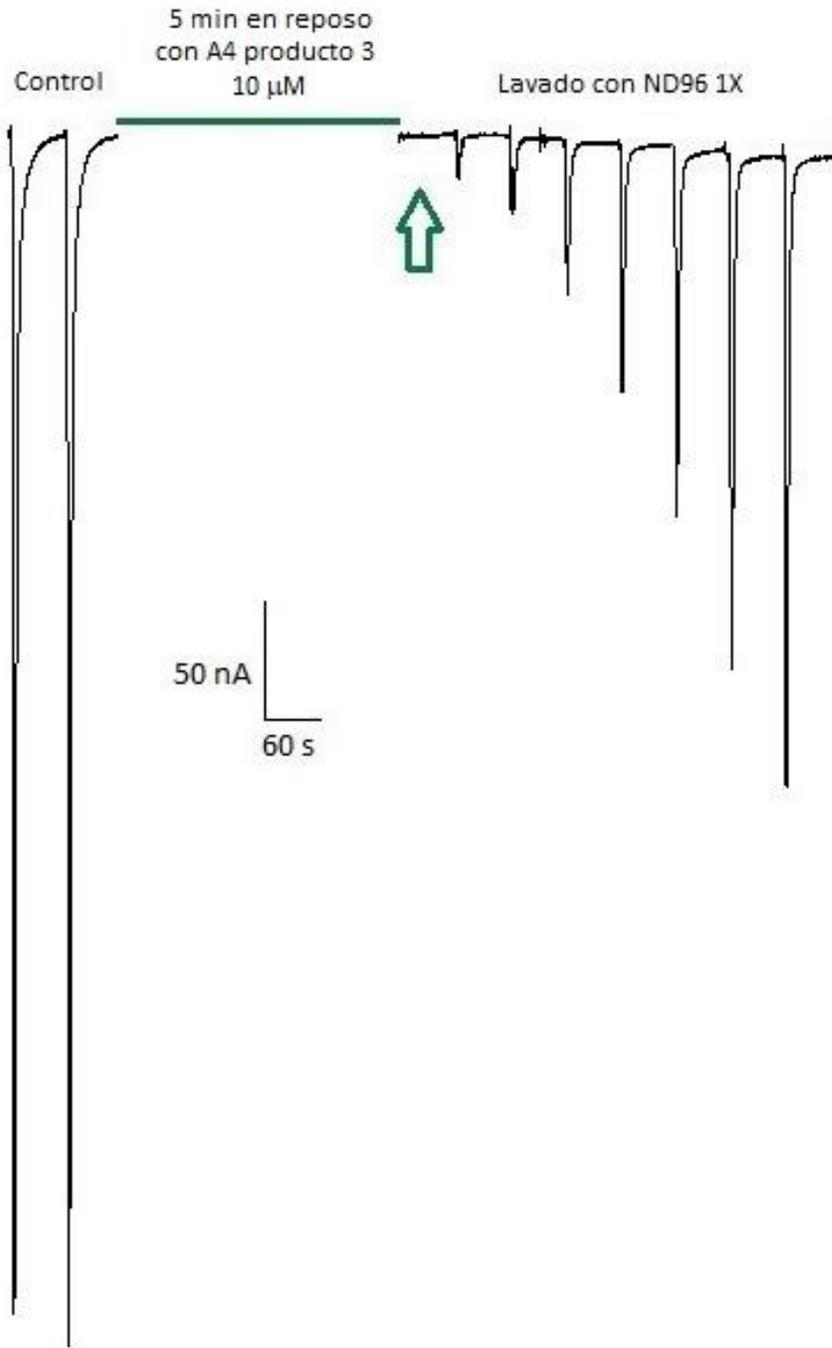


Figura 18. Corrientes de $\alpha 3 \beta 2$ en ovocitos de *X. laevis*, las flechas indican el primer pulso de acetilcolina tras incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A4 producto 3 [10 μM].

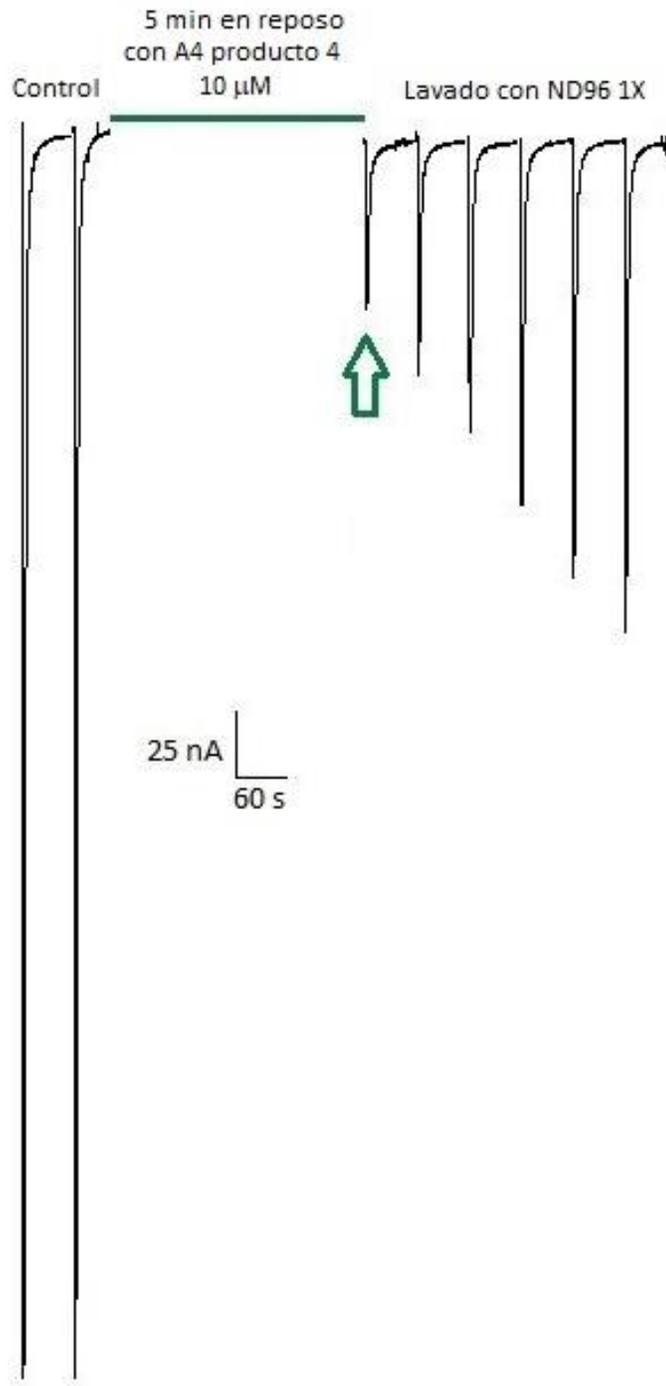


Figura 19. Corrientes de $\alpha 3\beta 2$ en ovocitos de *X. laevis*, las flechas indican el primer pulso de acetilcolina tras incubación por 5 minutos de la α -conotoxina A4 producto 4 [10 μ M].

Debido a que el porcentaje de actividad inhibitoria más alto lo presentaron los productos de la α -conotoxina A4 sobre el RnACh $\alpha 3\beta 2$, se procedió a realizar la curva dosis respuesta para cada uno de ellos.

Curva dosis-respuesta

Como se observa en las Figuras 17 a 19 los tres productos de la conotoxina A4 presentan actividad inhibitoria de más de 80%, por lo cual se procedió a obtener la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de cada uno. Estas se obtuvieron probando cinco concentraciones diferentes de cada producto por triplicado.

En la Figura 20 se observa la curva dosis respuesta para cada uno de los productos, donde se obtuvo que las concentraciones medias inhibitorias son: producto 2 = 432.9 nM y producto 3 = 295.9 nM. Con respecto al producto 4 se puede observar que tiene una interacción de baja afinidad con el receptor debido al comportamiento de la curva la cual no se ajusta a una sigmoide por este motivo no se puede obtener un valor de IC_{50} .

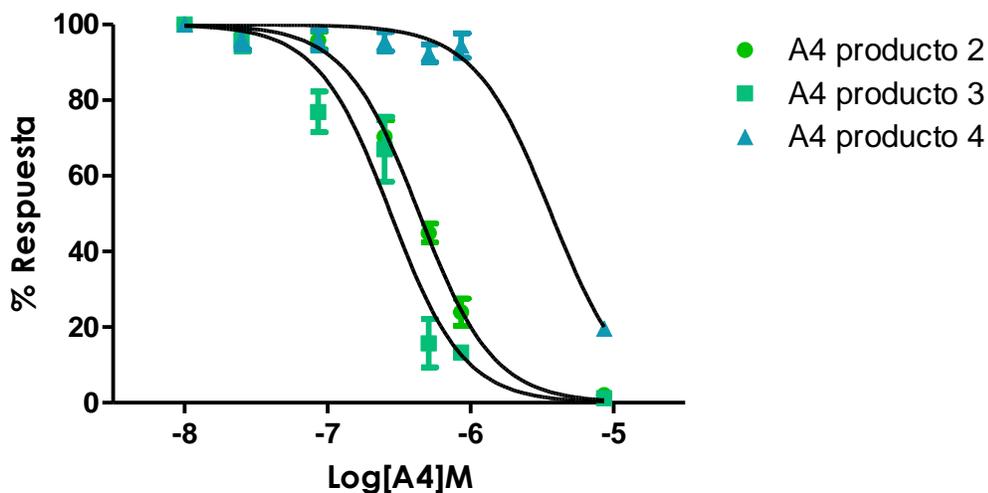


Figura 20. Curva dosis-respuesta para los tres productos con actividad sobre RnACh neuronal $\alpha 3\beta 2$ de la conotoxina A4.

Discusión

Los caracoles del género *Conus* han desarrollado estrategias para la captura de su presa y defensa contra depredadores, teniendo como resultado la producción de veneno, de los cuales se han derivado y obtenido toxinas de importancia para el estudio y potencial uso farmacológico. Estos compuestos son sintetizados en el epitelio del ducto del aparato venenoso como proteínas precursoras y tras realizarse estudios transcriptómicos se sintetizaron 4 secuencias peptídicas lineales diferentes (estructura primaria) de α -conotoxinas similares a la subclase α -4/7 los cuales fueron usados para el presente trabajo.

Es bien sabido que las conotoxinas presentan enlaces disulfuro que se originan a partir de la oxidación del grupo tiol en las cadenas laterales de las cisteínas, lo que le confiere el plegamiento a la conotoxina y por ende su actividad y especificidad sobre su blanco molecular; por ello, uno de los objetivos propuestos fue el identificar las mejores condiciones para promover el plegamiento de la molécula lineal de los péptidos trabajados. Para poder alcanzar este objetivo se realizaron dos condiciones diferentes de óxido-reducción que permitieron potencializar el plegamiento de las α -conotoxinas, en ambos casos se mantuvieron las condiciones de 0.1 M Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA pH 7.5 y el ácido fórmico a una concentración final de 8% para detener (quench) la reacción; se utilizó primeramente 0.5 mM GSH/5 mM GSSG y posteriormente 1 mM GSH/1 mM GSSG deteniendo la reacción a los 5, 10, 30 y 60 minutos de forma individual para observar cuál de estas condiciones presentaba mayor acumulación del producto plegado (basándonos en la metodología de Lopez-Vera *et al.*, 2008) por lo que se determinó que las mejores condiciones para obtener moléculas plegadas son con una concentración 1mM/1mM de glutatión reducido y oxidado durante 60 minutos. Debido a la que las secuencias primarias presentan solo 4 residuos de cisteínas no había necesidad de dejar que la reacción se llevara a cabo por más de 60 minutos.

Como se observa en la Figura 9 A el péptido lineal A1 se localiza en una región moderadamente hidrofóbica y con forme se desarrolla la reacción de plegamiento se observa la distribución de los productos hacia regiones moderadamente hidrofílicas; es muy notorio

que en la reacción con concentración 0.5 mM GSH/5 mM GSSG (Figura 9 B) la distribución de las moléculas peptídicas se mantiene similar a lo largo del tiempo o con muy pocos cambios con respecto a su rendimiento y solamente el péptido lineal (marcado con asterisco *) disminuye su proporción indicando que tomó otra conformación espacial ya sea en alguna de las isoformas o formando enlaces intermoleculares. Para el caso de la reacción con concentración 1 mM GSH/1 mM GSSG (Figura 9 C) se observa un cambio significativo en la proporción y rendimiento de los péptidos resultantes entre los 10 y 30 minutos lo cual es indicativo que la velocidad y eficiencia de reacción que es mayor con respecto a la anterior concentración de GSH:GSSG. Según en el trabajo de Price-Carter *et al.*, (1996) en la ausencia o disminución de la concentración de GSH las formas nativas, en el caso de este proyecto las isoformas, se pliegan a una velocidad muy lenta ya que este proceso está limitado por la baja disponibilidad de glutatión reducido que se genera por las reacciones de enlaces disulfuro; es por ello y tras observar el comportamiento de las reacciones en las pruebas piloto que se eligió mantener un ambiente en equilibrio con la proporción 1 mM GSH/1 mM GSSG.

Después de realizarse estas reacciones en los diferentes péptidos (A1, A2, A3 y A4) se procedió a purificar los productos obtenidos por RP-HPLC, técnica analítica que permite separar moléculas dependiendo de sus características químicas como su hidrofobicidad. Como se puede observar en las Figuras 11 a 14, que corresponden a los perfiles cromatográficos de las secuencias plegadas tras la reacción redox, presentan más de tres productos mayoritarios que corresponderían, de forma ideal, a las tres isoformas de las α -conotoxinas de la subclase 4/7 (globular, listón y cuentas); esto puede deberse a que no todas las moléculas pudieron plegarse en alguna de las conformaciones antes mencionadas, si no que pudieron no completar el plegamiento, es decir, solo formar un puente disulfuro o inclusive se mantuvieron de forma lineal, incluso pudieran ser proteínas con enlaces disulfuro intermoleculares que estén formando péptidos diméricos.

Colectadas los productos mayoritarios señalados en los cromatogramas correspondientes se procedió a probar dichas toxinas sobre diferentes subtipos de receptores

nicotínicos de acetilcolina ya que, como se ha estudiado ampliamente, esta subclase de α -conotoxinas 4/7 tienen como blanco molecular este tipo de receptores, principalmente el subtipo $\alpha 7$. Se probó sobre otro subtipo neuronal ($\alpha 3\beta 2$) y el subtipo muscular adulto ($(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$) como controles.

Se usó como sistema de expresión heteróloga los ovocitos de *Xenopus laevis* debido a que presentan un bajo nivel de expresión de canales endógenos, muestran una baja especificidad de especie con respecto al material genético exógeno (DNA o RNA) que se traduce a proteínas membranales y son células de un diámetro aproximado de 1.2 a 1.3 mm lo que permite su fácil inyección y manipulación para el uso de técnicas electrofisiológicas (Kapur *et al.*, 2007).

Para los ensayos electrofisiológicos se utilizó la técnica de fijación de voltaje por dos electrodos (Two-Electrode Voltage Clamp) que nos permite controlar, de forma *in vitro*, el potencial de membrana celular (V_m) de los ovocitos, y así estudiar las propiedades de las proteínas de membrana como lo son los receptores nicotínicos de acetilcolina. Para ello se usan dos electrodos: uno como sensor del potencial de membrana; y el otro para inyección de corriente lo que permite ajustar el potencial de membrana a los valores deseados (Guan *et al.*, 2013).

Después de ejecutar los ensayos electrofisiológicos de los productos obtenidos de las 4 α -conotoxinas sobre los tres subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina, se observó que hubo actividad de la conotoxina A2 producto 3 sobre el receptor $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ y de la conotoxina A3 producto 2 sobre el receptor neuronal $\alpha 7$ con un porcentaje de inhibición promedio de 35 y 37%, respectivamente. Sin embargo, debido a que la concentración a la cual presentaron actividad fue muy alta (10 μ M) se decidió no continuar experimentando con estas conotoxinas, ya que se sabe que la IC_{50} de las α -conotoxinas es del orden de nano a micromolar, por lo que esta actividad a altas concentraciones se puede deber a la saturación del receptor por las moléculas peptídicas y no precisamente por su afinidad al receptor.

También se observó actividad inhibitoria de los productos 2, 3 y 4 de la conotoxina A4 sobre el subtipo neuronal $\alpha 3\beta 2$ (Figura 14).

Tras realizar los ensayos electrofisiológicos y observar que los péptidos obtenidos después de oxidación de las secuencias lineales de las α -conotoxinas A1, A2 y A3 no presentaron actividad significativa sobre los receptores neuronales ($\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 2$) y muscular adulto ($(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$) se prosiguió a comparar su estructura primaria con otras α -conotoxinas 4/7 que muestran actividad sobre los receptores neuronales probados. Akondi *et al.* (2014) mencionan que las subclases α - 4/3, 4/4, 4/6 y 4/7 presentan los residuos serina y prolina conservados dentro de la primera asa (X_m), como se observa en la Tabla 7. Las α -conotoxinas MII (de *Conus magus*; con $IC_{50} = 4.4$ nM sobre el receptor $\alpha 3\beta 2$ de *Homo sapiens*), GID (de *C. geographus*; con $IC_{50} = 3.1$ nM sobre $\alpha 3\beta 2$ de *Rattus norvegicus*), PeIA (de *C. pergrandis*; con $IC_{50} = 19.2$ nM sobre $\alpha 3\beta 2$ de *R. norvegicus*) y ArIA (de *C. arenatus*; con $IC_{50} = 18$ nM y 6.02 nM sobre $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$, respectivamente, de *R. norvegicus*) cuentan con ambos residuos de aminoácido al igual que el péptido A4. Se tiene pensado que la prolina en la posición 3 de la asa X_m le confiere rigidez y estabilidad a la estructura de la α -hélice que se forma al plegarse la estructura primaria y permite que la conotoxina se una a su receptor; se han realizado ensayos donde se sustituye la prolina por una alanina y se ha observado una disminución e incluso supresión total de la actividad de la α -conotoxina sobre el receptor (Ning *et al.*, 2019).

Conotoxina	Secuencia																						
						X_m					X_n												
A1	G	L	W	V	E	C	C	A	D	P	P	C	R	Q	N	N	M	E	H	C	P	A	N
A2						C	C	E	D	P	P	C	Q	Q	N	N	M	Q	H	C	P	A	N
A3			D	K	G	C	C	S	N	R	V	C	S	M	D	H	P	E	L	C	R	G	K
A4					G	C	C	S	N	P	P	C	I	A	N	H	P	E	I	C			
MII					G	C	C	S	N	P	V	C	H	L	E	H	S	N	L	C			
GID		I	R	D	γ	C	C	S	N	P	A	C	R	V	N	N	O	H	V	C			
PeIA					G	C	C	S	H	P	A	C	S	V	N	H	P	E	L	C			
ArIA		I	R	D	E	C	C	S	N	P	A	C	R	V	N	N	P	H	V	C	R	R	R

Tabla 7. Comparación de secuencias de α -conotoxinas sintéticas (A1, A2, A3 y A4) con respecto a α -conotoxinas 4/7 con actividad sobre los RnACh neuronales $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$; donde en rojo se señalan los residuos de Cisteína que le confieren la clasificación de su subclase; en verde y amarillo se señalan los residuos conservados de Serina y Prolina, respectivamente, entre las diferentes conotoxinas; y en azul se señalan los residuos con característica no polar.

Otra característica destacable en la comparación de secuencias se encuentra en la segunda asa (X_n) puesto que, según Peng *et al.*, (2010) todas las α -conotoxinas de la subclase 4/7 presentan un residuo de aminoácido no polar en la segunda posición de esta asa, el cual puede estar involucrado en la unión con receptores neuronales. Este tipo de aminoácidos se encuentran ausentes en los péptidos A1 y A2.

Como se puede observar el único péptido de los analizados en el presente trabajo que cumple con estas dos características descritas que le permiten tener unión a un RnACh neuronal es el péptido A4 porque dentro de la asa X_m se encuentran los dos residuos conservados; en cambio, los péptidos A1, A2 y A3 muestran solo uno de estos (Prolina en el caso de los dos primeros y Serina en el último); asimismo, A4 presenta un residuo de Alanina, que es un aminoácido no polar alifático, en la posición 2 de la asa X_n el cual comparte similitud

química con MII (Leucina), y GID, PeIA y ArIA (Valina); y no obstante el péptido A3 también presenta un residuo con características químicas similares pero, como se ha dicho anteriormente, no cumple con la presencia de la Serina y Prolina conservados en la primera asa; por consiguiente esta es una de las explicaciones por la cual los péptidos A1, A2 y A3 no presentan actividad sobre los receptores ensayados.

A partir de la secuencia de aminoácidos se puede hacer una aproximación sobre el blanco molecular que pueden tener las conotoxinas gracias a su arreglo de cisteínas y a los residuos de aminoácidos que se encuentran entre estos. No obstante, la estructura tridimensional que se da por medio de la formación de enlaces disulfuro que presentan estas moléculas peptídicas es crítico para mantener su actividad biológica (Price-Carter *et al.*, 1996); como se había mencionado anteriormente en el caso de estas α -conotoxinas se pueden presentar tres isoformas que permiten tener una mayor o menor afinidad por el receptor al cual se unen. Para poder identificar la isoforma ya sea globular (Cys I – Cys III), listón (Cys I – Cys IV) o en cuentas (Cys I – Cys II) de manera experimental se puede usar la técnica de Dicroísmo Circular (CD; Circular Dichroism) que arroja información sobre la estructura secundaria de los péptidos en solución (Halai & Craik, 2009). En forma general, el dicroísmo circular se basa en la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha por compuestos ópticamente activos o quirales (Mata-Martínez, 2013); las señales obtenidas en la región lejana del espectro UV (240-180 nm) corresponden al enlace peptídico y pueden dar estimaciones confiables sobre proporciones de estructuras secundarias que contiene la proteína (como α -hélices, láminas- β y giros- β) (Kelly & Price, 2000).

Posteriormente a observar la actividad de los productos 2, 3 y 4 del péptido A4 y obtener las IC_{50} se puede identificar que la mayor afinidad hacia el RnACh neuronal $\alpha 3\beta 2$ la presenta el producto 3 seguido del producto 2 y finalmente el producto 4 presenta actividad; sin embargo, es aproximadamente 1 orden de magnitud menos afín al receptor. La afinidad

se puede explicar por la isoforma que pueden presentar las α -conotoxinas 4/7 y su interacción con el sitio de unión a la acetilcolina del receptor. En la literatura se asume que la conformación nativa de las α -conotoxinas es globular, pero existen reportes de estas moléculas peptídicas con isoforma de listón; cabe destacar que la configuración espacial de listón es nativa para la familia de las χ -conotoxinas. Finalmente no se ha encontrado en la naturaleza la isoforma de cuentas para ninguna conotoxina (Daly & Craik, 2009; Jin *et al.*, 2007; Lebbe *et al.*, 2014). Pese a que la mayoría de los estudios han observado que la isoforma globular para las α -conotoxinas es la que tiene mayor afinidad e inhibición con respecto a los RnACh se han sintetizado moléculas con las otras dos isoformas y se han probado sobre otros sistemas de expresión por ejemplo la molécula en listón de la α -conotoxina 4/6 AulB de *Conus aulicus* es más potente en el RnACh $\alpha 3\beta 4$ de las neuronas de los ganglios parasimpáticos que su conformación globular; en cambio al probarse en ovocitos de *Xenopus laevis* se reportó que esta última isoforma fue más potente (Muttenthaler *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2014) sintetizaron las tres configuraciones tridimensionales de la α -conotoxina TxIA de *C. textile*, la cual pertenece a la subclase 4/7 y observaron que los isómeros globular y listón al separarlos por RP-HPLC presentaron tiempos de retención similares (más hidrofílicos) y que inhiben al receptor $\alpha 3\beta 2$ de rata expresado en ovocitos con una IC_{50} de 5.4 nM y 430 nM respectivamente; la isoforma de cuentas presentó un tiempo de retención mayor (más hidrofóbico) y no tuvo una actividad inhibitoria significativa. Esta información nos es útil para tener una noción parcial de las isoformas de aquellos péptidos que presentaron actividad en el presente trabajo; es probable que los productos 2 y 3 del péptido A4 tengan la estructura tridimensional de listón y globular, respectivamente, debido a que la primera tiene una afinidad menor que la segunda y, como se ha mencionado, la configuración nativa o globular es la que regularmente tiene una mayor afinidad; además, tras la purificación, ambas moléculas se encontraban en un tiempo de retención más hidrofílico en comparación con el producto 4 que se encontró ligeramente posterior y como se puede observar en la Figura 20 el comportamiento no sigmoideo que presenta indica que es menos potente para el receptor, pues a 10 μ M la inhibición es evidente, sin embargo, al llevar la toxina a una concentración de

1 μM prácticamente no hay actividad inhibitoria por lo cual la configuración tridimensional de este producto pueda ser de cuentas.

Por ello, y basándonos en el trabajo de Gyanda et al. (2013), se recomienda sintetizar con sus respectivos enlaces disulfuro las tres α -conotoxinas y a partir de éstas obtener un espectro de dicroísmo circular con la finalidad de identificar con certeza cuál es la estructura tridimensional de aquellos péptidos con actividad inhibitoria sobre el RnACh $\alpha 3\beta 2$.

Conclusiones

- Se observó que la mejor condición para el plegamiento de las 4 α -conotoxinas sintéticas de la subclase 4/7 es aquella que presenta 1 mM GSH/1 mM GSSG por la velocidad de reacción y proporción de péptidos en sus distintas isoformas.
- De las conotoxinas obtenidas tras la reacción de plegamiento y purificación se encontró que 3 productos pertenecientes al péptido A4 presentaron actividad inhibitoria reversible sobre el RnACh neuronal $\alpha 3\beta 2$.
- Se determinaron las IC_{50} de los productos con actividad: A4 producto 2 = 432.9 nM y A4 producto 3 = 295.9 nM, lo que indica su afinidad ya que el orden de actividad de las α -conotoxinas se encuentra en el orden de nanomolar siendo más afín al receptor el producto 3. Este comportamiento se puede explicar considerando la isoforma que poseen las moléculas peptídicas.
- La conotoxina A4 producto 4 presenta baja afinidad con respecto al receptor $\alpha 3\beta 2$.

Perspectivas

- Lograr obtener una mejor separación de los productos 2 y 3 para realizar un espectro de dicroísmo circular e identificar la isoforma en la cual se encuentran plegadas.
- Con la finalidad de encontrar mejores afinidades de las tres isoformas de A4 probar estos péptidos sobre otros subtipos de RnACh.

Bibliografía

- Abraham, N., & Lewis, R. J. (2018). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulators from cone snails. *Marine Drugs*, *16*(6), 12–15.
- Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J., & Alewood, P. F. (2014). Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chemical Reviews*, *114*(11), 5815–5847.
- Armishaw, C. J. (2010). Synthetic α -Conotoxin mutants as probes for studying nicotinic acetylcholine receptors and in the development of novel drug leads. *Toxins*, *2*(6), 1471–1499.
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, *508*, 97–103.
- Azam, L., Dowell, C., Watkins, M., Stitzel, J. A., Olivera, B. M., & McIntosh, J. M. (2005). α -Conotoxin Bu1A, a novel peptide from *Conus bullatus*, distinguishes among neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 80–87.
- Azam, L., & McIntosh, J. M. (2009). Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*.
- Bias, D., Violette, A., Hulo, N., Lisacek, F., Favreau, P., & Stöcklin, R. (2015). Uncovering intense protein diversification in a cone snail venom gland using an integrative venomomics approach. *Journal of Proteome Research*, *14*(2), 628–638.
- Buczek, O., Bulaj, G., & Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(24),

3067–3079.

Bulaj, G. (2005). Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology Advances*, 23(1), 87–92.

Calvete, J. J. (2017). Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochemical Journal*, 474(5), 611–634.

Castañeda Pasarón, O. (2000). Toxinas Animales: Acciones Facilitadoras de la Transmisión colinérgica. *Revista de Biología*, 14(1), 1–15. Retrieved from

Daly, N. L., & Craik, D. J. (2009). Structural studies of conotoxins. *IUBMB Life*, 61(2), 144–150.

Dani, J. A. (2016). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *International Review of Neurobiology*, 124, 1–16.

Desjardine, K. L., Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. a, Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2007). *Bioactive Marine Natural Products. Natural product reports* (Vol. 31).

Dutertre, S., Griffin, J., & Lewis, R. J. (2016). Phyla Molluska: The Venom Apparatus of Cone Snails. In *Marine and Freshwater Toxins* (Vol. 89, pp. 248–269). Springer, Dordrecht.

Dutertre, Sébastien, Jin, A., Kaas, Q., Jones, A., Alewood, P. F., & Lewis, R. J. (2013). Deep Venomics Reveals the Mechanism for Expanded Peptide Diversity in Cone Snail Venom. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(2), 312–329.

Dutertre, Sébastien, & Lewis, R. J. (2012). Cone snail biology, bioprospecting and conservation. In *Snails: Biology, Ecology and Conservation* (pp. 85–104).

- Dutton, J. L., & Craik, D. J. (2001). Alpha-Conotoxins: nicotinic acetylcholine receptor antagonists as pharmacological tools and potential drug leads. *Current Medicinal Chemistry*, 8(4), 327–344.
- Ellgaard, L., Sevier, C. S., & Bulleid, N. J. (2018). How Are Proteins Reduced in the Endoplasmic Reticulum? *Trends in Biochemical Sciences*, 43(1), 32–43.
- Espiritu, M. J., Cabaltega, C. C., Sugai, C. K., & Bingham, J. P. (2013). Incorporation of post-translational modified amino acids as an approach to increase both chemical and biological diversity of conotoxins and conopeptides. *Amino Acids*, 46(1), 125–151.
- Fisher, S. K., & Wonnacott, S. (2012). Acetylcholine. *Basic Neurochemistry*, 258–282.
- Fu, Y., Li, C., Dong, S., Wu, Y., Zhangsun, D., & Luo, S. (2018). Discovery Methodology of Novel Conotoxins from Conus Species. *Marine Drugs*, 16(11), 417.
- Gao, B., Peng, C., Yang, J., Yi, Y., Zhang, J., & Shi, Q. (2017). Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery. *Toxins*, 9(12), 1–17.
- Gilbert, H. F. (2013). *Disulfide Bond Formation. Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (2nd ed., Vol. 1). Elsevier Inc.
- Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(9), 482–491.
- Grishin, A. A., Wang, C. I. A., Muttenthaler, M., Alewood, P. F., Lewis, R. J., & Adams, D. J. (2010). α -conotoxin AulB isomers exhibit distinct inhibitory mechanisms and differential sensitivity to stoichiometry of $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22254–22263.

- Guan, B., Chen, X., & Zhang, H. (2013). Two-Electrode Voltage Clamp. In *Ion Channels: Methods and Protocols* (Vol. 998, pp. 79–89).
- Gyanda, R., Banerjee, J., Chang, Y. P., Phillips, A. M., Toll, L., & Armishaw, C. J. (2013). Oxidative folding and preparation of α -conotoxins for use in high-throughput structure-activity relationship studies. *Journal of Peptide Science*, *19*(1), 16–24.
- Halai, R., & Craik, D. J. (2009). Conotoxins: natural product drug leads. *Natural Product Reports*, *26*(4), 526.
- Hodgson, E. (2012). *Toxins and venoms. Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 112). Elsevier Inc.
- Hurst, R., Rollema, H., & Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*, *137*(1), 22–54.
- Imperial, J. S., Bansal, P. S., Alewood, P. F., Daly, N. L., Craik, D. J., Sporning, A., ... Olivera, B. O. (2006). A Novel Conotoxin Inhibitor of Kv1 . 6 Channel and nAChR Subtypes Defines a New Superfamily of Conotoxins. *Biochemistry*, 8331–8340.
- Jakubowski, J. A., Kelley, W. P., & Sweedler, J. V. (2006). Screening for post-translational modifications in conotoxins using liquid chromatography/mass spectrometry: an important component of conotoxin discovery. *Toxicon*, *47*(6), 688–699.
- Janes, R. W. (2005). α -Conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses. *Current Opinion in Pharmacology*, *5*(3 SPEC. ISS.), 280–292.
- Jin, A. H., Brandstaetter, H., Nevin, S. T., Tan, C., Clark, R. J., Adams, D. J., ... Daly, N. L. (2007). Structure of α -conotoxin Bula: Influences of disulfide connectivity on structural

dynamics. *BMC Structural Biology*, 7, 1–13.

Kapono, C. A., Thapa, P., Cabalteja, C. C., Guendisch, D., Collier, A. C., & Bingham, J. P. (2013). Conotoxin truncation as a post-translational modification to increase the pharmacological diversity within the milked venom of *Conus magus*. *Toxicon*, 70, 170–178.

Kapur, A., Derry, J. M. C., & Hansen, R. S. (2007). Expression and Study of Ligand-Gated Ion Channels in *Xenopus laevis* Oocytes. In A. Lajtha, G. Baker, S. Dunn, & A. Holt (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (3rd ed.). Springer, Boston, MA.

Karlin, A. (2010). *Nicotinic acetylcholine receptors*. *Handbook of Cell Signaling*, 2/e (Second Edi, Vol. 1). Elsevier Inc.

Kelly, S., & Price, N. (2000). The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science*, 1(4), 349–384.

Kumar, P. S., Kumar, D. S., & Umamaheswari, S. (2015). A perspective on toxicology of *Conus* venom peptides. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(5), 337–351.

Lebbe, E. K. M., Ghequire, M. G. K., Peigneur, S., Mille, B. G., Devi, P., Ravichandran, S., ... Tytgat, J. (2016). Novel conopeptides of largely unexplored indo pacific *Conus* sp. *Marine Drugs*, 14(11), 1–18.

Lebbe, E. K. M., Peigneur, S., Maiti, M., Mille, B. G., Devi, P., Ravichandran, S., ... Tytgat, J. (2014). Discovery of a new subclass of α -conotoxins in the venom of *Conus australis*. *Toxicon*, 91, 145–154.

- Lebbe, E. K. M., Peigneur, S., Wijesekara, I., & Tytgat, J. (2014). *Conotoxins Targeting nicotinic acetylcholine receptors: An overview. Marine Drugs* (Vol. 12).
- Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I., & Christie, M. J. (2012). Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacological Reviews*, *64*(2), 259–298.
- Li, L., Liu, N., Ding, R., Wang, S., Liu, Z., Li, H., ... Dai, Q. (2015). A novel 4/6-type alpha-conotoxin VIIA selectively inhibits nAChR $\alpha 3\beta 2$ subtype. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *47*(12), 1023–1028.
- Liu, L., Chew, G., Hawrot, E., Chi, C., & Wang, C. (2007). Two potent $\alpha 3/5$ conotoxins from piscivorous Conus achatinus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *39*(6), 438–444.
- Lluisma, A. O., López-Vera, E., Bulaj, G., Watkins, M., & Olivera, B. M. (2007). Characterization of a novel ψ -conotoxin from Conus parius Reeve. *Toxicon*, *51*(2), 174–180.
- López-Vera, E. (2010). Los Receptores Nicotínicos De Acetilcolina Y Las α -Conotoxinas*. *Reb*, *29*(1), 8–12.
- López-Vera, E., Jacobsen, R. B., Ellison, M., Olivera, B. M., & Teichert, R. W. (2007). A novel alpha conotoxin (α -PIB) isolated from *C. purpurascens* is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*, *49*(8), 1193–1199.
- Lopez-Vera, E., Walewska, A., Skalicky, J. J., Olivera, B. M., & Bulaj, G. (2008). Role of hydroxyprolines in the in vitro oxidative folding and biological activity of conotoxins. *Biochemistry*, *47*(6), 1741–1751.
- Loughnan, M. L., & Alewood, P. F. (2004). Physico-chemical characterization and synthesis of neuronally active α -conotoxins. *European Journal of Biochemistry*, *271*(12), 2294–2304.

- Loughnan, M. L., Nicke, A., Lawrence, N., & Lewis, R. J. (2009). Novel α D-Conopeptides and Their Precursors Identified by cDNA Cloning Define the D-Conotoxin Superfamily. *Biochemistry*, *48*, 3717–3729.
- Loughnan, M., Nicke, A., Jones, A., Schroeder, C. I., Nevin, S. T., Adams, D. J., ... Lewis, R. J. (2006). Identification of a Novel Class of Nicotinic Receptor Antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(34), 24745–24755.
- Luo, S., Christensen, S., Zhangsun, D., Wu, Y., Hu, Y., Zhu, X., ... McIntosh, J. M. (2013). A Novel Inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptors from *Conus vexillum* Delineates a New Conotoxin Superfamily. *PLoS ONE*, *8*(1).
- Mata-Martínez, E. (2013). Dicroísmo Circular. In *Métodos Físico Químicos en Biotecnología* (pp. 1–78). Instituto de Biotecnología UNAM.
- McIntosh, J. M., Santos, A. D., & Olivera, B. M. (1999). *Conus* Peptides Targeted to Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes. *Annual Review of Biochemistry*, *68*(1), 59–88.
- Mir, R., Karim, S., Kamal, M. A., Wilson, C. M., & Mirza, Z. (2016). Conotoxins: Structure, therapeutic potential and pharmacological applications. *Current Pharmaceutical Design*, *22*(5), 582–589.
- Motulsky, H. (2007). GraphPad Prism Version 5.0 Regression Guide. *Prism 5 Statistics Guide*. San Diego, CA: GraphPad Software Inc.
- Muttenthaler, M., Akondi, K. B., & Alewood, P. F. (2011). Structure-Activity Studies on Alpha-Conotoxins, 4226–4241.
- Nicke, A., Wonnacott, S., & Lewis, R. J. (2004). α -Conotoxins as tools for the elucidation of

structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *European Journal of Biochemistry*, 271(12), 2305–2319.

Ning, J., Ren, J., Xiong, Y., Wu, Y., Zhangsun, M., Zhangsun, D., ... Luo, S. (2019). Identification of Crucial Residues in α -Conotoxin EI Inhibiting Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Toxins*, 11(10), 1–14.

Norton, R. S., & Olivera, B. M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon*, 48(7), 780–798.

Olivera, B. M. (2002). Conus Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 25–47.

Olivera, B. M., Imperial, J. S., & Concepcion, G. P. (2013). *Snail Peptides. Handbook of Biologically Active Peptides* (Second Edi). Elsevier Inc.

Olivera, B. M., Showers Corneli, P., Watkins, M., & Fedosov, A. (2014). Biodiversity of Cone Snails and Other Venomous Marine Gastropods: Evolutionary Success Through Neuropharmacology. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2(1), 487–513.

Peng, C., Chen, W., Sanders, T., Chew, G., Liu, J., Hawrot, E., & Chi, C. (2010). Chemical synthesis and characterization of two α 4/7-conotoxins. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(10), 745–753.

Pohanka, M. (2012). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2219–2238.

Prashanth, J. R., Lewis, R. J., & Dutertre, S. (2012). Towards an integrated venomomics approach for accelerated conopeptide discovery. *Toxicon*, 60(4), 470–477.

- Price-Carter, M., Gray, W. R., & Goldenberg, D. P. (1996). Folding of ω -conotoxins. 1. Efficient disulfide-coupled folding of mature sequences in vitro. *Biochemistry*, *35*(48), 15537–15546.
- Puillandre, N., & Holford, M. (2010). The Terebridae and teretoxins: Combining phylogeny and anatomy for concerted discovery of bioactive compounds. *BMC Chemical Biology*, *10*.
- Rajabi, H., Zolgharnen, H., Ronagh, M. T., & Ranjbar, M. S. (2016). Histological study of the venom production organ in *Conus coronatus* and *Conus frigidus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, *4*(1), 370–372.
- Rajpal, G., & Arvan, P. (2013). Disulfide Bond Formation. In *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)* (Second Edi, pp. 1721–1729). Elsevier Inc.
- Robinson, S. D., & Norton, R. S. (2014). Conotoxin gene superfamilies. *Marine Drugs*, *12*(12), 6058–6101.
- Safavi-Hemami, H., Young, N. D., Williamson, N. A., & Purcell, A. W. (2010). Proteomic interrogation of venom delivery in marine cone snails: Novel insights into the role of the venom bulb. *Journal of Proteome Research*, *9*(11), 5610–5619.
- Taylor, P. (2012). Nicotinic Receptors. *Primer on the Autonomic Nervous System*, 79–82.
- Teichert, R. W., Jimenez, E. C., & Olivera, B. M. (2005). α S-Conotoxin RVIII A: A Structurally Unique Conotoxin That Broadly Targets nAChR. *Biochemistry*, *44*(21), 7897–7902.
- Terlau, H., & Olivera, B. M. (2004). *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, *84*(1), 41–68.

- Uribe, J. E., Puillandre, N., & Zardoya, R. (2017). Beyond Conus: Phylogenetic relationships of Conidae based on complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *107*, 142–151.
- Watkins, M., Hillyard, D. R., & Olivera, B. M. (2006). Genes expressed in a turrid venom duct: Divergence and similarity to conotoxins. *Journal of Molecular Evolution*, *62*(3), 247–256.
- Wu, Y., Wu, X., Yu, J., Zhu, X., Zhangsun, D., & Luo, S. (2014). Influence of disulfide connectivity on structure and bioactivity of α -conotoxin txia. *Molecules*, *19*(1), 966–979.