



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ELECTROFISIOLÓGICA DE UN PÉPTIDO  
AISLADO DEL CARACOL MARINO *Conus spurius* SOBRE CANALES DE SODIO  
ACTIVADOS POR VOLTAJE.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. ANGÉLICA EDITH RUELAS CALLEJAS**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. ESTUARDO LÓPEZ VERA**

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

COMITÉ TUTOR:

**Dra. ROCIO SALCEDA SACANELLES**- Instituto de Fisiología Celular

**Dr. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG**- Facultad de Medicina

CIUDAD DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxinología Marina, del  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, en Ciudad Universitaria.

Como estudiante del Programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas recibí  
el apoyo económico del CONACyT bajo el número de becario 76622.

## **Agradecimientos**

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A mi tutor principal: Dr. Estuardo López Vera por abrirme las puertas del laboratorio de toxicología marina en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología; la orientación y apoyo para poder concluir satisfactoriamente el proyecto de doctorado.

A mi comité tutor: Dra. Rocío Salceda Sacanelles y Dr. Ángel Zaráin Herzberg; por las sugerencias, apoyo, seguimiento y revisión de todo el proyecto, así como de la tesis de doctorado.

Al Doctor Juan Carlos Gomora por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar una parte de los experimentos de este trabajo.

Al Doctor Rogelio Arteaga Tlecuítl por su apoyo durante los registros electrofisiológicos.

A los miembros del jurado de examen: Dr. Rogelio Arellano Ostoá, Dr. José Federico del Río Portilla, Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández, Dra. Judith Sánchez Rodríguez por los valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A mis padres: Hita y Leo.

A la Doctora Rosa Rebollar Vega por todos estos años de amistad que comenzaron en la FES Iztacala, por su apoyo invaluable durante el largo camino que ha sido para mí el doctorado.

A mis amigos de la facultad de ciencias por estos veinte años de amistad que sigue enriqueciéndose día con día: Tula, Tona, Paco, Arturo, Iván, Ismael, Christopher.

A Luis Antonio por todo.

A Sofía por ser mi motorcito de vida.

*Somos como mariposas que  
vuelan durante un día pensando  
que lo harán para siempre.*

*Carl Sagan*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
Género <i>Conus</i> .....	12
Aparato de Veneno.....	14
Generalidades del veneno de <i>Conus</i> (conotoxinas).....	15
Clasificación de las Conotoxinas .....	17
Efecto de las conotoxinas sobre sus blancos moleculares.....	22
Conotoxinas que modulan receptores acoplados a proteínas G .....	22
Canales iónicos activados por ligando (receptores-canal) .....	23
Canales iónicos activados por voltaje .....	26
Especie de interés: <i>Conus spurius</i> .....	29
Canales de sodio activados por voltaje .....	31
Superfamilia T de las conotoxinas .....	37
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>40</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>41</b>
Objetivos específicos .....	41
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
Obtención de ductos venenosos:.....	42
Extracción del veneno crudo de <i>C. spurius</i> :.....	42
Separación de los componentes del veneno .....	42

Determinación de la secuencia parcial "de novo" .....	43
Síntesis de la conotoxina sr5a .....	43
Cuantificación de la conotoxina sr5a.....	44
Predicción del blanco molecular .....	44
Expresión de canales de sodio en células HEK-293.....	44
Registros electrofisiológicos utilizando la configuración de célula completa (patch clamp) .....	45
Evaluación electrofisiológica de la conotoxina sr5a .....	46
Análisis de datos.....	47
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
Fraccionamiento del veneno.....	48
Subfraccionamiento .....	50
Secuenciación parcial "de novo" .....	50
Síntesis y cuantificación de sr5a .....	52
Evaluación electrofisiológica.....	53
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>84</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Diversidad de especies del género <i>Conus</i> . .....	12
Figura 2.- Aparato venenoso del género <i>Conus</i> .....	14
Figura 3.- Ejemplo de pre-propéptidos de conotoxinas de la superfamilia farmacológica I. ....	16
Figura 4.- Clasificación de las conotoxinas. ....	18
Figura 5.- Ejemplares de <i>Conus spurius</i> .....	29
Figura 6.- Canal abierto de sodio. ....	32
Figura 7.- Perfil cromatográfico del extracto crudo del caracol marino <i>C. spurius</i> . 49	
Figura 8.- Perfil cromatográfico del sub fraccionamiento de F15.....	50
Figura 9.- Cromatografía de fase reversa (HPLC) de la conotoxina sintética sr5a... 52	
Figura 10.- Curva dosis respuesta para sr5a en hNav1.5. IC <sub>50</sub> = nM.....	53
Figura 11.- Inhibición de las corrientes de los canales de sodio activados por voltaje por la conotoxina sr5a. ....	54
Figura 12.- Incremento de las concentraciones de la conotoxina sr5a también bloquea la $I_{Na}$ con una mayor especificidad sobre el subtipo hNav1.5.....	56
Figura 13.- Relación de la corriente-voltaje (I-V) de la $I_{Na}$ generada por la activación de los canales hNav1.5 en presencia de sr5a. ....	57
Figura 14. A- Efecto de sr5a en la activación e inactivación de los canales hNav1.5. ....	58

**Figura 15.- Alineamiento de secuencias múltiples Clustal W..... 59**

**Figura 16.- Alineación de residuos Clustal W..... 60**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.- Arreglo de cisteínas de las conotoxinas.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 2.- Blancos moleculares de las conotoxinas .....</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 3.- Conopéptidos caracterizados de <i>Conus spurius</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 4. Búsqueda de identidad de secuencia .....</b>	<b>51</b>

**RESUMEN**

A lo largo de la vida evolutiva del planeta Tierra diferentes organismos han desarrollado adaptaciones para facilitar su alimentación y/o defensa, como lo es la producción de venenos. Entre los organismos marinos que han desarrollado estas adaptaciones podemos encontrar los caracoles del género *Conus*. Los moluscos pertenecientes a este género cuentan con un aparato que es capaz de sintetizar veneno, el cual, está compuesto por pequeñas toxinas de naturaleza proteica; que se caracterizan por presentar gran afinidad y alta especificidad por sus blancos farmacológicos.

Las conotoxinas son usualmente clasificadas dentro de superfamilias, dentro de estas, se encuentra la superfamilia T que se caracteriza porque sus blancos moleculares son canales de calcio, proteínas G acopladas a receptores (GPCR), receptores de acetilcolina nicotínicos (RnACh).

En este trabajo se evaluó mediante registros electrofisiológicos el efecto de la conotoxina sr5a (perteneciente a la superfamilia T) proveniente del caracol marino *Conus spurius* sobre los canales de sodio dependientes de voltaje  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7$ , expresados en células HEK-293, a tres diferentes concentraciones (200, 400 y 600 nM). Encontramos que sr5a inhibe selectivamente al canal  $Na_v1.5$  y modifica la dependencia de voltaje de la inactivación de estos canales en 10 mV. Al encontrar un bloqueo selectivo por la toxina sr5a en  $Na_v1.5$ , nos permitió renombrarla como la  $\mu$ -SrVA conotoxina, es decir, asignarle una familia farmacológica. Este resultado contribuye al conocimiento de los componentes del veneno de la especie *Conus spurius*.

**ABSTRACT**

Throughout the evolutionary life of planet Earth, different organisms have developed adaptations to facilitate their feeding and/or defense, such as the production of venoms. Among the marine organisms that have developed these adaptations we can find the snails of the genus *Conus*. The mollusks belonging to this genus have an apparatus that is capable of synthesizing venom, which is composed of small effects of a protein nature, named as conotoxins; that are characterized by having great affinity and high specificity for their pharmacological targets.

Conotoxins are normally classified within superfamilies. There is the T superfamily, which is characterized by its molecular targets: calcium channels, G protein-coupled receptors (GPCR), and nicotinic acetylcholine receptors (nAChR).

In this work we studied the effect of the conotoxin sr5a from the marine snail *Conus spurius* on the voltage-gate sodium channels  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7$  expressed on the HEK-293 cells and evaluated using electrophysiological recordings. We evaluated the toxin at three different concentrations (200, 400 and 600 nM). We found that sr5a selectively inhibits  $Na_v1.5$  and modifies the voltage dependence of channel inactivation by 10mV. Finding a selective blockade by the sr5a toxin in  $Na_v1.5$ , we could rename it as the  $\mu$ -SrVA conotoxin, that is, assign it a pharmacological family. This result contributes to the knowledge of the components of the venoms of the species *Conus spurius*.

## **INTRODUCCIÓN**

En los últimos 40 años se ha dado un incremento considerable en el estudio de los moluscos del género *Conus* ya que sus venenos están compuestos de toxinas que han permitido el desarrollo de nuevas drogas ya sea para uso terapéutico o como herramientas de estudio para receptores y/o canales (Espiritu *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2019). Los compuestos tóxicos de estos caracoles se conocen como conotoxinas (o conopéptidos), que están formadas de 10 a 30 aminoácidos (Olivera *et al.*, 1991). Las conotoxinas pueden clasificarse en superfamilias de acuerdo con la secuencia señal del precursor (hasta la fecha se reportan 30; "ConoServer," n.d.; Kaas *et al.*, 2010). Las conotoxinas también pueden clasificarse por los arreglos de cisteínas de las toxinas maduras (Olivera *et al.*, 1991). Las superfamilias incluyen diferentes familias farmacológicas las cuales se definen en función de su blanco molecular y su efecto sobre éste (Olivera y Cruz, 2001; Terlau y Olivera, 2004).

Cada especie de *Conus* posee en su veneno de 100 hasta 200 conotoxinas altamente selectivas por sus blancos farmacológicos (Olivera, 1997; Olivera y Cruz, 2001). De las conotoxinas que se han estudiado se ha visto que cada una posee una gran selectividad por su blanco molecular (Gao *et al.*, 2017; Lewis *et al.*, 2012a; Terlau y Olivera, 2004), de esta manera el estudio de las conotoxinas es importante para el desarrollo de nuevas drogas para uso en terapias farmacológicas, o como herramientas de estudio de canales iónicos y/o receptores.

La familia de las  $\alpha$ -conotoxinas ha sido la más estudiada hasta el momento, se caracteriza porque los miembros pertenecientes a ésta son antagonistas específicos de los receptores a la acetilcolina tipo nicotínico de acetilcolina (Celie *et al.*, 2005; Mcmanus y

Musick, 1985; Rogers *et al.*, 2000). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores con asa de cisteína que regulan la transmisión sináptica; además de incluir al receptor-canal a la acetilcolina, también se incluyen al de serotonina tipo 3, al del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) tipo A y al de glicina (Tsetlin *et al.*, 2011).

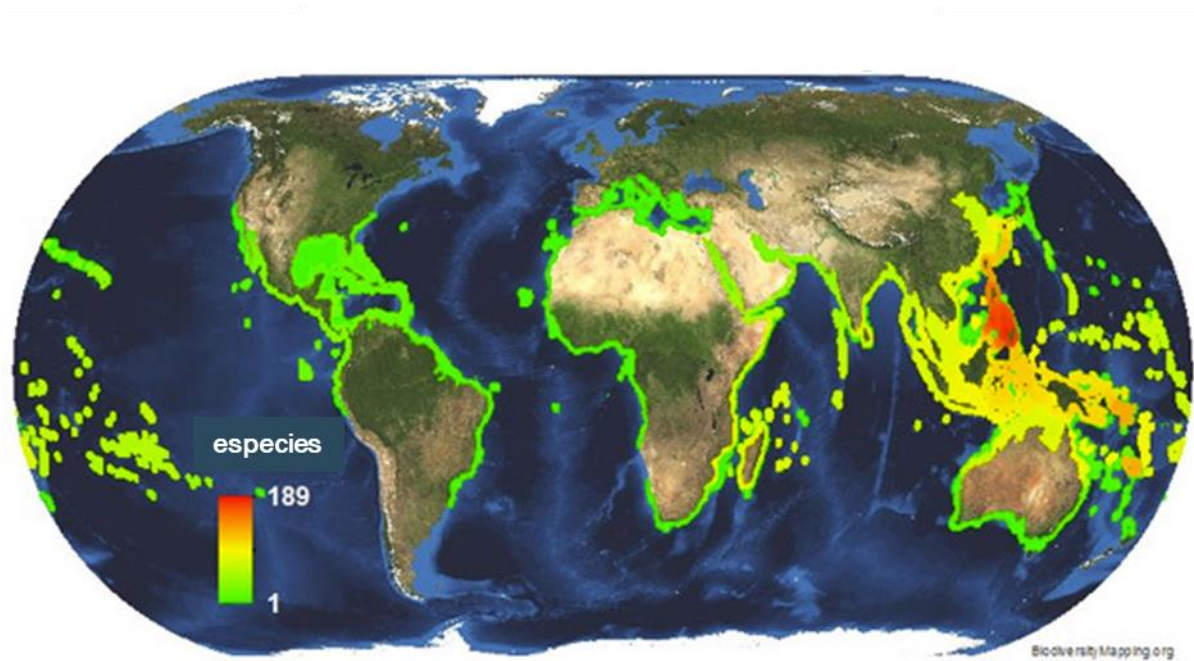
Por otra parte, las conotoxinas pertenecientes a las familias  $\mu$ -,  $\mu O$ -,  $\mu O\delta$ -,  $\delta$ - y  $\tau$ - se sabe que tienen sitios de unión específicos a los canales de sodio dependientes de voltaje (canales  $Na_v$ ) (Knapp *et al.*, 2012). Estos canales son proteínas transmembranales cuya actividad está regulada por el potencial de membrana de la célula, juegan un papel central en la señalización celular (de Lera Ruiz y Kraus, 2015). Al día de hoy se han identificado nueve subtipos de canales de sodio  $Na_v1.1$ -  $Na_v1.9$  (de Lera Ruiz y Kraus, 2015).

Las familias  $\mu$ -,  $\mu O$  de las conotoxinas inhiben las corrientes de sodio mediante la unión a un sitio externo del poro de los canales  $Na_v$  (Hui *et al.*, 2002; Leipold *et al.*, 2007). Recientemente se ha descubierto que miembros pertenecientes a la superfamilia T pudieran estar interactuando con los canales iónicos, siendo así que existan más conotoxinas que interactúen con los  $Na_v$  (Gilly *et al.*, 2011; L. Liu *et al.*, 2007).

## ANTECEDENTES

### ***Género Conus***

Los caracoles del género *Conus* son moluscos de la Clase Gastropoda, pertenecientes al Orden Neogastropoda, Familia Conidae (Brusca y Brusca, 2003), forman un vasto grupo de aproximadamente 700 especies (Gao *et al.*, 2017; Halai y Craik, 2009; Kumar *et al.*, 2015) que se distribuyen principalmente en ambientes tropicales y arrecifales como en las aguas del Océano Índico y Pacífico (Figura 1) (Olivera, 2002). También pueden encontrarse en el Atlántico, Golfo de México y el Mar Caribe (Darryl y Camp, 2009).



**Figura 1.- Diversidad de especies del género *Conus*.** En color verde se muestran aquellos lugares con menor diversidad y en rojo aquellos con la mayor diversidad. Mapa modificado de <https://biodiversitymapping.org/wordpress/index.php/cone-snails/>

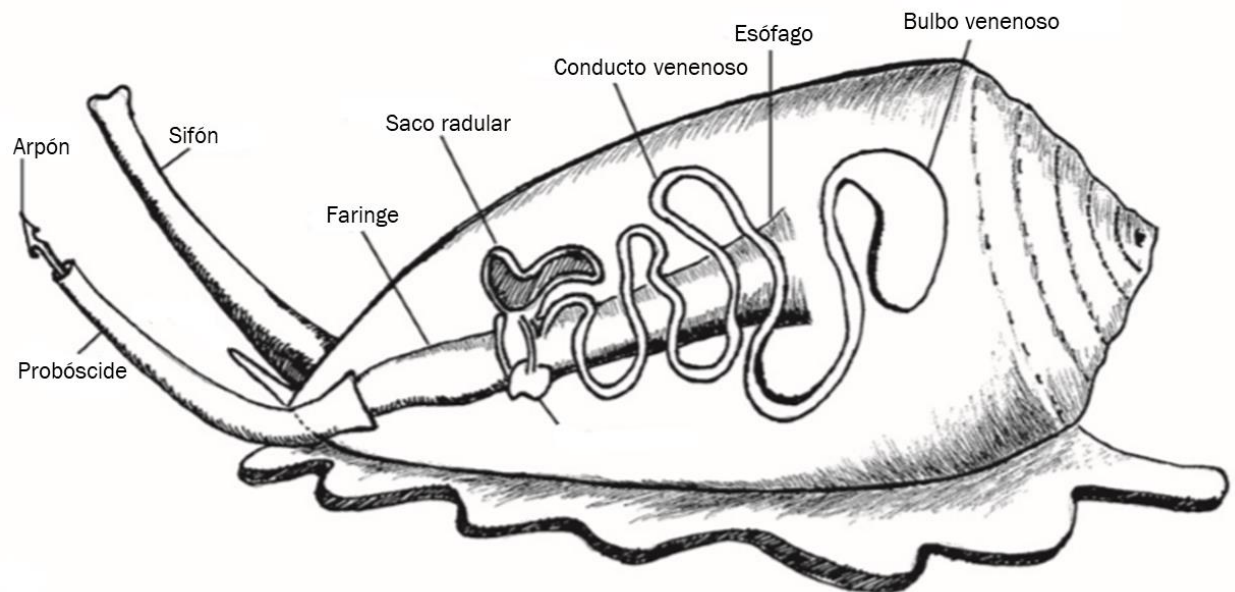


Las especies de este género son carnívoras y se clasifican de acuerdo con el tipo de alimentación que presentan: vermívoras (gusanos, mayormente poliquetos), molusquívoras (otros moluscos) y piscívoras (peces) (Olivera, 2002, 1997). En los litorales mexicanos se han descrito 50 especies del género *Conus* (Darryl y Camp, 2009).

El género *Conus* posee una estrategia evolutivamente avanzada de caza que emplean para la captura de su presa, para esto, han desarrollado un sistema de arpones dispuestos en su probóscide que utilizan para captura y a su vez les sirve como aguja para inyectar veneno en su presa (Terlau y Olivera, 2004).

## ***Aparato de Veneno***

El aparato venenoso que poseen los caracoles del género *Conus* está constituido por tres partes: un bulbo venenoso, un conducto venenoso y un saco radular (Figura 2). El veneno primero es sintetizado en las células secretoras del conducto venenoso y después cortado por proteasas generando conotoxinas activas que posteriormente serán impulsadas por el bulbo hasta el saco radular, en éste se almacenarán en los dientes en forma de arpón que son utilizados como aguja hipodérmica al ser lanzados hacia su presa (Olivera, 2002, 1997; Prashanth *et al.*, 2014; Terlau y Olivera, 2004; Vetter y J. Lewis, 2012). El veneno actúa principalmente como inmovilizador de la presa, aunque también puede ser utilizado como mecanismo de defensa y para alejar a otros competidores (Olivera, 2002).



**Figura 2.- Aparato venenoso del género *Conus*.** Se ejemplifican los componentes principales del aparato venenoso y algunas estructuras del caracol cónico (Imagen modificada de Halai y Craik, 2008)

### ***Generalidades del veneno de Conus (conotoxinas)***

Los caracoles del género *Conus* son relativamente jóvenes en términos evolutivos, en los registros geológicos se indican que aparecieron después que los dinosaurios (hace 50 millones de años) (López-Vera *et al.*, 2007; Olivera, 1997). Los caracoles *Conus* se caracterizan por moverse lentamente en un ambiente donde sus presas son más rápidas; la gran cantidad y diversidad de compuestos que presenta el veneno de los caracoles *Conus* demuestra una estrategia evolutiva eficaz para desarrollar venenos altamente selectivos y por lo tanto eficientes para la captura de sus presas (Olivera, 2002).

Los venenos de los caracoles poseen una alta especificidad, lo que permite un uso eficiente del mismo a la hora de capturar a su presa o como mecanismo de defensa. Otra estrategia que presentan los caracoles, específicamente en la alimentación, es la combinación de los compuestos que actúan de manera conjunta para paralizar a la presa (toxinas cabales); todas actúan con un mismo fin sobre diferentes blancos moleculares, ejerciendo un efecto final de inmovilizar a la presa de manera más eficiente (Craig *et al.*, 1999; Olivera, 2002).

Los componentes del veneno son codificados por un ARNm y sintetizados en las células secretoras del conducto venenoso como precursores pre-propéptidos (largos de 70 a 140 residuos de aminoácidos). Todos los precursores presentan en su estructura tres regiones características (Figura 3):

La región pre, que es una secuencia señal en el extremo amino terminal de 20 a 25 aminoácidos altamente conservada entre miembros de las mismas superfamilias. Dirige a la molécula hacia su camino para ser secretada.

La región pro, intermedia, de 30-60 aminoácidos. Presenta señales de reconocimiento para que las enzimas realicen modificaciones postraduccionales.

La región de la toxina madura, en el extremo carboxilo terminal, de 8 hasta 40 aminoácidos, que funciona como el componente biológicamente activo del veneno.

Para obtener la toxina madura el precursor es sometido presumiblemente a cortes que ocurren en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi (Kaas *et al.*, 2010); estos cortes se dan en la secuencia señal estándar encontrada justo antes de la secuencia del péptido maduro (Craig *et al.*, 1999; Kaas *et al.*, 2010; Olivera, 2002, 1997; Terlau y Olivera, 2004; Woodward *et al.*, 1990).

	Región pre	Región pro	Toxina madura
R11.4	MKLCLTFLLVIMILASVTG	EKSSKHTLSRAA	-RVKNRGP <u>S</u> FCKADEK <u>P</u> CKYHADCCNCC <u>L</u> GGIC <u>P</u> STSWIGCSTNVFLTR
R11.3	MKLCLTFLLVIMILASVTG	EKLSEQTLRRAA	-R-KNKGPRC <u>W</u> VGRVHCTYHKDC <u>P</u> S <u>V</u> CCFKGRCK <u>P</u> QSWGCSGPT
Ep11.1	MKLCLTFLLILVILPSVTG	EKSSKRTLGAALR	-GDWGC <u>S</u> GIG <u>Q</u> CGQDSNCCGDMCCY <u>Q</u> ICAMTFAACGP

**Figura 3.- Ejemplo de pre-propéptidos de conotoxinas de la superfamilia farmacológica I.** R11.4 y R11.3 pertenecen a *C. radiatus*, Ep11.1 pertenece a *C. episcopatus*. Con letras rojas se muestra la región PRE; con letras negras la región PRO, y finalmente con letras azules la toxina madura. Subrayado aparecen los residuos de cisteína de las toxinas maduras.

Cada organismo puede poseer de 100 hasta 200 toxinas maduras en sus venenos (Olivera, 1997; Robinson y Norton, 2014). Hasta la fecha se han obtenido aproximadamente 1800 secuencias de toxinas de las especies del género *Conus* y esta cifra sigue en aumento (Gao *et al.*, 2017; Zamora-Bustillos *et al.*, 2021). Podemos encontrar un catálogo de estas secuencias en el sitio conoserver.org (<https://www.conoserver.org/?page=classification>).

Las toxinas en los venenos se caracterizan por ser moléculas formadas de 10 hasta 40 residuos de aminoácidos. Suelen ser clasificadas como conotoxinas, aquellos péptidos ricos en puentes disulfuro, y como conopéptidos, aquellos con dos, uno o ningún puente disulfuro (Halai y Craik, 2009). Aunque, Puillandre y colaboradores en 2012 realizaron un estudio filogenético encontrando que tanto conopéptidos como conotoxinas están estrechamente relacionadas, por lo que esta clasificación sería redundante (Puillandre *et al.*, 2012).

### ***Clasificación de las Conotoxinas***

Las conotoxinas son clasificadas en superfamilias génicas basadas en la secuencia señal del precursor; hasta la fecha se han descrito 30 (A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N, O1, O2, O3, P, Q, R, S, T, U, V, Y, conodipina) (Jin *et al.*, 2019; Robinson y Norton, 2014) (Figura 4). Cada superfamilia a su vez puede contener varios arreglos de los puentes de cisteína (Tabla 1) (Akondi *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2017; Vetter y J. Lewis, 2012).



**Tabla 1.- Arreglo de cisteínas de las conotoxinas.** Se muestran los patrones y número de residuos de cisteína presentes en las conotoxinas, así como las superfamilias génicas a las cuales se asocian.

Arreglo de cisteínas	Patrón de cisteínas	Número de cisteínas	Conexión entre cisteínas	Superfamilia
I	CC-C-C	4	I-III, II-IV	A, M, O1, T
II	CCC-C-C-C	6		A, M
III	CC-C-C-CC	6		M
IV	CC-C-C-C-C	6	I-V, II-III, IV-VI	A, D, M
V	CC-CC	4	I-III, II-IV	T
VI/VII	C-C-CC-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI	A, H, I, M, O, Q, U, Y
VIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10		B2, S
IX	C-C-C-C-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI	P
X	CC-C[PO]C	4	I-IV, II-III	T
XI	C-C-CC-CC-C-C	8	I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII	I,
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8		I1, I2
XIII	C-C-C-CC-C-C-C	8		G, I2
XIV	C-C-C-C	4	I-III, II-IV	A, D, I2, J, L, M, O1, O2, R
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8		D, N, O2, V
XVI	C-C-CC	4		M, O, Q, T
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8		Y
XVIII	C-C-CC-CC	6		
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10		
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10		
XXI	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10		
XXII	C-C-C-C-C-C-C-C	8		E, I1, M
XXIII	C-C-C-CC-C	6		
XXIV	C-CC-C	4		B3, L
XXV	C-C-C-C-CC	6		
XXVI	C-C-C-C-CC-CC	8		

---

XXVII	C-C-C-CCC-C-C	8	
XXVIII	C-C-C-CC-C-C-C-C	10	D
XXIX	CCC-C-CC-C-C	8	O1
XXX	C-C-CCC-C-C-C-CC	10	
XXXII	C-CC-C-C-C	6	M
XXXIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	12	S



Las superfamilias se subdividen en familias farmacológicas dependiendo del blanco molecular sobre los que actúan, como son canales iónicos dependientes de voltaje, canales iónicos dependientes de ligando, receptores acoplados a proteínas G, transportadores de neurotransmisores, entre otros (Gao *et al.*, 2017; Terlau y Olivera, 2004).

La diversidad de conopéptidos encontrada en las especies del género *Conus* también es debida a la mutación del extremo carboxilo y de modificaciones postraduccionales (Craig *et al.*, 1999). Algunas de estas modificaciones pueden ser amidación del carboxilo terminal, formación de puentes disulfuro, bromación del triptófano, gamma carboxilación de residuos de glutamato, sulfatación de residuos de tirosina, glicosilación de residuo de serina y treonina (Craig *et al.*, 1999). Las modificaciones postraduccionales son llevadas a cabo en las células del conducto venenoso antes de que sea cortada la toxina madura (Buczek *et al.*, 2005).

Las modificaciones por lo general ayudan con la interacción específica de la conotoxina con su blanco molecular, además de participar en la estabilidad del plegamiento de algunas conotoxinas, sobre todo de aquellas que carecen de residuos de cisteínas (Aguilar *et al.*, 2009; López-Vera *et al.*, 2007).

De los efectos de las conotoxinas que se han descrito sobre su blanco molecular, el que más resalta es el de antagonista competitivo, o no competitivo; aunque también podemos encontrar que retrasan la inactivación de su blanco molecular (Olivera y Cruz, 2001).

### ***Efecto de las conotoxinas sobre sus blancos moleculares***

Hasta el momento solo se han caracterizado farmacológicamente aproximadamente el 0.1% de las conotoxinas descritas (Jin *et al.*, 2019; Lewis *et al.*, 2012a), muchas de ellas se han identificado como potenciales para su utilización clínica, puesto que pueden discriminar entre subtipos de una familia de canales iónicos dada (McIntosh *et al.*, 1999).

Se han descrito cuatro tipos de blancos moleculares:

- Transportadores de neurotransmisores: cuya familia farmacológica asociada a estos es  $\chi$ .
- Receptores acoplados a proteínas G; cuyas familias farmacológicas asociadas a estos son:  $\rho$ ,  $\chi$ , conopresina, contulakina.
- Canales iónicos activados por ligando; cuyas familias farmacológicas asociadas a estos son:  $\alpha$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha C$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha S$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha J$ ,  $\psi$ ,  $\sigma$ , kot-ikot, conantokina.
- Canales iónicos activados por voltaje; cuyas familias farmacológicas asociadas a estos son:  $\omega$ ,  $\mu$ ,  $\mu O$ ,  $\delta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\kappa A$ ,  $\kappa O$ ,  $\kappa M$ ,  $\kappa J$ ,  $\kappa I$ .

#### *Conotoxinas que modulan transportadores de neurotransmisores*

**$\alpha$ -conotoxina:** MrlA, MrlB, ambas conotoxinas son inhibidores no competitivos de los transportadores de norepinefrina (Sharpe *et al.*, 2001).

#### *Conotoxinas que modulan receptores acoplados a proteínas G*

Los receptores acoplados a proteínas G son una familia de proteínas de receptores transmembrana que responden a estímulos extracelulares (por ejemplo, hormonas,

neurotransmisores) que activan vías de transducción de señales para dar origen a respuestas celulares específicas. Se encuentran en sistemas como visión, olfato, gusto, participan en funciones neurológicas, cardiovasculares, endocrinas (Weis y Kobilka, 2018). Las conotoxinas moduladoras de receptores acoplados a proteínas G son:

**p-conotoxina:** TIA, de 19 aminoácidos, con dos puentes disulfuro, inhibe los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos (Sharpe *et al.*, 2003, 2001).

**Conopresina:** Conopresinas T y G, su función es muy similar al de la vasopresina y oxitocina, solo que cambia una carga en la posición 4 (Dutertre *et al.*, 2008).

**Contulakina G:** o CGX-1160 es un agonista de los receptores de la neurotensina NTSR1, NTSR2 (Craig *et al.*, 1999).

#### *Canales iónicos activados por ligando (receptores-canal)*

Los receptores canal activados por ligando, son canales que se abren en respuesta a la unión de un ligando. Cuando un ligando se une a la región extracelular del receptor la estructura de la proteína cambia de manera que los iones pueden pasar a través de un poro selectivo a determinados iones (por ejemplo,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Estos canales se separan en dos grupos de acuerdo a similitudes funcionales y estructurales (Terlau y Olivera, 2004; Tovar y Westbrook, 2012).

Los receptores-canal poseen un dominio extracelular (ECD) que contiene el sitio de unión de ligando, un dominio transmembranal (TMD) que permiten el paso de iones a través de la membrana conformado por 4 hélices transmembranales (M1-M4) y un

dominio intracelular (ICD) formado por un asa entre M3 y M4 que juega un papel en la modulación del receptor (Thompson *et al.*, 2010).

Dos genes ancestrales han dado origen a dos distintas familias de receptores. Una familia incluye a los receptores asa de cisteína que está conformada por los receptores de acetilcolina nicotínicos (nACh), 5-hydroxytryptamina (serotonina, 5-HT<sub>3</sub>), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA<sub>A</sub>) y los receptores de glicina (Barnard *et al.*, 1987; Betz, 1990; Grenningloh *et al.*, 1990; Miller y Smart, 2010).

La otra familia incluye a los receptores de glutamato, divididos en receptores NMDA (N-metil- D-aspartato), receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de kainato. Todos relacionados en los procesos de plasticidad sináptica (Lewis *et al.*, 2012a; Waxham, 2014).

#### *Conotoxinas que modulan canales iónicos activados por ligando*

**$\alpha$ -conotoxinas:** Son antagonistas específicos de varios subtipos de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR); proveen un recurso farmacológico importante, puesto que pueden discriminar entre isoformas del receptor, tanto musculares como neuronales.

A las  $\alpha$ -conotoxinas se les puede distribuir en subfamilias dependiendo del arreglo y número de residuos de aminoácidos presentes entre los dos pares de cisteínas que hay en ellas, por ejemplo, la conotoxina Iml **GCCSDPRCAWRC** pertenece al grupo 4/3 (McIntosh *et al.*, 1999, 1994).

- Grupo 3/5 (CCX<sub>3</sub>CX<sub>5</sub>C) se caracteriza por encontrarse principalmente en caracoles piscívoros y tener como blancos moleculares subtipos musculares del receptor nAChR.
- Grupo 4/7 (CCX<sub>4</sub>CX<sub>7</sub>C) se caracteriza por tener blancos moleculares del receptor nAChR del subtipo neuronal.
- Grupo 4/3, 4/4 (CCX<sub>4</sub>CX<sub>3</sub>C; CCX<sub>4</sub>CX<sub>3</sub>C) forman parte de un grupo homogéneo, se caracterizan por bloquear receptores nACh de subtipo neuronal.

**αA-conotoxinas:** antagonistas competitivos de los receptores nAChR subtipo muscular, con 3 puentes disulfuro y no dos como las α-conotoxinas (Hopkins *et al.*, 1995).

**ψ-conotoxinas:** antagonistas no competitivos de los receptores nAChR subtipo muscular (Mitchell *et al.*, 1998).

**σ-conotoxinas:** GVIIIA es el único inhibidor descrito para los receptores de serotonina (5-HT<sub>3</sub>). Actúa de manera competitiva, posee 10 residuos de cisteína y por lo tanto 5 puentes disulfuro; se caracteriza porque el C-terminal está amidado, también posee un residuo 6-bromotriptofano (England *et al.*, 1998).

**Kot-ikot:** conopéptido de 86 aminoácidos, 13 residuos de cisteína, actúa mediante la desensibilización de los receptores AMPA incrementando la magnitud de la corriente (Lewis *et al.*, 2012a; Walker *et al.*, 2009).

**Conantokinas:** conopéptido de 17 a 22 aminoácidos que inhiben selectivamente a los receptores de NMDA. Son moléculas terapéuticas potenciales como analgésicos y anticonvulsionantes (Jiménez *et al.*, 2002; Malmberg *et al.*, 2003). La ConG no contiene residuos de cisteína, pero si muchos residuos de ácido γ-carboxiglutámico (Malmberg *et al.*, 2003).

### *Canales iónicos activados por voltaje*

Los canales iónicos sensibles a voltaje son proteínas de membrana activadas por cambios en el voltaje de la membrana. Varias de estas proteínas exhiben selectividad por cationes, y se dividen en canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y Ca<sup>2+</sup> (Catterall, 1995).

Su función principal es la generación, formación y transducción de señales eléctricas en las células. El poro del canal está formado por la subunidad alfa, que contiene cuatro dominios homólogos (Canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>) o cuatro distintas subunidades (canales K<sup>+</sup>) (Catterall, 1995). Cuando los canales iónicos son activados sufren un cambio conformacional, que bajo condiciones fisiológicas resulta en la permeabilidad selectiva de cationes a través del poro. En este estado abierto, los canales pueden pasar a un estado inactivado por un cambio conformacional adicional, de esta manera entra a un estado no conductor; o pueden estar desactivados, regresando a un estado cerrado (Tombola *et al.*, 2006).

### *Conotoxinas que modulan canales de sodio dependientes de voltaje:*

**μ-conotoxinas:** inhiben las corrientes de sodio, son péptidos de 22-25 aminoácidos, con seis residuos de cisteínas con arreglo tipo III, pertenecen a la superfamilia M (Favreau *et al.*, 2012; Ott *et al.*, 1991; Terlau y Olivera, 2004).

**μO-conotoxinas:** péptidos hidrofóbicos pertenecientes a la superfamilia O, interfieren con los sensores de voltaje del dominio II del canal de sodio (Leipold *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2012a).

**$\delta$ -conotoxinas:** Inhiben la inactivación rápida del canal, provocando de esta manera una excitación de la célula (Shon *et al.*, 1994).

**$\iota$ -conotoxinas:** Son péptidos de 46 aminoácidos que incrementan la apertura del canal de sodio (Fiedler *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

*Conotoxinas que modulan canales de potasio dependientes de voltaje:*

**$\kappa$ -conotoxinas** miembros de esta familia farmacológica se encuentran en varias superfamilias, todas con efecto bloqueador de los canales de potasio dependientes de voltaje (Lewis *et al.*, 2012a; Terlau y Olivera, 2004), en la tabla 2 se muestran algunos ejemplos.

*Conotoxinas que modulan canales de calcio dependientes de voltaje:*

**$\omega$ -conotoxinas:** son inhibidores selectivos de las isoformas de los canales de calcio. Hasta ahora las omega conotoxinas se mantienen como las únicas conotoxinas aprobadas por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, por sus siglas en inglés) para tratamiento de dolor en humanos, como lo es la MVIIA conocida como prialt (antes ziconotide) (Hannon y Atchison, 2013).

**Tabla 2.- Blancos moleculares de las conotoxinas.** Se muestran las familias farmacológicas y su efecto sobre sus blancos moleculares.

Blanco molecular	Familia farmacológica	Acción sobre blanco	Ejemplo
<b>Canal Na<sub>v</sub></b>	μ	Inhibidor competitivo	PIIIA
	μO	Inhibidor no competitivo	MrVIA
	δ	Inhibidor de la activación	TxVIA
	ι	Inhibidor de la activación	RXIA
<b>Canal K<sub>v</sub></b>	κO	Todos bloquean	PVIA
	κA		SIVA
	κM		RIIIK
	κJ		Pi14a
	κI		
<b>Canales Ca<sub>v</sub></b>	ω	Inhibidor selectivo	MVIA
			CVID
			MVIIC
			GVIA
<b>RnACh</b>	α	Inhibidores competitivos	ImI
	αD	Inhibidores	VxXXA
	αJ	Inhibidores	PIXIVA
	αS	Inhibidores	RVIIIA
	αA	Inhibidores no competitivos	EIVA
	ψ	Inhibidores no competitivos	PIIIF
<b>5-HT<sub>3</sub></b>	σ	Inhibidor competitivo	GVIIIA
<b>AMPA</b>		Activador	Kot-Ikot
<b>NMDA</b>		Inhibidor	conantokina



**Especie de interés: *Conus spurius***

*Conus spurius* fue descrita primero por Abbott en 1954; es un caracol vermívoro que se distribuye principalmente en los arrecifes de coral o aguas poco profundas de la Florida, el Golfo de México y la península de Yucatán. Mide entre 5 a 7.5 centímetros de longitud, con concha característica en forma de cono de color blanco y manchas naranja o cafés. (Figura 5) ([https://animaldiversity.org/accounts/Conus\\_spurius/](https://animaldiversity.org/accounts/Conus_spurius/))



**Figura 5.- Ejemplares de *Conus spurius*.** (Imagen propia)

Se han caracterizado algunos péptidos a nivel de toxina madura provenientes de la especie *Conus spurius*, se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.- Conopéptidos caracterizados de *Conus spurius*.** Se muestra el nombre del péptido, la superfamilia a la que pertenece.

<b>Péptido</b>	<b>Superfamilia</b>	<b>Referencia</b>
<b>CNF-Sr1</b>	RFamida	(Maillo <i>et al.</i> , 2002)
<b>CNF-Sr2</b>	RFamida	(Aguilar <i>et al.</i> , 2008)
<b>CNF-Sr3</b>	RFamida	(Campos-Lira <i>et al.</i> , 2017)
<b><math>\alpha</math>-SrIA</b>	A	(López-Vera <i>et al.</i> , 2007)
<b><math>\alpha</math>-SrIB</b>		
<b>sr5a</b>	T	(Aguilar <i>et al.</i> , 2006)
<b>sr7a</b>	O1	(Luna-Ramírez <i>et al.</i> , 2007)
<b>SrXIA</b>	I2	(Aguilar <i>et al.</i> , 2007)

De los conopéptidos presentes en el veneno de *Conus spurius* se han caracterizado bioquímicamente solo 7 (Tabla 3), dos de ellos pertenecientes a la superfamilia A (López-Vera *et al.*, 2007) donde encontramos miembros de la familia de las  $\alpha$ -conotoxinas, todas ellas con blancos moleculares de los receptores de acetilcolina nicotínicos (RnACh). Las otras conotoxinas pertenecen a las superfamilias de las conorfamidas (Aguilar *et al.*, 2008; Campos-Lira *et al.*, 2017; Maillo *et al.*, 2002); O- (Luna-Ramírez *et al.*, 2007); I2- (Aguilar *et al.*, 2007); y la superfamilia T- (Aguilar *et al.*, 2006)

Por otra parte, se ha descrito que miembros pertenecientes a la superfamilia T pudieran estar interactuando con los canales iónicos, siendo así que puedan existir más conotoxinas en esta especie que interactúen con los canales  $Na_v$  (Gilly *et al.*, 2011; L. Liu *et al.*, 2007).

### ***Canales de sodio activados por voltaje***

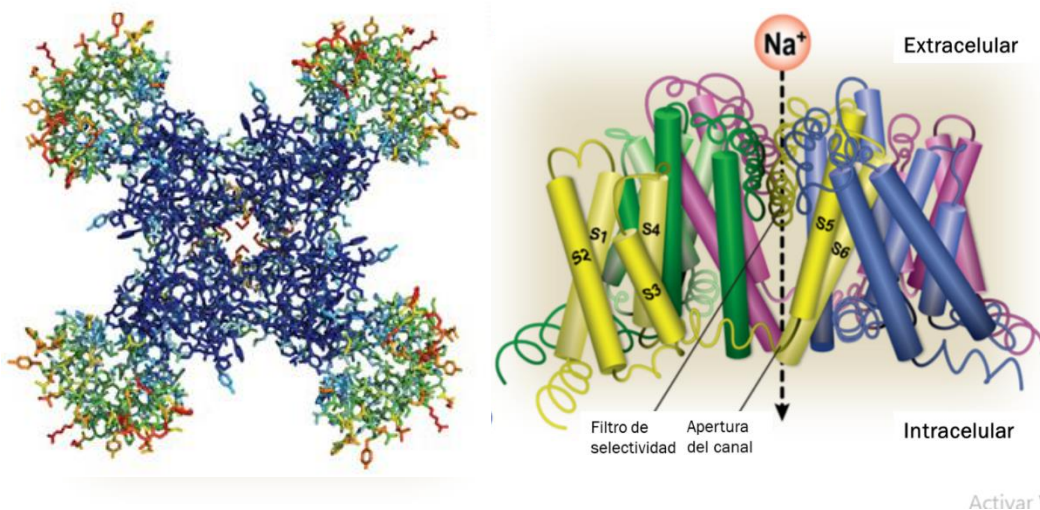
Las corrientes de sodio fueron descritas por Hodgkin y Huxley en 1952 estudiando la generación del potencial de acción en los axones gigantes de calamar (Hodgkin y Huxley, 1952). 26 años después los canales de sodio dependientes de voltaje ( $Na_v$ ) fueron aislados y purificados de la anguila eléctrica (Agnew *et al.*, 1978).

En respuesta a una pequeña despolarización del potencial de membrana de la célula, los canales  $Na_v$  provocan una amplia despolarización por la facilitación de entrada de sodio a la célula, desencadenando la iniciación y propagación del potencial de acción tanto en las fibras musculares como en neuronas (Hille *et al.*, 1999; Hodgkin y Huxley, 1952).

Los canales  $Na_v$  consisten de una subunidad alfa ( $\alpha$ , 260kDa), la cual forma el poro conductor por el cual fluyen los iones sodio y contiene también el sensor de voltaje, ésta se asocia a una o dos subunidades beta ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , 30-40 kDa); cuya función ha sido asociada a la modulación de la expresión del canal en la membrana y de las propiedades biofísicas de la subunidad principal (Catterall, 1995). Cada subunidad está formada por cuatro dominios transmembranales (DI, DII, DIII, DIV), y a su vez cada dominio está

formado por seis segmentos transmembrana (S1-S6) unidos por asas intra y extracelulares (Figura 6).

Algunos residuos de aminoácidos que se encuentran en el segmento 4 de cada dominio forman el sensor de voltaje, en donde los residuos cargados positivamente de S4 provocan que este se mueva en respuesta al voltaje y acopla este movimiento a la apertura y cierre del poro del canal. Mientras que el giro que se forma entre los segmentos 5 y 6 forman el filtro de selectividad y permeabilidad del ion (Yu y Catterall, 2003).



**Figura 6.- Canal abierto de sodio.** Vista extracelular a la izquierda; vista lateral a la derecha. Ambas son imágenes obtenidas mediante cristalografía de la bacteria NavMs, una bacteria marina de *Magnetococcus sp.* Podemos observar los dominios que conforman el canal y los segmentos de cada dominio. Imagen modificada de Lera Ruiz y Kraus, 2015.

Hasta la fecha se han clonado nueve subtipos del canal nombrados del Nav1.1 al Nav1.9. Las subunidades alfa exhiben distribución específica del tejido; los subtipos Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.3 se expresan en el sistema nervioso central (SNC). Nav1.6 es expresado tanto en el sistema nervioso central como en el periférico; mientras que Nav1.7, Nav1.8 y

Nav1.9 se expresan en el sistema nervioso periférico (SNP). Los subtipos Nav1.4 y Nav1.5 son abundantes en músculo esquelético y cardíaco respectivamente (de Lera Ruiz y Kraus, 2015; Knapp *et al.*, 2012). Recientemente Nav1.5 se ha asociado al comportamiento metastático de varios cánceres epiteliales (Lopez-Charcas *et al.*, 2021).

Los canales Nav son blancos moleculares de algunas neurotoxinas importantes como lo son: la tetrodotoxina (TTX), la saxitoxina (STX) y la batracotoxina (BTX), así como de péptidos aislados de venenos de escorpiones, arañas y caracoles *Conus*. Se sabe que estas toxinas interactúan con seis sitios en el canal, inhibiendo o modulando las propiedades de su apertura (de Lera Ruiz y Kraus, 2015).

Los seis sitios diferentes con los que interactúan las toxinas no solo se distinguen por el sitio al cual se unen, también por la acción que la toxina ejerce sobre el canal (Stevens, Peigneur y Tytgat, 2011).

Sitio 1: se caracteriza por el bloqueo del poro, lo que provoca que el flujo de Na<sup>+</sup> no puedan llevarse a cabo. Es el sitio mejor estudiado, está compuesto por los residuos ubicados entre las asas que conectan los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios transmembranales. Las  $\mu$ -conotoxinas se caracterizan por unirse a este sitio. Algunos ejemplos son KIIIA, SIIIA, PIIIA, GIIIA.

Sitio 2: la unión de las toxinas a éste produce una activación persistente. Los residuos involucrados en este sitio se encuentran dentro de las hélices del S6 en el DI y DIV (Stevens *et al.*, 2011). A este sitio se unen batracotoxinas y grayanotoxinas.

Sitio 3: la unión de las toxinas a este sitio inhibe o retrasan la inactivación. Los residuos del canal de sodio involucradas en esta interacción incluyen a los que se encuentran en las asas extracelulares entre los segmentos S5 y S6 de los dominios DI-DIV (Thomsen y Catterall, 1989). Entre las toxinas que se sabe se unen al sitio 3 se encuentran las  $\alpha$ -toxinas de escorpión, toxinas de anémonas marinas y arañas.

Sitio 4: la unión de las toxinas a este sitio provoca una modificación en los mecanismos de apertura, que recorre la dependencia al voltaje de la activación a potenciales más hiperpolarizantes, y reducen la amplitud de las corrientes de sodio (Cestèle *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 2011). Los residuos involucrados se encuentran en el S3 y S4 de DII. Neurotoxinas que se unen a este sitio son las  $\beta$ -toxinas de escorpión,  $\beta$ -toxinas de arañas, y las  $\mu$ O-conotoxinas.

Sitio 5: está conformado por el S6 del DI y el S5 del DIV. Aunque se desconocen los residuos involucrados en la participación con este sitio, se sabe que la interacción de neurotoxinas en este sitio produce varias alteraciones en la apertura del canal: (i) el potencial de activación cambia a potenciales más hiperpolarizantes, (ii) los canales permanecen más tiempo abiertos, (iii) la inactivación se enlentece o es inhibida. Las neurotoxinas que interactúan con este sitio provienen de algunos dinoflagelados, brevetoxinas y ciguatoxinas.

Sitio 6: sitio aún no definido, se sugiere, sin embargo, que S3 y S4 del DIV podrían estar involucrados gracias al estudio de la  $\delta$ -ctx SVIE (Leipold *et al.*, 2005). El efecto que

ejercen sobre los canales  $Na_v$  es el de reducir la inactivación sin la típica dependencia de voltaje.

Los canales de sodio pueden clasificarse con base en su sensibilidad a la neurotoxina TTX;  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7$  son bloqueados por concentraciones nanomolares de la toxina, por lo tanto, son clasificados como sensibles a TTX. Mientras que  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$ ,  $Na_v1.9$  son bloqueados en el rango micromolar de TTX, y son clasificados como canales resistentes a TTX (Goldin *et al.*, 2000).

El alto grado de homología entre los diferentes subtipos del canal  $Na_v$ , difícil producir ligandos que sean subtipo específicos. Sin embargo, se sabe que los canales  $Na_v$  presentan sitios de unión específicos para miembros de cuatro familias de conotoxinas  $\mu$ ,  $\mu O$ ,  $\delta$ ,  $\iota$ . Varios estudios han identificado que los sitios de unión a estas conotoxinas está restringido a dominios o áreas bien definidas (Knapp *et al.*, 2012).

Las  $\mu$ -conotoxinas se unen a la región del poro de los canales  $Na_v$ . La selectividad está dada por las diferencias entre residuos que se encuentran en la región entre el S5 y la primera parte del asa que une al siguiente segmento (Li *et al.*, 2003). Entre las conotoxinas pertenecientes a la familia  $\mu$  que se ha visto que tienen efecto modulador sobre estos canales de mamíferos; podemos nombrar a: SIIIA, CnIIIA, SmIIIA, MIIIA, BuIIIA, BuIIIB, TIIIA, GIIA, PIIIA, KIIIA, CnIIIC (Favreau *et al.*, 2012; Shon *et al.*, 1998; van der Haegen *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2011).

Las  $\mu$ O-conotoxinas son péptidos hidrofóbicos que inhiben las corrientes de sodio. Hasta la fecha se han descubierto seis: MrVIA, MrVIB, MfVIA, LtVIIA, LtVIC, de entre 28 a 32 aminoácidos, cada conotoxina contiene tres puentes disulfuro. Entre las conotoxinas MrVIA y MrVIB solo existe una diferencia de dos residuos de aminoácidos (Fainzilber, 1995). Poco se sabe de la relación actividad-estructura que pueda ayudar a definir como se da la especificidad de las  $\mu$ O conotoxinas (Gajewiak *et al.*, 2014; Vetter y Lewis, 2012).

Las  $\delta$ -conotoxinas son péptidos que inhiben la inactivación de los canales  $Na_v$ . Como ejemplo de estos tipos de conotoxinas se encuentran TxVIA y TxVIB que incrementan la duración de las corrientes de sodio (Hasson *et al.*, 1993). Poco se sabe del mecanismo de interacción entre las  $\delta$ -conotoxinas y los canales  $Na_v$ ; Sin embargo, se sabe que las conotoxinas SVIE y EVIA interactúan con el dominio hidrofóbico del sensor de voltaje de los canales (Barbier *et al.*, 2004; Leipold *et al.*, 2005). Otras conotoxinas pertenecientes a la familia delta son: PVIA, GmVIA, SuVIA (Jin *et al.*, 2015; Safo *et al.*, 2000). Otra conotoxina que modula las corrientes de los canales  $Na_v$ , incrementándolas, es la LtIIIA; aunque no se sabe el mecanismo de acción sobre los canales (Wang *et al.*, 2009).



### ***Superfamilia T de las conotoxinas***

Los miembros pertenecientes a la superfamilia T comparten una secuencia señal altamente conservada y un arreglo de cisteínas característicos en las toxinas maduras. Cada superfamilia se divide a su vez en familias definidas por sus blancos farmacológicos (Luo *et al.*, 2006; Olivera, 2006; Terlau y Olivera, 2004).

La superfamilia T está dividida en tres grupos basado en el arreglo de cisteínas. El arreglo V (o T-1 (Olivera, 2002)) incluye conotoxinas con dos pares de cisteínas separadas por 4,5 o 6 aminoácidos (CC-CC), los enlaces disulfuro se forman entre los residuos de cisteína I-III y II-IV (Robinson y Norton, 2014). El arreglo X (o T-2 (Olivera,2002) tiene una estructura CC-C-C con enlaces entre I-IV y II-III. Por último, la conotoxina TxXIIIA es única, muy similar al arreglo V (T-1), pero con una cisteína extra (CC-CCC), sin embargo, se desconoce la conectividad entre las cisteínas (Robinson y Norton, 2014).

Las conotoxinas pertenecientes a la superfamilia T con arreglo de cisteínas V (T-1) han sido encontradas en caracoles *Conus* tanto piscívoros, vermívoros como molusquívoros (Rigby *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999). De estas conotoxinas conocidas y que han sido evaluadas se ha visto que tienen efecto sobre el comportamiento de los peces y ratones. La conotoxina TxVA ha mostrado efectos provocando la hiperactividad en ratones cuando se inyecta intracranealmente; también se ha comprobado que reduce el flujo de  $Ca^{2+}$  presinápticamente ya sea por unirse a un canal de  $Ca^{2+}$  o por unirse a un GPCR (receptor acoplado a proteína G) (Walker *et al.*, 1999). La conotoxina Lt5d inhibe corrientes de  $Na^+$  sensibles a tetrodotoxina en neuronas del ganglio de la raíz dorsal en ratones (Liu *et al.*, 2007).

Anteriormente se había caracterizado a sr5a por Aguilar y colaboradores (2006), de dicho trabajo se sabe que la conotoxina sr5a es un péptido hidrofóbico, cuya secuencia de aminoácidos es IINWCCLIFYQCC, con una masa calculada de 1616.68 Da; pertenece a la superfamilia T-1. La conectividad de cisteínas ocurre entre los residuos I-III y II-IV (Aguilar *et al.*, 2006), este arreglo de enlaces disulfuro pertenece al arreglo V (Robinson and Norton, 2014).

Cuando sr5a es inyectada intracranealmente en ratones, estos muestran una extensión corporal después de 2-4 minutos en ratones de 9-días de nacidos; mientras que, en ratones de 16 días, exhiben una disminución de la actividad y respiración agitada dentro de los 15-19 minutos de haber sido administrada sr5a intracranealmente (Aguilar *et al.*, 2006).

Se sabe que las conotoxinas pertenecientes al grupo T-1 de la superfamilia T afectan distintos tipos de blancos moleculares, como lo son: canales de calcio o receptores acoplados a proteínas G (*Aplysia californica*) (Rigby *et al.*, 1999); receptores acoplados a proteínas G (somatostatina sst3R de humanos) (Petrel *et al.*, 2013), canales de sodio voltaje-dependientes (resistentes a TTX, sensibles a TTX, ambos de rata) (J. Liu *et al.*, 2007), agonista de receptores  $\kappa$ -opioides (en ratones) (Brust *et al.*, 2016), y receptores de acetilcolina (en rata  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 3\beta 2$ ) (Wang *et al.*, 2014), de manera que el descubrimiento de nuevos blancos moleculares dentro de esta superfamilia no puede ser descartado.

## **JUSTIFICACIÓN**

Dos  $\alpha$ -conotoxinas del veneno del caracol marino *Conus spurius* han sido caracterizadas bioquímicamente SrIA y SrIB, cuyo blanco molecular son los receptores nACh (López-Vera *et al.*, 2007), y recientemente, una conorfamida (CNF-Sr3) cuyo blanco molecular es un canal de potasio dependiente de voltaje (Campos-Lira *et al.*, 2017).

Respecto a la conotoxina sr5a (Aguilar *et al.*, 2006), perteneciente a la superfamilia T1, a la fecha no se ha identificado un blanco molecular específico para ella; por lo que, en este trabajo se caracterizó electrofisiológicamente el efecto de sr5a de *Conus spurius* sobre la actividad de canales  $Na_v$ .

Gracias a la implementación de herramientas de predicción, como lo es iCTX-Type (Ding *et al.*, 2014), se predicen los posibles blancos moleculares de las toxinas basados en la secuencia de éstas.

## ***Hipótesis***

Con base en los análisis de predicción iCTX type que identificaron como blancos moleculares a tres canales iónicos, la conotoxina sr5a presente en el veneno de *Conus spurius* tendrá mayor afinidad por uno de los subtipos del canal Na<sub>v</sub>.

### ***Objetivo general***

Caracterizar electrofisiológicamente el efecto del péptido sr5a de *Conus spurius* sobre la actividad de canales  $Na_v$ .

### ***Objetivos específicos***

- Obtener y purificar la conotoxina sr5a del veneno de *Conus spurius*.
- Evaluar el efecto de la conotoxina sr5a sobre los canales  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$ , y  $Na_v1.7$  expresados en las células HEK-293.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Obtención de ductos venenosos:***

Los ductos que contenían el veneno de *Conus spurius* utilizados en este trabajo fueron proporcionados por el laboratorio de Neurofarmacología Marina a cargo del Doctor Manuel B. Aguilar Ramírez del Instituto de Neurobiología-UNAM.

### ***Extracción del veneno crudo de *C. spurius*:***

El veneno fue extraído de los conductos mediante la homogenización de estos colocándolos en 10 ml de solución de extracción (40% acetonitrilo y 2% ácido trifluoroacético). Los conductos fueron homogeneizados (SHM1, Stuart) y posteriormente, la disolución homogénea se centrifugó a 16000 xg por 30 min, el sobrenadante se conservó como la fracción cruda que contiene los péptidos de interés.

### ***Separación de los componentes del veneno:***

Los péptidos contenidos en el veneno de *C. spurius* se separaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa utilizando una columna analítica Vydac C<sub>18</sub> (4.6 mm x 250 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm), provista con una precolumna de sílice (218TP54, 4.6 X 10 mm, 5 µm de tamaño de partícula). Para la elución de los componentes se utilizó un flujo de 1ml/min y un gradiente lineal de 5% a 95% de solución B (90%ACN, 0.085% TFA) por 95 min. El HPLC fue acoplado a un espectrofotómetro UV de flujo y se realizó la detección de los péptidos monitoreando la absorbancia de la muestra a 220 nm. Todas las fracciones fueron colectadas manualmente y se liofilizaron en un concentrador (Savant SpeedVac Concentrator, Thermo), posteriormente se conservaron a

-30°C. La fracción que correspondía a la conotoxina sr5a fue separada para posteriormente realizar los estudios funcionales.

### ***Determinación de la secuencia parcial "de novo"***

La fracción que correspondía a la conotoxina sr5a fue procesada para realizar una secuenciación parcial "de novo" en el Laboratorio Universitario de Proteómica del IBT/UNAM (Servicios de identificación, caracterización estructural y cuantificación de proteínas a través de la Espectrometría de Masas de alta resolución).

Al realizar este procedimiento, podemos encontrar, a partir de un fragmento de proteína contenida en la muestra, la secuencia de una proteína con identidad similar a una proteína ya conocida.

### ***Síntesis de la conotoxina sr5a***

Previamente, la conotoxina sr5a había sido aislada y caracterizada a nivel de estructura primaria, conexión entre cisteínas y actividad biológica en ratones por Aguilar y colaboradores (2006). Sin embargo, debido a la limitada cantidad disponible de sr5a nativa, decidimos utilizar la toxina sintética para realizar nuestros experimentos.

La conotoxina sr5a fue sintetizada por la compañía Peptide 2.0 Inc, con una pureza (HPLC) del 95.36%. Ya que la conotoxina es hidrofóbica (IINWCCLIFYQCC) esta fue disuelta en 20% de dimetil sulfóxido (DMSO) como solución madre (35.3 mM de sr5a en la solución).

### ***Cuantificación de la conotoxina sr5a***

Calculamos la concentración de la conotoxina disuelta en 20% DMSO mediante la correlación del área bajo la curva obtenida mediante HPLC de la  $\alpha$ -conotoxina sintética RgIA (la cual es de 14 aminoácidos, igual que sr5a), respecto al área obtenida para sr5a.

### ***Predicción del blanco molecular***

La predicción del blanco molecular se realizó usando la aplicación iCTX-Type (Ding *et al.*, 2014) <http://lin-group.cn/server/iCTX-Type>.

La secuencia de residuos de aminoácidos de sr5a es ingresada a la plataforma en formato FASTA, posterior a lo cual se arroja el resultado de posibles blancos moleculares y la probabilidad, siendo 1 la más alta de que el blanco molecular corresponda a una familia de canales.

### ***Expresión de canales de sodio en células HEK-293***

Se realizó la evaluación electrofisiológica utilizando células HEK-293 como sistema de expresión heterólogo de los canales Nav1.5 (cDNA de humano, GenBank #M77235), Nav1.6 (cDNA de rata, GenBank #AF049239) y Nav1.7 (cDNA de rata, GenBank #U79568). Las células HEK-293 fueron incubadas a 37°C en una atmósfera saturada de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> en 90% de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las transfecciones se realizaron con JetPEI® (Santa Cruz Biotechnology, Inc) como agente transfectante en cajas de Petri de 35-mm, acorde con el protocolo del



fabricante, el vector que se utilizó fue PCNA3.1, cada subtipo de  $Na_v$  fue fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP).

Las células transfectadas se despegaron a las 24 h después de iniciada la transfección y fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio (5x5 mm) contenidos en cajas de Petri de 35 mm. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo en las células incubadas al menos 2 horas.

### ***Registros electrofisiológicos utilizando la configuración de célula completa (patch clamp)***

Para evaluar si la toxina sr5a afectaba las corrientes generadas por la apertura de los canales  $Na_v$  se utilizó la técnica de "patch-clamp" en la configuración de célula completa (Kornreich, 2007) a una temperatura de 20-23°C. Los registros fueron obtenidos utilizando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, EUA), conectado a una interfase Digidata 1322 A/D (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, EUA). Las señales adquiridas, así como los protocolos de voltaje necesarios para estudiar las corrientes de sodio fueron diseñados y aplicados con el programa pCLamp 9.4 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, EUA). Todas las corrientes registradas fueron filtradas a 20 kHz. Las señales de corriente fueron digitalizadas a diferentes intervalos de tiempo (10 - 100  $\mu$ s) por medio del convertidor analógico-digital de la interfase y finalmente almacenadas en el disco duro de la computadora para su posterior análisis.

Durante los registros electrofisiológicos un cubreobjetos con células transfectadas fue transferido a la cámara de registro donde había una solución externa que contenía en mM: 158 NaCl, 2CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-NaOH (pH 7.4). 299 mOsm. pH7.4. Las células fueron visualizadas con ayuda de un microscopio óptico invertido (Eclipse TE300, Nikon). La señal de registro fue adquirida utilizando electrodos de borosilicato fabricados a partir de capilares de vidrio (TW 150-3; WPI Inc.) con resistencia de 2-3 MΩ y llenados con solución interna (en mM: 117 CsF, 30 NaCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 EGTA y 10 HEPES-CsOH (pH 7.3). 310 mOsm.). Las células fueron fijadas a un voltaje de -100 mV y evocadas las corrientes con pulsos despolarizantes de -10 mV cada 10 segundos. Debido a la limitada cantidad de la conotoxina sr5a, los registros fueron hechos mediante la aplicación local de la conotoxina en la cámara de registro. Como el péptido se encuentra disuelto en DMSO, la concentración máxima de éste fue de 0.060% en la cámara de registro, cuya concentración no altero la amplitud de las corrientes en las células evaluadas.

### ***Evaluación electrofisiológica de la conotoxina sr5a***

La conotoxina sintetizada fue disuelta en 20% DMSO, la solución madre tenía una concentración 35.3 mM de sr5a. Se evaluó el efecto a 3 concentraciones distintas (200 nM, 400 nM, 600 nM) sobre las corrientes de sodio activadas por voltaje. Cada concentración fue agregada a la cámara de registro que contenía solución externa una placa con células HEK que expresaban algún subtipo de Na<sub>v</sub> y se observó el efecto.

Las corrientes de sodio fueron activadas mediante pulsos despolarizantes de 16 ms a 0 mV aplicados cada 10 s, desde un potencial controlado (fijación de voltaje) de -100 mV. La amplitud de las corrientes fue normalizada con respecto a la capacitancia de la membrana celular y se expresaron como densidad de corriente (pA/pF).

Las curvas de activación se obtuvieron con el siguiente protocolo: Se aplicó un pulso despolarizante de 16 ms de duración en un rango de voltaje de -60 a +90 mV. Mientras que para las curvas de inactivación se aplicó un protocolo de dos pasos: El primer paso (prepulso) consistió en la aplicación de un pulso largo de 200 ms para promover la transición de los canales del estado estacionario al estado inactivado, en un rango de -140 a -60 mV. El segundo paso fue un pulso de prueba de -10mV para medir la fracción de  $I_{Na}$  que no fue inactivada durante el primer paso (prepulso). Las curvas de activación fueron normalizadas (conductancia vs. voltaje) de los canales  $Na_v1.5$  y se ajustaron a una función de Boltzmann  $G = G_{max} / (1 + e^{(\frac{V_m - V_{1/2}}{k})})$ , donde  $G_{max}$  es la conductancia máxima de  $Na_v$ ,  $V_m$  es el potencial de prueba,  $V_{1/2}$  es el punto medio de activación y  $k$  es el factor de la pendiente. La dependencia de voltaje de la inactivación en el estado estacionario de  $I_{Nav}$  también fue normalizada y se describió con una sola función de Boltzmann:  $I = I_{max} / (1 + e^{(\frac{V_m - V_{1/2}}{k})})$ , donde  $I_{max}$  es la corriente máxima,  $V_{1/2}$  es la mitad de la corriente máxima de sodio, y  $k$  es la pendiente.

### **Análisis de datos**

Los registros electrofisiológicos fueron analizados y graficados utilizando los programas Clampfit del paquete pClamp 9.02 (Molecular Devices) y Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

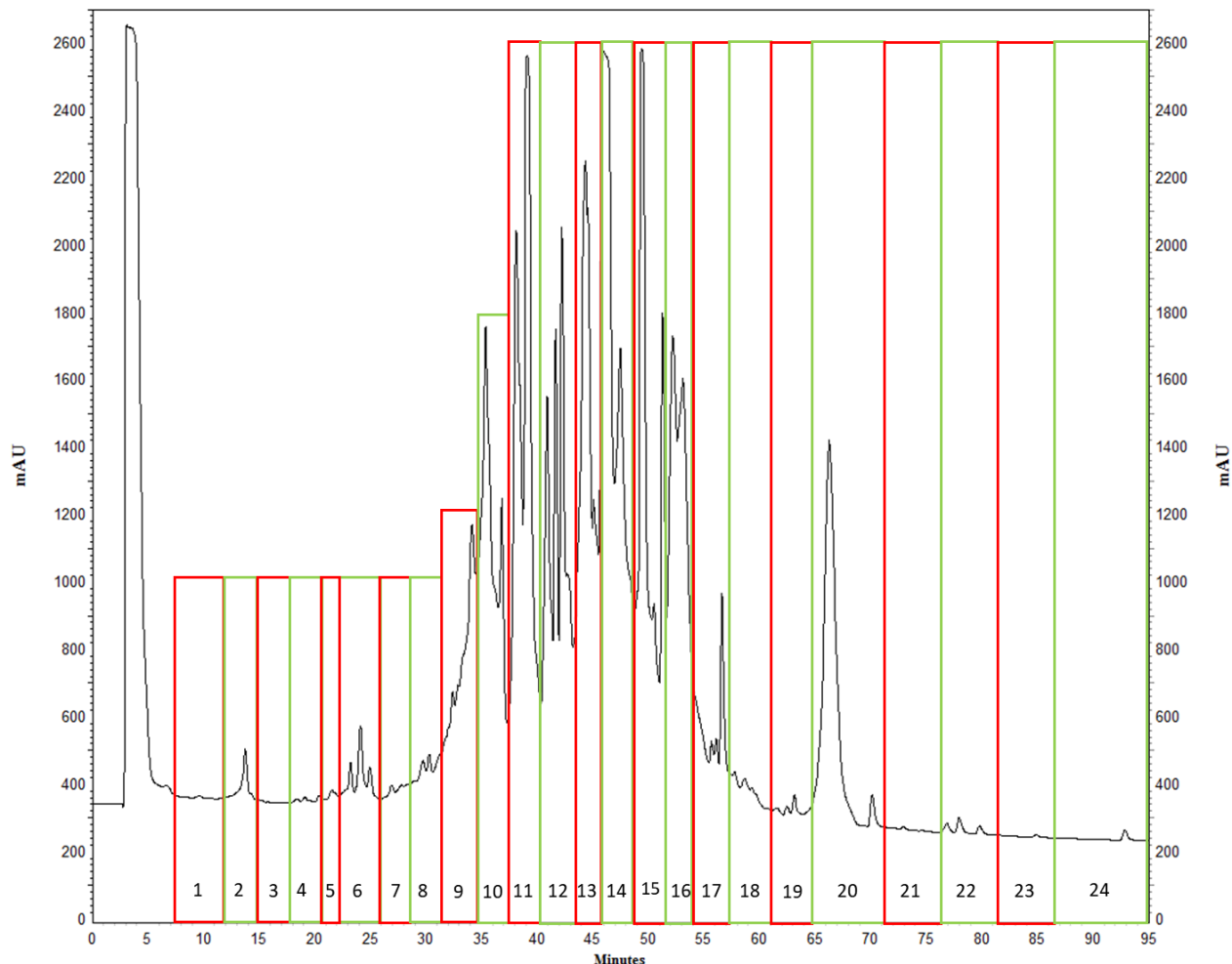
Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar (EEM) de los valores obtenidos en (n) células. Las diferencias estadísticas fueron determinadas utilizando el análisis de varianza seguidas por las comparaciones múltiples de Dunnett utilizando  $Na_v1.5$  como grupo control, y se indican como “+” para  $P < 0.01$  y “+” para  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### ***Fraccionamiento del veneno***

Una vez obtenido el veneno de *C. spurius* se procedió a realizar un perfil cromatográfico (Figura 7); del cual se colectaron manualmente 24 fracciones líquidas en tubos Eppendorf de 1.5ml que posteriormente fueron liofilizadas y almacenadas a -30°C. De las 24 fracciones, la fracción 15 (de ahora en adelante se nombrará como F15) fue la que se seleccionó como la fracción que contenía a la conotoxina sr5a.

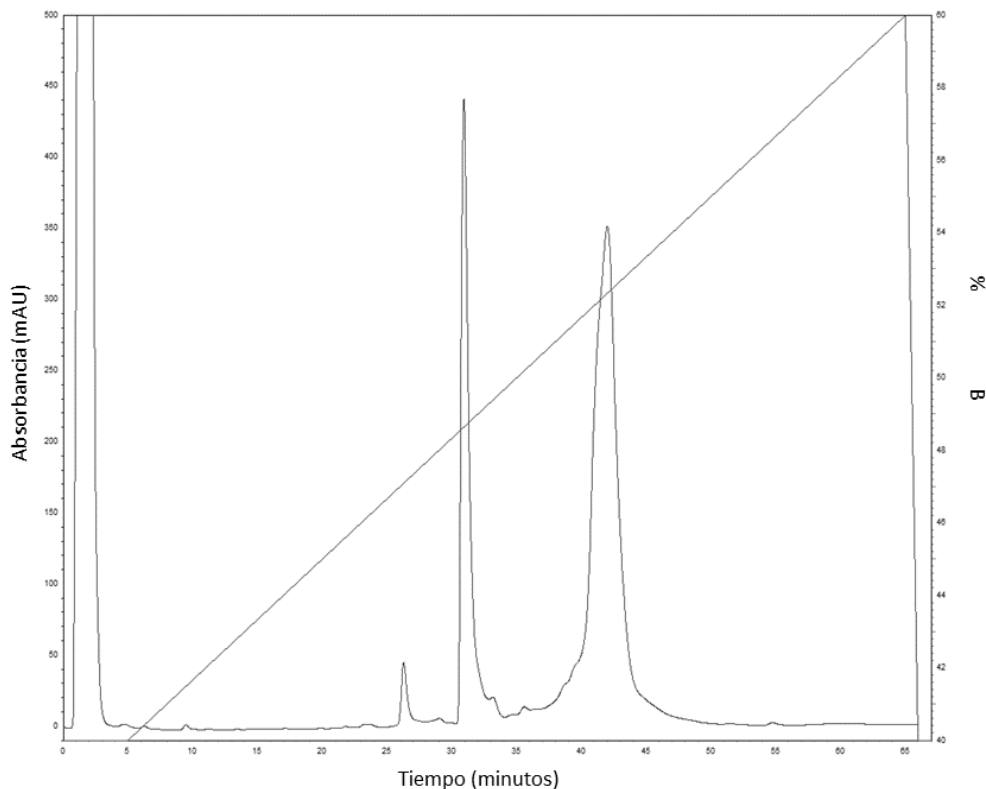
Por el trabajo previo del Doctor Aguilar y colaboradores se conoce la secuencia de residuos de aminoácidos, conectividad entre residuos de cisteína y tiempo de retención; y por esto último se sabe el tiempo al cual va a eluir la conotoxina, es por ello que tomamos a F15 para los siguientes experimentos.



**Figura 7.- Perfil cromatográfico del extracto crudo del caracol marino *C. spurius*.** Los péptidos fueron separados con una columna C18, eluyéndolos con un gradiente de 5% a 100% de solución B en 95 minutos, con un incremento de B de 1% por minuto y un flujo de 1 ml/ min. Las líneas indican la división de cada una de las fracciones recolectadas manualmente (F1-F24).

F15 se sub-fraccionó para aislar el componente sr5a, y de esta manera obtener el compuesto lo más puro posible y verificar la presencia de la conotoxina. En la figura 8 se muestran las fracciones obtenidas a partir de F15.

### ***Subfraccionamiento***



**Figura 8.- Perfil cromatográfico del sub fraccionamiento de F15.** La elución fue realizada con un gradiente de 35-55 % de solución B (90% ACN, 0.085% TFA) en 60 minutos.

### ***Secuenciación parcial "de novo"***

Las subfracciones fueron analizadas en el Laboratorio Universitario de Proteómica del IBT/UNAM para realizar una secuenciación parcial "*de novo*" para verificar la presencia de la conotoxina sr5a en el veneno de *C. spurius*. De esta secuenciación "*de novo*" fueron obtenidas 6 secuencias diferentes de precursores; de las cuales, dos corresponden al precursor de la conotoxina conocida sr5a (Tabla 4, número 2 y 3) (Zamora-Bustillos *et al.*, 2009). De esta manera confirmamos la presencia de la conotoxina sr5a en el veneno de *C. spurius* anteriormente aislada por Aguilar y colaboradores (Aguilar *et al.*, 2006).

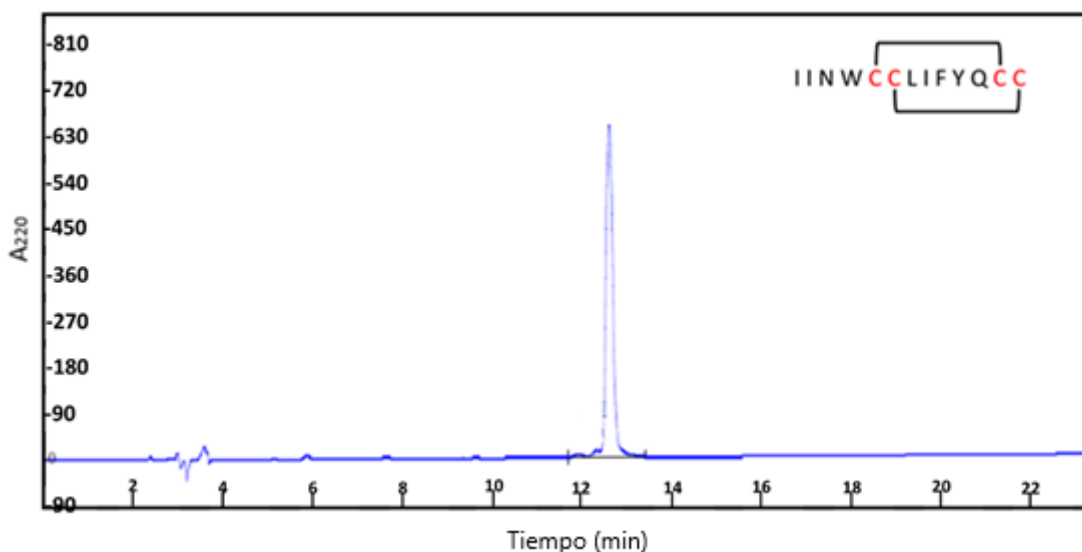
**Tabla 4. Búsqueda de identidad de secuencia** con la base de datos NCBI nr (Mollusca) utilizando como herramienta BLAST. Las secuencias 2 y 3 corresponden a la secuencia del promotor de sr5a.

NO	SEQUENCE	SEQUENCE ID	PROTEIN NAME	COMPARACIÓN DE SECUENCIA
1	VATVSLPR	OWF48254.1	tyrosinase-like protein tyr-3 [Mizuhopecten yessoensis]	Query 1 VATVSLP 7 Sbjct 427 VATVSLP 433
2	DDVPLASFHDNAK	C0KYC3.1	RecName: Full=Conotoxin Sr5.4; Flags: Precursor	Query 1 DDVPLASFHDNAK 13 Sbjct 28 DDVPLASFHDNAK 40
3	TKDDVPLASFHDNAK	C0KYC3.1	RecName: Full=Conotoxin Sr5.4; Flags: Precursor	Query 1 TKDDVPLASFHDNAK 15 Sbjct 26 TKDDVPLASFHDNAK 40
4	VNLLNQELEFLK	XP_019920688.1	PREDICTED: titin [Crassostrea gigas] Sequence ID:	Query 1 VNLLNQELEFLK 12 Sbjct 389 VDLLDDMLEFLK 400
5	LEQNLSQLK	-	-	-
6	QDLTLLLDAYGGLEAEK	-	-	-

La predicción del blanco molecular de la conotoxina sr5a se llevó a cabo utilizando el programa iCTX-Type (Ding *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2013), el cual consiste en el análisis de la secuencia de una conotoxina dada y la compara con una base de datos de secuencias de conotoxinas conocidas (disponible en línea: <http://lin-group.cn/server/iCTX-Type>). El análisis de la secuencia en el programa iCTX Type mostró las siguientes probabilidades:  $N_{av} 0.75 > C_{av} 0.23 > K_{av} 0.01$ , siendo  $N_{av}$  los canales que tienen más probabilidad de ser blancos farmacológicos de sr5a; por lo que decidimos realizar evaluaciones electrofisiológicas de sr5a en al menos tres subtipos de  $N_{av}$ .

### ***Síntesis y cuantificación de sr5a***

Debido a la poca disponibilidad de la conotoxina nativa, se envió a sintetizar y su pureza fue evaluada mediante cromatografía de fase reversa. En la figura 9 se muestra el perfil cromatográfico de sr5a con un gradiente de 5 a 95% de solución B (90% ACN, 0.085% TFA) por 95 min, con un flujo constante de 1 ml/min. El producto de la síntesis química fue 95.36% puro.



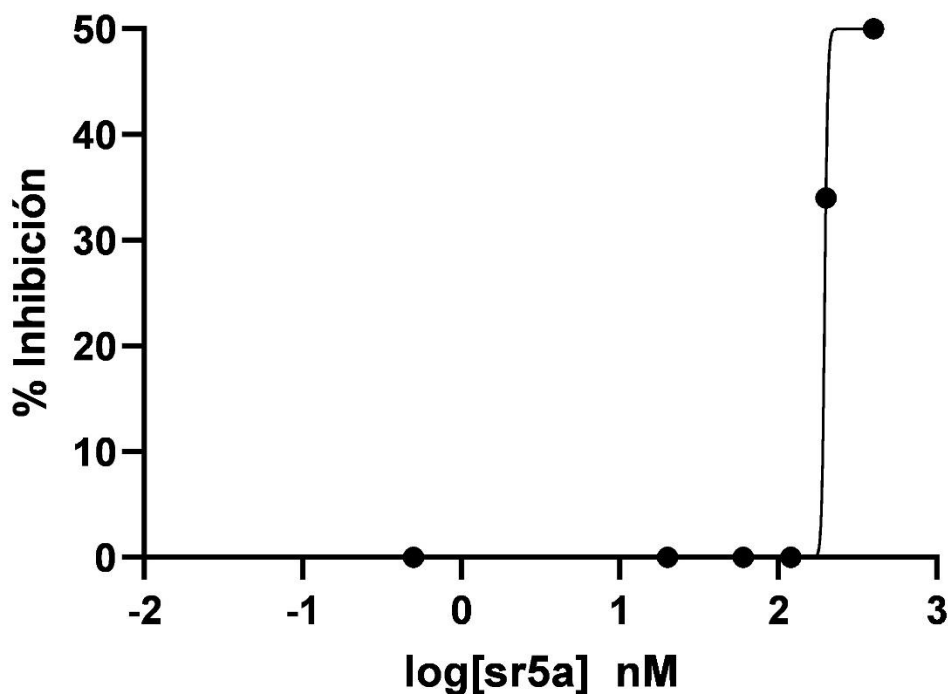
**Figura 9.- Cromatografía de fase reversa (HPLC) de la conotoxina sintética sr5a.** El inserto muestra la secuencia de residuos de aminoácidos de sr5a y en rojo la conectividad de los residuos de cisteína. Para el cromatograma se utilizó una columna analítica Vydac C<sub>18</sub> (4.6 mm x 250 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm), provista con una pre-columna de sílice (218TP54, 4.6 X 10 mm, 5 µm de tamaño de partícula).



### ***Evaluación electrofisiológica***

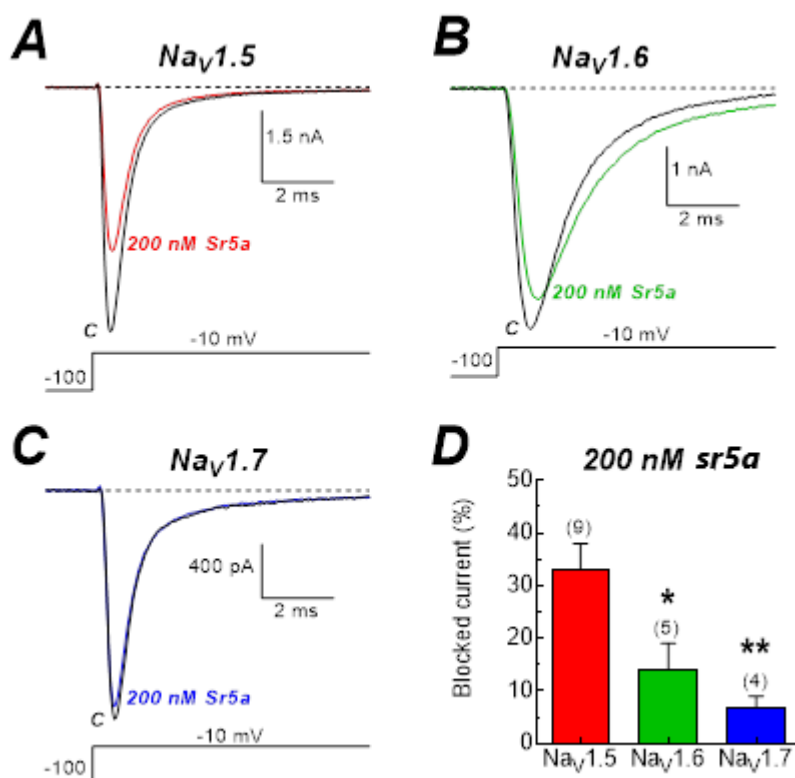
Con base en los resultados arrojados por la predicción hecha en el programa iCTX type, fue evaluado el efecto de sr5a sobre los canales de sodio  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7$ , los cuales están distribuidos en músculo cardiaco, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periferico (SNP), y SNP respectivamente. Estos canales fueron expresados en células HEK293 como sistema de expresión heterológica.

Dado que las conotoxinas presentan una afinidad desde el orden de nanomolar hasta micromolar se realizó una curva dosis respuesta en  $Na_v1.5$ . Como podemos observar en la Figura 10 a la concentración de 200 nM de sr5a se observó un bloqueo de la corriente en un 34%; por lo que, las evaluaciones electrofisiológicas siguientes se realizaron con 200nM.



**Figura 10.- Curva dosis respuesta para sr5a en  $hNa_v1.5$ .**

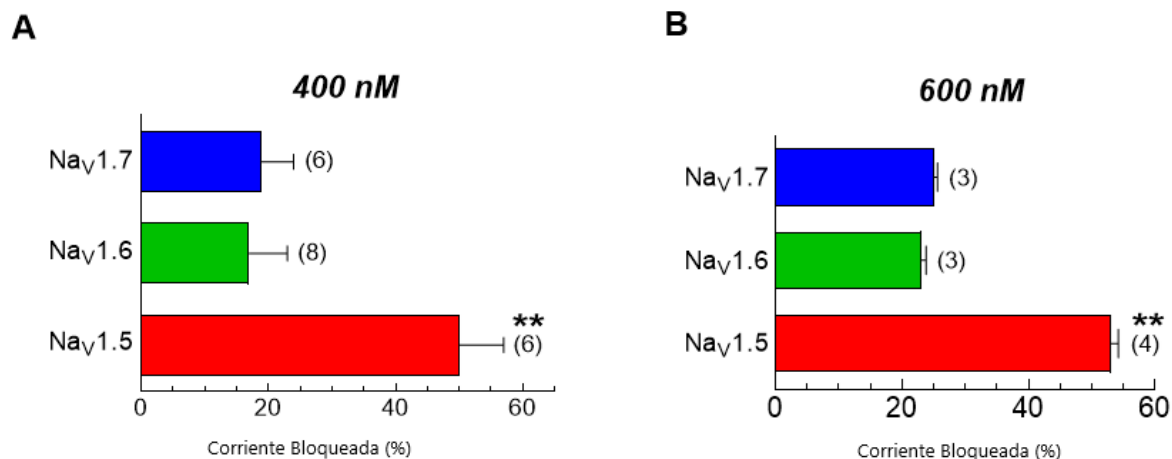
Continuando con la evaluación electrofisiológica a 200nM en la figura 11 A-C se muestran ejemplos de trazos representativos de la corriente en control (color negro, A-C) y la corriente en presencia de sr5a (200nM); color rojo para  $Na_v1.5$ , color verde para  $Na_v1.6$ , y color azul para  $Na_v1.7$ . Mientras que en la figura 11 D se ilustra el análisis cuantitativo del efecto sobre las corrientes. La conotoxina sr5a a una concentración de 200nM bloqueó el  $33\% \pm 5\%$  ( $n=9$ ) de la corriente del canal  $hNa_v1.5$ ; mientras que, a esa misma concentración el bloqueo de la corriente de sodio en  $rNa_v1.6$  fue del  $14 \pm 5\%$  ( $n=5$ ) y en  $rNa_v1.7$  del  $7\% \pm 2\%$  ( $n=4$ ) (Figura 11D).



**Figura 11.- Inhibición de las corrientes de los canales de sodio activados por voltaje por la conotoxina sr5a.** Trazos representativos de la inhibición de sr5a (200nM) sobre  $hNa_v1.5$  (A),  $rNa_v1.6$  (B), y  $rNa_v1.7$  (C). Los registros se realizaron utilizando la técnica de control de voltaje en célula completa (patch-clamp) en células KEK-293 que expresaban los canales de sodio. Las corrientes de sodio ( $I_{Na}$ ) fueron generadas aplicando pulsos despolarizaciones de 16 ms de duración a -10mV cada 10 s desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. Cada trazo

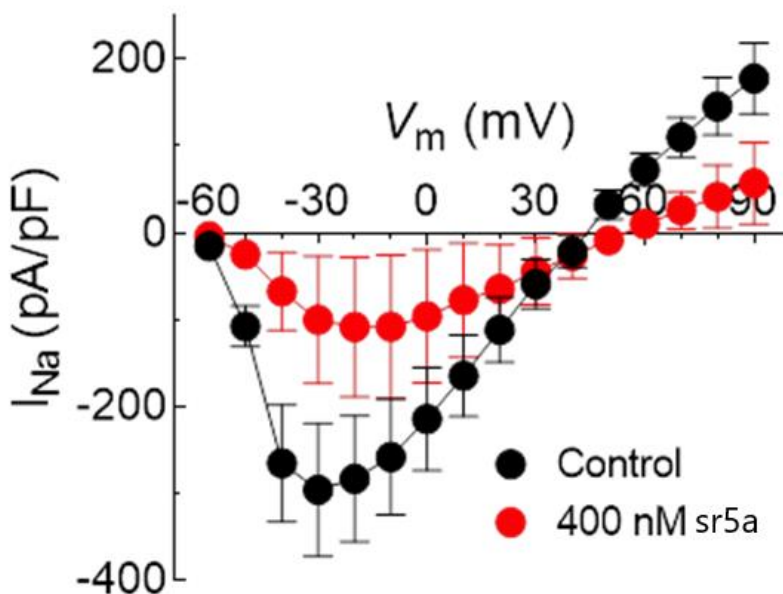
corresponde al promedio de tres registros para cada condición. La línea punteada representa las corrientes en ausencia de estímulo. (**D**) Disminución de  $I_{Na}$  generada por la activación de hNav1.5, rNav1.6, rNav1.7 en presencia de 200 nM sr5a. Los resultados se muestran como el promedio de inhibición  $\pm$  SEM del número de células registradas (n entre paréntesis en cada caso). Análisis estadístico utilizando comparación múltiple de Dunnett usando Nav1.5 como grupo control. \*\* P < 0.01 y \* P < 0.05.

Para saber si sr5a produce un efecto dosis-dependiente se realizaron evaluaciones electrofisiológicas utilizando mayores concentraciones, y aplicando el mismo protocolo de activación de  $I_{Na}$ . En la figura 12 se muestra el análisis cuantitativo obtenido después de haber expuesto a los canales de sodio a 400 nM (Figura 12 A) y a 600 nM (Figura 12 B) de sr5a. La aplicación de la conotoxina sr5a a 400 nM confirmó tener mayor especificidad sobre las corrientes de los canales hNav1.5, incrementando el bloqueo de  $I_{Na}$  al 50%. Mientras que a la misma concentración el bloqueo en la corriente de los canales rNav1.6 y rNav1.7 incrementó de 14 a 17% y de 7 a 19% respectivamente.



**Figura 12.- Incremento de las concentraciones de la conotoxina sr5a también bloquea la  $I_{Na}$  con una mayor especificidad sobre el subtipo hNa<sub>v</sub>1.5.** Porcentaje de la amplitud de  $I_{Na}$  generada la activación de hNa<sub>v</sub>1.5, rNa<sub>v</sub>1.6, y rNa<sub>v</sub>1.7 en presencia de 400 nM (**A**) y 600 nM (**B**) de sr5a. Las barras indican el promedio de  $I_{Na} \pm$  SEM del número de células registradas (el número está indicado entre paréntesis). Análisis estadístico de varianza seguido por comparación múltiple de Dunnett tomando a hNav1.5 como control, \*\*  $P < 0.01$  y \*  $P < 0.05$ .

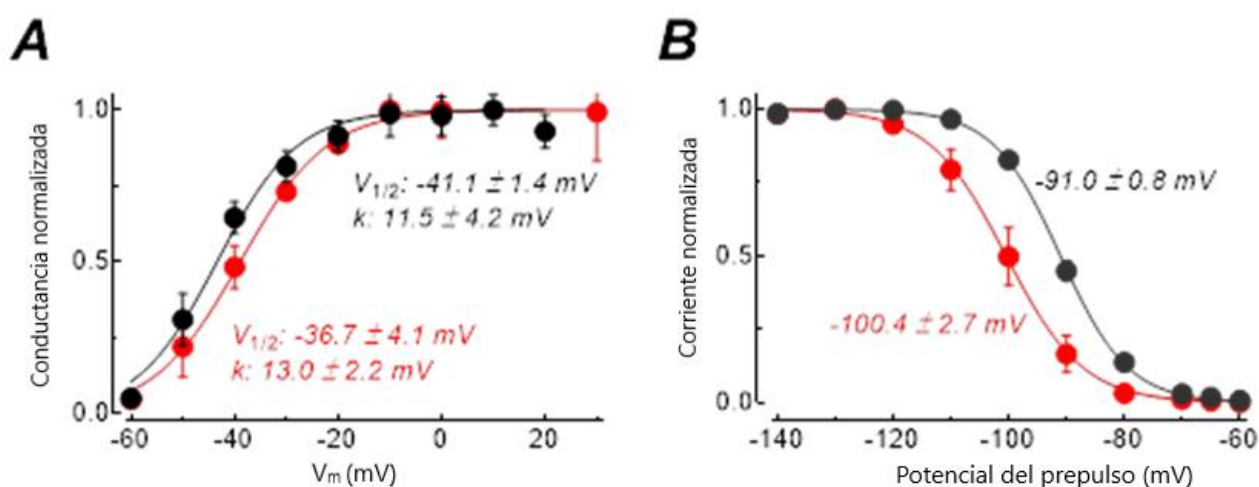
La conotoxina sr5a inhibió con mayor potencia la  $I_{Na}$  de hNa<sub>v</sub>1.5, por lo que los siguientes análisis fueron realizados sobre este subtipo. Para analizar con mayor detalle las propiedades biofísicas del canal en presencia de sr5a, se evaluó el efecto sobre la relación corriente-voltaje de la  $I_{Na}$ , así como la dependencia de voltaje en los procesos de activación e inactivación del canal. Estas propiedades funcionales fueron evaluadas en ausencia y presencia de sr5a. En la Figura 13 se muestra la magnitud de  $I_{Na}$  en un rango de voltaje de -60 a +90 mV en células que expresaban el canal hNa<sub>v</sub>1.5, tanto en ausencia (círculos negros) como en presencia (círculos rojos) de 400 nM de la conotoxina. En círculos rojos podemos observar que hay una disminución de  $I_{Na}$  en todo el rango de voltaje a la cual los canales Na<sub>v</sub>1.5 generan corrientes entrantes sin ningún cambio significativo de la dependencia al voltaje de la activación; lo cual sugiere que sr5a no interfiere con este mecanismo del canal Na<sub>v</sub>1.5.



**Figura 13.- Relación de la corriente-voltaje (I-V) de la  $I_{Na}$  generada por la activación de los canales  $hNa_v1.5$  en presencia de sr5a.** Cada punto en la gráfica corresponde al promedio del pico máximo de la corriente en cada potencial. En negro se muestran la  $I_{Na}$  normalizada con respecto a la capacitancia de la membrana obtenidas en ausencia de sr5a (control), mientras que en rojo se muestra la respuesta de corriente obtenida durante la presencia de 400 nM de sr5a. Las curvas I-V se obtuvieron aplicando pulsos despolarizantes en un rango de -60 mV a +90 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV.

Para entender el posible efecto de sr5a sobre el proceso de activación de  $I_{Na}$  se construyó una curva de conductancia asociada a la activación de la corriente, con un rango de potencial de -60 a +30 en el caso de la activación. Como se muestra en la figura 14A los resultados fueron ajustados a la función de Boltzman e indicaron que durante la activación de  $Na_v1.5$  la dependencia al voltaje de la conductancia no fue modificada por la presencia de sr5a (trazos rojos), tal como lo confirman los valores obtenidos para el potencial de activación media ( $V_{1/2}$ ) y por la pendiente ( $k$ ) de la curva con respecto a las condiciones control (trazos negros).

Sin embargo, la conotoxina sr5a parece afectar la dependencia de voltaje del proceso de inactivación de hNav1.5 obtenidos mediante la evaluación de la disponibilidad de canales abiertos de hNav1.5 tanto en ausencia de sr5a (trazos color negro) como en presencia de sr5a (trazos color rojo). Como podemos observar en la Figura 14B existió un cambio hacia voltajes más negativos de 9.6 mV, sin mostrar cambios en la relación de la pendiente.



**Figura 14. A- Efecto de sr5a en la activación e inactivación de los canales hNav1.5.**

**A-** Relación conductancia voltaje de los canales en ausencia (círculos negros) y en presencia de 400 nM de sr5a (círculos rojos). Los datos experimentales fueron ajustados a una función de Boltzman (líneas continuas). **B-** Curva de inactivación en estado estacionario de hNav1.5. Cada punto en las gráficas corresponde al pico de la corriente de  $I_{Nav}$  normalizada contra el potencial del primer paso del protocolo, en condiciones control (círculos negros) y en presencia de 400nM sr5a (círculos rojos). Cada conjunto de datos fue ajustado a una función de Boltzman (líneas continuas) con los siguientes parámetros (valores de  $V_{1/2}$  y de  $k$ ):  $-91.1 \pm 0.8$  y  $5.9 \pm 0.3$  mV en condiciones control, y  $100.4 \pm 2.7$  y  $6.4 \pm 0.1$  mV en presencia de sr5a.  $P < 0,05$ ; prueba t de Student.

Al comparar la secuencia de aminoácidos entre conotoxinas descritas para la superfamilia T, utilizando la aplicación Clustal W, se muestra que el péptido sr5a no comparte similitudes significantes en la secuencia con respecto a otras conotoxinas de la superfamilia (Figura 15).

```

τ_CnVA          ---ECC-HRQLLCCLRFVNH
μ_Lt5d          ---DCC-PAKLLCC----NP
sr5a           IINWCC-LIFYQCC-----
ε_TxVA          ---ECC--EDGWCCTAAP--
α_TxVC          --KPCCSIHDNSCCGL----
Conorphin-T     ---NCC--RRQICCNH-----
                  **          **

```

**Figura 15.- Alineamiento de secuencias múltiples Clustal W.** Alineamiento de sr5a (negritas) con otras conotoxinas T-1 con diferentes blancos moleculares:  $\tau$ -CnVA (blanco molecular receptor SST3);  $\mu$ -Lt5d (blanco molecular: corrientes sensibles a TTX de sodio);  $\epsilon$ -TxVA (canales de sodio voltaje dependientes *en Aplysia californica*, GPCR);  $\alpha$ -TxVC (RnACh en ratas); Conorfina-T (receptores opioides tipo  $\kappa$ ). Los asteriscos indican los residuos idénticos entre las secuencias.

Se sabe que la conotoxina  $\mu$ -Lt5d bloquea los canales de sodio TTX-sensibles ( $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.6$  y  $Na_v1.7$  aunque no se ha especificado sobre cual muestra más afinidad). Comparando su secuencia con sr5a (Figura 16), podemos observar que no hay similitudes, lo que podría explicar la ausencia de efecto de esta en los canales  $Na_v1.5$ , que claramente son inhibidos por sr5a (Figura 11, Figura 12).

```

sr5a
m_Lt5d
IINWCCLIFYQCC--
--D-CCPAKLLCCNP
: ** **

```

**Figura 16.- Alineación de residuos Clustal W.** Alineación de sr5a (negritas) con  $\mu$ -Lt5d que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a TTX. Los asteriscos indican residuos idénticos entre ambas secuencias. Mientras que los puntos marcan sustituciones conservadas.



## **DISCUSIÓN**

El estudio de las conotoxinas y descubrimiento de sus blancos farmacológicos permite el desarrollo de tratamientos farmacológicos o de herramientas de estudio para canales y/o receptores específicos. Estudiar los componentes de veneno presentes en *C. spurius* contribuye al conocimiento de una especie presente en aguas mexicanas; en específico, el estudio de sr5a en este trabajo permite ampliar el conocimiento de la conotoxina y poder considerarla como una herramienta para el estudio de canales de sodio y poder aislar la respuesta de los diferentes subtipos.

Si bien en este trabajo solo se evaluó el efecto de sr5a sobre tres subtipos de  $Na_v$  que se encuentran en tres tipos de tejido específicos, aún se puede ampliar su estudio, por ejemplo, evaluar el efecto de sr5a sobre otros canales resistentes a TTX ( $Na_v$  1.8,  $Na_v$  1.9) y de esta manera saber si hay más afinidad dentro de los subtipos de canales  $Na_v$  resistentes a TTX; ya que como pudimos comprobar, sobre dos canales sensibles a TTX ( $Na_v$ 1.6 y  $Na_v$ 1.7) no hubo tanta afinidad.

Quizá sr5a pueda estar interactuando con los residuos de aminoácidos que se encuentran en los subtipos específicos resistentes a TTX. Habría que realizar más registros con los otros subtipos de  $Na_v$ s.

De entre todas las conotoxinas estudiadas hasta ahora que ejercen un efecto en los canales de sodio dependientes de voltaje, se han reportado a las  $\mu$ ,  $\mu O$ , y  $\mu-O\delta$  conotoxinas como inhibidoras (Jin *et al.*, 2019; Lewis *et al.*, 2012b; Puillandre *et al.*, 2012), estas

conotoxinas provienen principalmente de caracoles piscívoros. Mientras que las  $\delta$  retardan la inactivación del canal; actúan sobre  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7$ ; y las  $\mu$  incrementan la apertura del canal (de Lera Ruiz y Kraus, 2015; Leipold *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009) actúan sobre los subtipos  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7$   $Na_v1.2$ ; ambas familias de conotoxinas provienen principalmente de caracoles molusquívoros y vermívoros. Como pudimos observar en este trabajo, sr5a se asemeja más al comportamiento de las  $\mu$ -conotoxinas dado que provoca una disminución en la amplitud de  $I_{Na}$ ; algo que también debemos resaltar es que sr5a proviene de un caracol vermívoro, nunca antes se había aislado una  $\mu$  conotoxina de un *Conus* vermívoro.

Además, se ha visto que las  $\mu$ ,  $\mu O$ , y  $\mu-O\delta$  tienen como blanco molecular principalmente  $Na_v$ s resistentes a TTX, mientras que en este estudio se encontró que sr5a tiene afinidad por  $Na_v1.5$  que es resistente a TTX; ampliando las características de la familia farmacológica de las  $\mu$ -conotoxinas.

Otra característica a resaltar, es que las  $\mu$ -conotoxinas llegan a poseer de 11 y hasta 33 residuos de aminoácidos (Prashanth *et al.*, 2014), lo que las convierte en moléculas fáciles de sintetizar químicamente, como lo pudimos constatar en este trabajo. Por otra parte, las  $\delta$  conotoxinas son altamente hidrofóbicas lo que dificulta su síntesis y posterior utilización para evaluación; algo similar ocurre con sr5a, ya que por su hidrofobicidad se tuvo que disolver utilizando 20% de DMSO. Sin embargo, el uso de DMSO no alteró los resultados electrofisiológicos, ya que como pudimos observar, hay diferencias de bloqueo de corriente entre los diferentes subtipos de canal  $Na_v$  ( $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7$ ) evaluados en este trabajo.

Si bien, aún falta determinar el mecanismo de acción entre Sr5a y los canales de sodio  $Na_v1.5$ , podemos conocer, por los resultados obtenidos en este trabajo, que la interacción de sr5a con  $Na_v1.5$  no afecta la activación del canal (Figura 14A); mientras que, para el caso de la inactivación, sr5a facilita la transición de  $Na_v1.5$  a un estado inactivado a potenciales más negativos (hay un desplazamiento del voltaje alrededor de 10 mV; Figura 14B). Lo que estaría significando que el sitio de unión de sr5a en  $Na_v1.5$  podrían estar involucrado con la maquinaria de inactivación voltaje-dependiente del canal  $Na_v1.5$ . A la fecha, no se había documentado que las conotoxinas interfirieran con la dependencia de voltaje de la inactivación (Leipold *et al.*, 2007; L. Liu *et al.*, 2007; McMahon *et al.*, 2020; Munasinghe y Christie, 2015; Stevens *et al.*, 2011). Futuros estudios permitirían esclarecer el mecanismo de acción de sr5a en los canales de sodio voltaje-dependientes  $Na_v1.5$ .

Debido a que hemos demostrado un bloqueo de sr5a en el subtipo  $Na_v1.5$ , podemos nombrarla como  $\mu$ -SrVA conotoxina, por lo que este trabajo contribuye en el conocimiento de los componentes del veneno de *C. spurius*.

## **CONCLUSIONES**

- ❖ Se logró aislar la conotoxina  $\mu$ -SrVA del veneno presente en el caracol marino *C. spurius*.
- ❖ Se evaluó el efecto de la conotoxina  $\mu$ -SrVA sobre los canales  $\text{Na}_v$  expresados en el sistema heterólogo de células HECK-293; donde se observó que  $\mu$ -SrVA modula preferentemente a los canales de sodio dependientes de voltaje  $\text{Na}_v1.5$ .
- ❖ Los resultados del presente trabajo de tesis aportan nuevo conocimiento en el campo de conocimiento del blanco molecular de la conotoxina  $\mu$ -SrVA, la cual modula la corriente de  $\text{Na}_v1.5$  inhibiéndola.

## **PERSPECTIVAS**

- Evaluar SrVA en otros subtipos de  $Na_v$ ; por ejemplo, otros subtipos resistentes a TTX ( $Na_v1.8$  y  $Na_v1.9$ ) para ampliar el conocimiento de la afinidad de esta conotoxina sobre otros subtipos de canales  $Na_v$ .
- Evaluar SrVA en otros subtipos de  $Na_v$  sensibles a TTX.
- Determinar los residuos de aminoácidos que están interactuando con  $Na_v1.5$ .



## The T-1 conotoxin $\mu$ -SrVA from the worm hunting marine snail *Conus spurius* preferentially blocks the human $Na_v1.5$ channel

Angélica Ruelas-Callejas<sup>a</sup>, Manuel B. Aguilar<sup>b</sup>, Rogelio Arteaga-Tlecuitl<sup>c</sup>, Juan Carlos Gomora<sup>c</sup>, Estuardo López-Vera<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología Marina, Unidad Académica de Ecología y Biodiversidad Acuática, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Neurofarmacología Marina, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro 76230, México

<sup>c</sup> Departamento de Neurobiología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 0410, México

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

T-1 superfamily  
Conotoxins  
Sodium channels  
*Conus spurius*

### ABSTRACT

Conotoxin sr5a had previously been identified in the vermivorous cone snail *Conus spurius*. This conotoxin is a highly hydrophobic peptide, with the sequence IINWCLIFVQCC, which has a cysteine pattern "CC-CC" belonging to the T-1 superfamily. It is well known that this superfamily binds to molecular targets such as calcium channels, G protein-coupled receptors (GPCR), and neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) and exerts an effect mainly in the central nervous system. However, its effects on other molecular targets are not yet defined, suggesting the potential of newly relevant molecular interactions. To find and demonstrate a potential molecular target for conotoxin sr5a electrophysiological assays were performed on three subtypes of voltage-activated sodium channels ( $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$ , and  $Na_v1.7$ ) expressed in HEK-293 cells with three different concentrations of sr5a (200, 400, and 600 nM). 200 nM sr5a blocked currents mediated by  $Na_v1.5$  by 33%,  $Na_v1.6$  by 14%, and  $Na_v1.7$  by 7%. The current-voltage (I-V) relationships revealed that conotoxin sr5a exhibits a preferential activity on the  $Na_v1.5$  subtype; the activation of  $Na_v1.5$  conductance was not modified by the blocking effect of sr5a, but sr5a affected the voltage-dependence of inactivation of channels. Since peptide sr5a showed a specific activity for a sodium channel subtype, we can assign a pharmacological family and rename it as conotoxin  $\mu$ -SrVA.

### 1. Introduction

In the last 40 years, there has been a considerable increase in the study of snails of the genus *Conus*, which are marine predators with venoms that contain toxins that have allowed the development of new drugs [1]. These toxins, known as conotoxins (or conopeptides), are generally 10–30 amino acids in length [2]. Conotoxins are classified into gene superfamilies according to the characteristic signal sequence region of each initial peptide translational product, also known as "precursor", which gives rise to the mature toxin [3]. To date, 30 superfamilies have been reported [4,5]. Conotoxins are also classified according to the cysteine frameworks present in the mature toxins [2,6]. Superfamilies include different pharmacological families, which are defined according to their molecular target (e.g., receptor, channel, or

transporter) and their effects on it [6,7].

Each *Conus* species has 100–200 conotoxins in its venom with specific potential molecular targets [1,7,8]. Each one is very specific in terms of its molecular target [6,9,10]. Due to their high specificity, the study of conotoxins is important for the development of tools for the study of ion channels and/or receptors, and pharmacological therapies.

*Conus spurius* is a species that feeds on marine worms. They are distributed mainly in coral reefs or shallow waters from Florida to the Yucatan Peninsula [9,11]. They measure between 5 and 7.5 centimeters and have a characteristic white cone-shaped shell with orange or brown spots. To date seven peptides have been characterized from the venom of specimens of this snail [11–19], whereas others have been identified by RT-PCR or transcriptomic analyses [20,21]. The peptides characterized at the protein level belong to five superfamilies: the conorfamides [12,

\* Correspondence to: Marine Toxicology Laboratory, Marine and Limnology Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México City 04510, México.

E-mail address: [vera@ciomar.unam.mx](mailto:vera@ciomar.unam.mx) (E. López-Vera).

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170859>

Received 16 June 2022; Received in revised form 1 August 2022; Accepted 2 August 2022

Available online 5 August 2022

0196-9781/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

15,18], the A- [17], O1- [19], I2- [11], and T-superfamilies [14], whereas those distinguished at the nucleic acid level belong to T-; M-; A-, O-superfamilies and Con-ikot-ikot [21].

The T-superfamily is divided into two groups, according to the arrangement of cysteine residues. The T-1 conotoxins have two pairs of cysteines separated by 4–6 amino acids (CC-CC); the bridges are formed between cysteines I-III, and II-IV. The T-2 conotoxins also have four cysteines, but with one pair of adjacent cysteines and the other separated by two amino acids (CC-C-C); the bridges are formed between cysteines I-IV and II-III [3,22].

Conotoxins belonging to the T-1 superfamily have shown a physiological effect after intracranial injection in mice [14,23,24], and fish [24]. Furthermore, some T-1 superfamily conotoxins have a somewhat defined target: TxVA reduces presynaptic  $Ca^{2+}$  influx either by targeting a *Aplysia californica*  $Ca^{2+}$  channel or a GPCR [23]; Lt5d inhibits tetrodotoxin-sensitive  $Na^+$  currents in rat DRG neurons [25];  $\tau$ -CnVA displays a micromolar antagonist property for the human *sst3* receptor [26]; Conorphin-T acts as an agonist of human  $\kappa$ -opioid receptors [27], and TxVC selectively targets the  $\alpha_4\beta_2$  and  $\alpha_5\beta_2$  subtypes of rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) [28].

In this study, we demonstrate for the first time a potential molecular target of conotoxin sr5a belonging to the T-1 superfamily. The conotoxin was found to decrease the currents of  $Na_v1.5$  voltage-activated sodium channels but not of the  $Na_v1.6$  and  $Na_v1.7$  subtypes. The results revealed a new molecular target subtype for this particular members of the T-superfamily. Thus, we renamed peptide sr5a as conotoxin  $\mu$ -SrVA.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Synthetic conotoxin sr5a

Previously, conotoxin sr5a from *C. spurius* was isolated and characterized at the levels of primary structure, disulfide connectivity, and biological activity in mice by Aguilar and cols., 2006 [14]. However, due to the limited availability of native sr5a, we used a synthetic toxin to conduct our experiments. Conotoxin sr5a was chemically synthesized by Peptide 2.0 Inc, with a purity (HPLC) of 95.36 %. The synthetic conotoxin was dissolved in 20 % of dimethyl sulfoxide (DMSO) as stock, since conotoxin sr5a is a highly hydrophobic peptide (IINWCCILFVQCC).

### 2.2. Quantification of conotoxin sr5a

We calculated the concentration of the toxin in 20 % of DMSO, by relating the area under the curve obtained by RP-HPLC for 5 nmol of the synthetic  $\alpha$ -conotoxin RgIA (which has 14 amino acids in length, the same as sr5a), with respect to the area obtained for sr5a.

### 2.3. Prediction of molecular target

The probable effects of toxin sr5a on ion channels was predicted using the ICTX-Type [29,30].

### 2.4. Sequence alignment

Multiple sequence alignments were performed using Clustal W 1.8 [31] at the PRABI-Gerland Rhone-Alpes Bioinformatic Pole Gerland Site, Institute of Biology and Protein Chemistry [32], with the default parameters [33].

### 2.5. Cell culture and transfection

HEK-293 cells were grown in DMEM/F12 mixture supplemented with 10 % FBS, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin at 37 °C with 5 %  $CO_2$ . Transient transfections were performed with PEI (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) in 35-mm dishes, according to the

manufacturer's protocol. HEK-293 cells were transfected with 1.5  $\mu$ g of human cDNA  $Na_v1.5$  (GenBank accession #M77235); rat cDNA  $Na_v1.6$  (GenBank #AF049239); rat cDNA  $Na_v1.7$  (GenBank #U79568), along with the cDNA of GFP as a reporter gene. Cells were dissociated 24–72 h after transfection and plated on coverslips for electrophysiological experiments.

### 2.6. Electrophysiology

For the evaluation of the sr5a conotoxin effect on sodium channel expressed in HEK-293 cells, whole-cell patch-clamp currents were recorded at room temperature (21–23 °C) following the methods as described before [34]. Briefly, sodium currents were obtained by using an Axopatch 200B amplifier, a Digidata1322a A/D converter, and pCLAMP 9.4 software (Molecular Devices, LLC). Currents were digitalized at 20 kHz analog filtering. Whole-cell series resistance and cell capacitance were estimated from optimal cancellation of the capacitive transients with the built-in circuitry of the amplifier and in some cases was compensated electrically by 60–70 %. External solution composition was as follows (in mM): 158 NaCl, 2  $CaCl_2$ , 2  $MgCl_2$ . Borosilicate glass pipettes (WPI Inc.) with resistances of 2–3 M $\Omega$  were filled with an internal solution containing (in mM): 117 CsF, 30 NaCl, 1  $CaCl_2$ . Both solutions contained also 10 HEPES and were adjusted to pH 7.3 with NaOH. Because of the low availability of the sr5a peptide, recordings to test its blocking effect on sodium current were performed by local application of the toxin to the recording chamber. Peptide sr5a was dissolved in DMSO with maximal concentration of 0.060 % in the recording chamber, which in most of the cells tested did not alter the current amplitude. Electrophysiological assays were performed at: 200, 400, and 600 nM of the conotoxin, on HEK-293 cells.

Voltage-gated sodium currents were evoked by 16-ms depolarizing pulses to 0 mV from a holding potential of –100 mV applied every 10 s. Current amplitudes were normalized to cell capacitance and expressed as current density (pA/pF). Normalized activation curves (conductance vs. voltage) of  $Na^+$  channels were fitted with a Boltzmann function:  $G = G_{max}/(1 + \exp(-(V_m - V_{1/2})/k))$ , where  $G_{max}$  is the maximum  $Na^+$  conductance;  $V_m$  is the test potential,  $V_{1/2}$  is the mid-point of activation, and  $k$  is the slope factor. The voltage-dependence of steady-state inactivation of  $Na^+$  currents was also described with a single Boltzmann function:  $I = I_{max}/(1 + \exp((V_m - V_{1/2})/k))$ , where  $I_{max}$  is the maximal current,  $V_{1/2}$  is the half-maximal sodium current, and  $k$  is the slope. All quantitative results are given as the mean + standard error (SEM).

### 2.7. Statistical analysis

Statistical significance was determined using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons by using  $Na_v1.5$  as a control group. \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Synthesis of sr5a

Peptide sr5a was chemically synthesized with the final product being 95.36 % pure. The chemical purity of the final product was confirmed by HPLC (Fig. 1) with a gradient of 5–95 of solution B (90 %ACN, 0.085 % TFA) for 95 min at a flow rate of 1 ml per minute. The mass spectrum displays a major  $m/z$  809.6 monoisotopic signal that corresponds to a mass of 1617.20 Da (data not shown); these values agrees well with the theoretical monoisotopic mass of 1616.68 Da.

### 3.2. Molecular target identification for sr5a

T-1 conotoxins have shown an effect on the central nervous system (CNS) of different organisms such as fish, molluscs, and mice; in particular, sr5a elicited different behaviors on 9-day and 16-day old

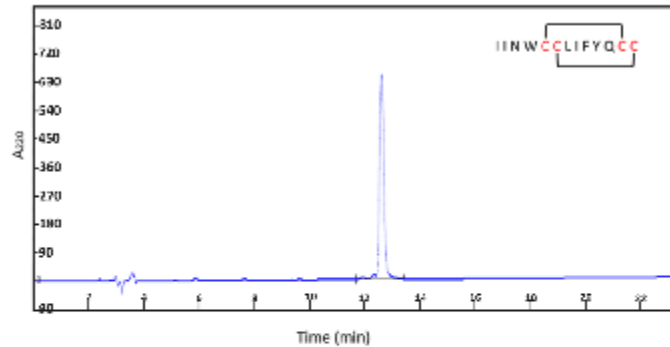


Fig. 1. Reversed-phase HPLC chromatogram of synthetic sr5a. The insert shows the sequence of amino acids residue of sr5a and the connectivity of its cysteine residues (disulfide bonds). The standard one-letter code is employed for amino acids.

mice upon intracranial injections [14]. However, no specific molecular target for the T-1 conotoxin sr5a has been reported to date.

Consequently, we predicted the type of molecular target of toxin sr5a by means of iCTX-Type, a sequence-based predictor for identifying the types of ion channels targeted by conotoxins [30,35], available online [29]. This analysis yielded a 0.75 probability that this peptide targets  $\text{Na}^+$  channels, followed by 0.23 for  $\text{Ca}^{2+}$  channels, and 0.01 for  $\text{K}^+$  channels (data not shown).

Therefore, we tested sr5a on three subtypes of voltage-gated sodium

channels hNa<sub>v</sub>1.5, rNa<sub>v</sub>1.6, and rNa<sub>v</sub>1.7.

The effect of 200 nM sr5a on sodium current ( $I_{\text{Na}}$ ) amplitudes are summarized in Fig. 2. Sodium currents were evoked by 16-ms depolarizations to  $-10$  mV applied every 10 s to patch-clamped HEK-293 cells transfected with hNa<sub>v</sub>1.5, rNa<sub>v</sub>1.6, or rNa<sub>v</sub>1.7 channels. Panels A, B, and C show representative traces in the absence (control, C) and the presence of 200 nM sr5a in the recording chamber for each indicated channel. It can be noted that sr5a inhibits the current carried by hNa<sub>v</sub>1.5 channels more strongly than that from rNa<sub>v</sub>1.6 and rNa<sub>v</sub>1.7 channels.

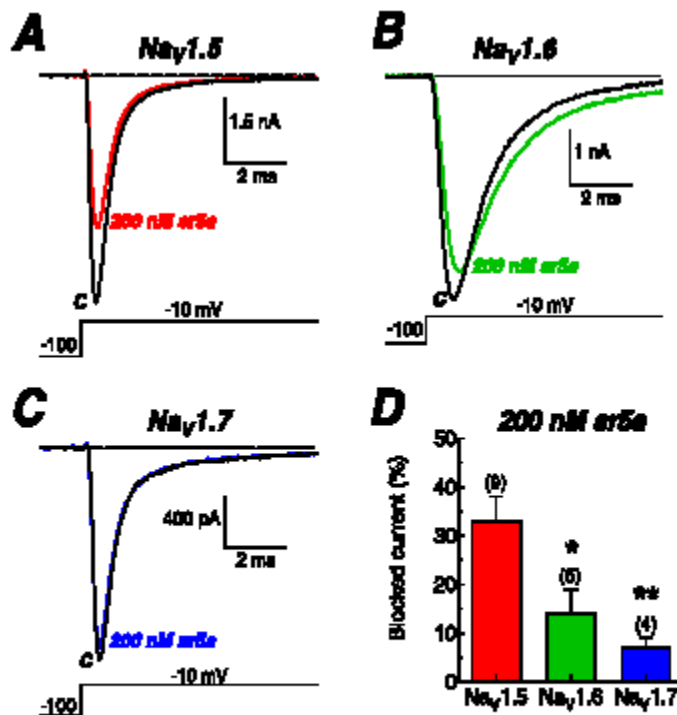


Fig. 2. Inhibition of voltage-activated sodium channels currents by sr5a. Representative recordings showing stationary inhibition by 200 nM of sr5a on hNa<sub>v</sub>1.5 (A), rNa<sub>v</sub>1.6 (B), and rNa<sub>v</sub>1.7 (C) currents. Whole-cell patch-clamp recordings were made from channels transiently expressed in HEK-293 cells. Currents were evoked by voltage steps to  $-10$  mV from a holding potential of  $-100$  mV applied every 10 s. Current traces are averages of three consecutive recordings for each condition. The dotted line represents zero current level. D. Reduction in  $I_{\text{Na}}$  amplitude by 200 nM sr5a at  $-10$  mV for hNa<sub>v</sub>1.5, rNa<sub>v</sub>1.6, rNa<sub>v</sub>1.7 channel subunits. Data represents mean  $\pm$  SEM of the number of cells indicated between parentheses. Statistical significance when using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons by using Na<sub>v</sub>1.5 as a control group: \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$ .



The quantitative analysis of these current recordings is shown in the bar graph on panel D. The sr5a conotoxin blocked  $33 \pm 5\%$  of hNav1.5 channel sodium current, whereas the same concentration of conotoxin in the rNav1.6 subtype caused a current blockage of  $14 \pm 5\%$  and only  $7 \pm 2\%$  of the current carried by the rNav1.7 isoform.

In order to understand the changes in the amplitude of the current at different concentrations of the conotoxin sr5a; two additional doses of sr5a, 400, and 600 nM were administered sequentially during electrophysiological recordings (Fig. 3A and B, respectively). On the one hand it was observed that the sr5a toxin maintained a preferential block on the current of hNav1.5 channel increasing up to 50% with a concentration of 400 nM. On the other hand, the same concentration on the rNav1.6 channel subtype increased the blocked current from 14% to 19%, while increasing the blockade from 7% to 19% on the rNav1.7 subtype.

Furthermore, the effect of toxin sr5a on the biophysical properties of hNav1.5 channels, including the current-voltage relationship, and the voltage-dependence of activation and inactivation, were evaluated in the absence and the presence of 400 nM sr5a, which, as stated above, inhibits around 50% of the sodium current. As shown in Fig. 4, the magnitude of sodium current inhibition was very similar at most tested potentials (from  $-60$  to  $+90$  mV), suggesting that sr5a does not interfere with the voltage-dependence of activation. This observation was further analyzed with the conductance curve of the hNav1.5 channel (Fig. 5A). Fitting of conductance data points with the Boltzmann function indicates that during the activation of Nav1.5, conductance was not significantly modified by the blocking effect of sr5a, as shown by the averaged values of half-activation voltage ( $V_{1/2}$ ) and the slope of the relationship ( $k$ ) for both experimental conditions.

In contrast, the sr5a conotoxin affected the voltage-dependence of inactivation of hNav1.5 channels. Availability of Nav channels was assessed by a classical two-pulse voltage clamp protocol. The first step was a 200-ms prepulse to voltages between  $-140$  and  $-60$  mV intended to promote the transition to the steady-state inactivation of channels. The second step was a brief test pulse to  $-10$  mV to measure the fraction of  $I_{Na}$  that was not inactivated during the prepulse. Channel availability was calculated by normalizing the current at  $-10$  mV for each prepulse potential. The midpoint ( $V_{1/2}$ ) of the voltage-dependence of inactivation was shifted 9.6 mV to more negative potentials (Fig. 5B), without changes in the slope of the relationship. There were no changes either in the inactivation kinetics of the current in the presence of the toxin ( $0.71 \pm 0.06$  ms for control, and  $0.83 \pm 0.1$  ms for sr5a;  $n = 6$ ;  $P > 0.05$ ; Fig. 2A). Interestingly, window currents were reduced by sr5a (Fig. 5C). The fraction of hNav1.5 channels available for opening at  $-70$  mV was reduced by 66% in the presence of 400 nM sr5a, as indicated by the steady-state inactivation curves. Because we did not explore the activation of the sodium current at potentials more negative than  $-60$  mV, the actual region of the window current could not be

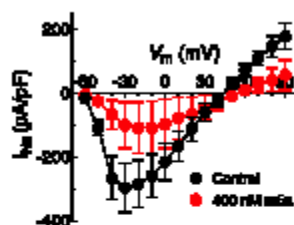


Fig. 4. Effect of sr5a in the current-voltage ( $I$ - $V$ ) relationship of hNav1.5 channels. Data points show average peak current density at each potential. Black symbols are control and red symbols are experimental conditions with sr5a conotoxin. Currents were obtained as in Fig. 2, in this case from  $-60$  to  $+90$  mV in 10 mV steps from a holding potential of  $-100$  mV. Current amplitudes were normalized by cell capacitance to obtain current density values.

drawn, however the observation of channel availability from inactivation curves leads to the prediction that sr5a shifted the window current region to more negative potentials and reduced the size of the region significantly.

#### 4. Discussion

Previously, Aguilar et al. [14] reported the purification and characterization of the primary structure and disulfide connectivity of conopeptide sr5a and its effects when injected intracranially into mice: extension of the body and turns for 2-4 min in 9-day-old animals, and depressed activity for 15-19 min and agitated respiration in 16-day-old mice. However, they did not identify the molecular target of the conotoxin and aside from these pharmacological properties no more is known about sr5a. In the present study, we provide evidence of the selective effect of conotoxin sr5a on the hNav1.5 voltage-activated sodium channels subtype.

It is known that conotoxins belonging to the T-1 group of the T-superfamily affect several distinct targets: calcium channels or G protein-coupled receptors (*Aplysia californica*) [23]; G protein-coupled receptors (human, somatostatin str3R) [26], voltage-gated sodium channels (rat TTX-resistant and TTX sensitive) [25],  $\kappa$  opioid receptors (agonist) (mouse) [27], and acetylcholine receptors (rat  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 2$ ) [28], and thus the potential discovery of new molecular targets types or subtypes in this superfamily cannot be ruled out. A Clustal W multiple sequence alignment indicates that peptide sr5a shares no significant sequence similarity with any of these peptides (Fig. 6).

However, the analysis by the iCTX-Type predictor yielded a 0.75 probability that this peptide targets Na<sup>+</sup> channels, followed by 0.23 for Ca<sup>2+</sup> channels, and 0.01 for K<sup>+</sup> channels. Therefore, we focused on the

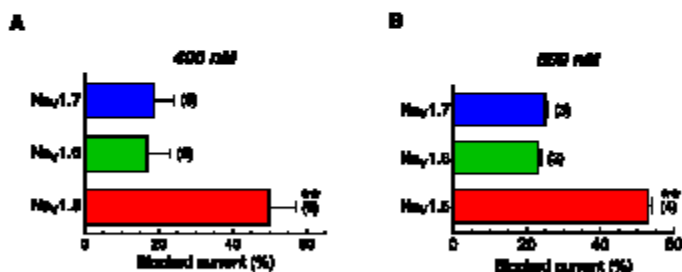
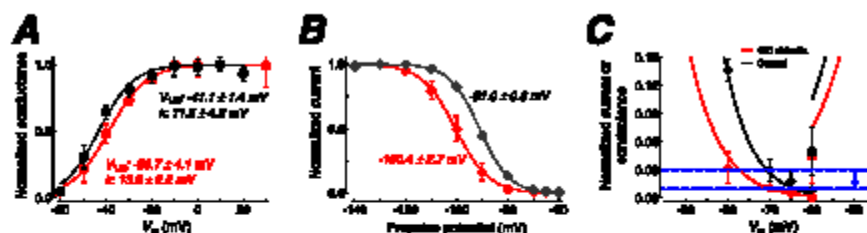


Fig. 3. Higher concentrations of sr5a conotoxin also block preferentially currents from hNav1.5 channels. Effect on  $I_{Na}$  amplitude by 400 (A) and 600 (B) nM sr5a at  $-10$  mV for hNav1.5, rNav1.6, and rNav1.7 channel subunits. Data represents mean  $\pm$  SEM of the number of cells indicated between parentheses. Statistical significance when using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons against rNav1.6 and rNav1.7 ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 5.** Effects of sr5a on hNav<sub>1.5</sub> channel gating. **A**, Normalized chord conductance relationships for hNav<sub>1.5</sub> channels in the absence (Control, black symbols) and the presence of 400 nM sr5a (red symbols). Experimental points were fitted to a Boltzmann function (smooth lines). **B**, Steady-state inactivation curves. Data points were obtained by plotting the normalized peak Na<sup>+</sup> current at -10 mV against the prepulse potential in Control (black symbols) and sr5a (red symbols) experimental conditions. Each data set was fit to a Boltzmann function (smooth lines) with the following parameters ( $V_{1/2}$  and  $k$  values):  $-91 \pm 0.8$  and  $5.9 \pm 0.3$  mV for control, and  $-100.4 \pm 2.7$  and  $6.4 \pm 0.1$  mV for sr5a conditions. The  $V_{1/2}$  for 50% of channel availability ( $V_{1/2}$ ) was shifted around 9 mV ( $P < 0.05$ ; Student's  $t$ -test) to more negative potentials in the presence of the sr5a toxin. **C**, Voltage-dependent activation (lines originating from -60 mV) and steady-state inactivation curves (lines ending at -60 mV) for hNav<sub>1.5</sub> channels in the absence and presence of 400 nM sr5a. Same data and fits from panels A and B, which have been enlarged for clarity purposes. Even though there is no overlapping area between activation and inactivation curves due to the lack of activation data at more negative potentials than -60 mV, it can be predicted that sr5a shifted the window current region to more negative potentials and reduced the size of the region significantly, as the availability of the channels was reduced from 3% to 1% at -70 mV (inactivation curves).



**Fig. 6.** Clustal W multiple sequence alignment of conopeptide sr5a (boldface) with other T-1 conotoxins affecting distinct molecular targets:  $\tau$ -CaVA, hst3R;  $\mu$ -Lt5d rat tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> currents;  $\sigma$ -TxVa, *Aplysia californica* voltage-gated calcium channels or GPCR;  $\alpha$ -TxVc, rat neuronal nAChR; and conorphin-T, human  $\tau$ -opioid receptors. Asterisks indicate identical residues among all the sequences.

Nav<sub>1.5</sub> subtypes and we found that sr5a is selective for the cardiac subtype Nav<sub>1.5</sub> compared to the neuronal subtypes Nav<sub>1.6</sub> and Nav<sub>1.7</sub> (Fig. 2 and Fig. 3).

$\mu$ -Lt5d blocks TTX-sensitive Nav channels (Nav<sub>1.1</sub>, Nav<sub>1.2</sub>, Nav<sub>1.6</sub> and Nav<sub>1.7</sub>) and its low sequence similarity might explain its lack of effect on Nav<sub>1.5</sub>, which is clearly inhibited by conopeptide sr5a (Fig. 7).

Among all the conotoxins studied so far that exert an effect on Nav<sub>1</sub>, it has been reported that  $\mu$ ,  $\mu$ O, and  $\mu$ -O $\delta$  conotoxins are channel inhibitors [1,10,36]; these conotoxins are derived mainly from piscivorous and molluscivorous cone snails. In contrast,  $\delta$ -conotoxins delay channel inactivation, and  $\tau$ -conotoxins increase channel opening [37–39]. These latter conotoxins have been discovered from piscivorous, molluscivorous, and vermivorous snails.

$\mu$ -conotoxins belong to the M-superfamily [10] and have an effect on the neuronal sodium channel subtypes Nav<sub>1.1</sub>, Nav<sub>1.2</sub>, and Nav<sub>1.3</sub>, but they are not selective for a specific subtype [40]. Conversely, the  $\mu$ O-conotoxins belonging to the O-superfamily are specific for Nav<sub>1.4</sub>, Nav<sub>1.7</sub>, and Nav<sub>1.8</sub> channel isoforms [41,42]; these channels are distributed in the peripheral nervous system and the skeletal muscles [1, 43].  $\mu$ O- $\delta$  GVILJ inhibits all TTX-sensitive subtypes (Nav<sub>1.1</sub>, Nav<sub>1.2</sub>; Nav<sub>1.3</sub>; Nav<sub>1.4</sub>; Nav<sub>1.6</sub>; Nav<sub>1.7</sub>) [44]. In this study, we found that sr5a



**Fig. 7.** Clustal W pairwise sequence alignment of conopeptide sr5a (boldface) with  $\mu$ -Lt5d that blocks rat tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> currents. Asterisks indicate identical residues among both sequences, whereas colons denote conservative substitutions.

conotoxin preferentially blocks the Nav<sub>1.5</sub> subtype, which is the main source for electrical excitability of cardiac muscle and, more recently, has been associated with the metastatic behavior of several epithelial cancers [45].

Conotoxins targeting Na<sub>v</sub> sodium channels are characterized by having 11–33 amino acid residues [46], which makes it relatively easy to chemically synthesize them. However, the  $\delta$ -conotoxins are highly hydrophobic proteins, resulting in a more complicated synthesis procedure and subsequent biological evaluation. Something similar occurred with our sr5a conotoxin since, due to its hydrophobicity, it needed 20% DMSO to be completely dissolved. Fortunately, the use of DMSO did not inhibit the current amplitude of the three Nav<sub>s</sub> studied here, under the experimental conditions specified in Section 2. However, the mechanism of action of sr5a on the Nav<sub>1.5</sub> current inhibition remains to be determined.

Our results suggest that the voltage-dependence of channel activation is not affected (Fig. 5A); in contrast, sr5a facilitates the transition of Nav<sub>1.5</sub> channels to the inactivated state at more negative potentials (around 10 mV; Fig. 5B). This finding might imply that the binding site of sr5a on the channel protein could be interacting with the voltage-dependent inactivation machinery of Nav<sub>1.5</sub> channel. To date, this likely interaction of conotoxin with Nav channels that inhibits them has not been documented [25,41,47–49]. Further studies are needed to fully clarify the action of sr5a on Nav<sub>s</sub>, and in Nav<sub>1.5</sub> channel in particular. An interesting effect of sr5a was the decrease in the predicted window potential of hNav<sub>1.5</sub> channels, which suggests reduced Na<sup>+</sup> influx at potentials close to the resting membrane potential of many neurons (-70 to -60 mV), and more importantly that the reduction in channel availability induced by sr5a might inhibit the excitability of the cells.

In terms of venom derived from *Conus* species, 80 sequences of conotoxin precursors have been identified [21]. Only 55 were assigned to superfamilies [21]. Seven conopeptides have been characterized biochemically and/or electrophysiologically [11,12,15,17,18]. Since we demonstrated specific blocking of sr5a on Nav 1.5 ion channels, we can rename it as  $\mu$ -SrVA conotoxin and thus, these results are contributing to the knowledge of the venom components of the marine snail *Conus* species.

**CRedit authorship contribution statement**

Estuardo López-Vera devised the project. Angélica Ruelas-Callejas and Rogelio Arteaga-Iteucuit performed the experimental part. Estuardo López-Vera and Manuel B. Aguilar wrote the article. Juan Carlos Gomora analyzed the electrophysiology results, and review and

commented on the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

#### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

This study was supported by Grant IN209820 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-DGAPA-UNAM) to J.C.G. Grants 153915 and A1-S-19171 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to E.L.-V., and J.C.G., respectively. To UNAM Institutional Budgets to the Laboratorio de Toxicología Marina (615), Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, and Laboratorio de Neurofarmacología Marina (406), Instituto de Neurobiología. Angélica Ruelas-Callejas is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received a CONACYT Fellowship (261782). We thank Michael C. Jezorski for editing the manuscript.

#### References

- A.H. Jin, M. Mottenhauer, S. Dutertre, S.W.A. Himaya, Q. Kass, D.J. Craik, R. J. Lewis, P.F. Alewood, Conotoxins: chemistry and biology, *Chem. Rev.* 119 (21) (2019) 11510–11549, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00207>.
- B.M. Olvera, J. Rivier, J. Scott, D.R. Hilliard, L. Cruz, Conotoxins, *J. Biol. Chem.* 266 (33) (1991) 22067–22070.
- S.D. Robinson, R.S. Norton, Conotoxin gene superfamilies, *Mar. Drugs* 12 (12) (2014) 6058–6101, <https://doi.org/10.3390/md12126058>.
- ConoServer [WWW Document], (<http://www.conoserver.org/?page=classification&type=genesuperfamilie>), (Accessed 25 April 2022).
- Q. Kass, J.C. Westermann, D.J. Craik, Concept peptide characterization and classification: an analysis using ConoServer, *Toxicol. Sci.* 85 (8) (2010) 1491–1509, <https://doi.org/10.1093/toxsci/1010.03.002>.
- H. Terlau, B.M. Olvera, Conus Venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides, *Physiol. Rev.* 84 (1) (2004) 41–68, <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2003>.
- B.M. Olvera, L.J. Cruz, Conotoxins in retrospect, *Toxicol. Sci.* 39 (1) (2001) 7–14, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00157-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00157-4).
- B.M. Olvera, Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology, *Mol. Biol. Cell* 8 (11) (1997) 2101–2109, <https://doi.org/10.1091/mbc.8.11.2101>.
- B. Gao, C. Peng, J. Yang, Y. Yi, J. Zhang, Q. Shi, Cone snails: a big store of conotoxins for novel drug discovery, *Toxins* 9 (12) (2017) 1–18, <https://doi.org/10.3390/toxins9120397>.
- R.J. Lewis, S. Dutertre, I. Vetter, M.J. Christie, Conus venom peptide pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 64 (2) (2012) 259–298, <https://doi.org/10.1124/pr.111.005322>.
- M.B. Aguilar, E. López-Vera, E.P.H. de la Cotera, A. Falcón, B.M. Olvera, M. Mailló, I-conotoxins in venomous species of the West Atlantic: peptide  $\pi$ 11a from *Conus apurus*, *Peptides* 28 (1) (2007) 18–23, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.024>.
- M.B. Aguilar, K. Luna-Ramírez, D. Echeverría, A. Falcón, B. Olvera, E. Heimer de la Cotera, M. Mailló, Conorfamide-8r2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from venom of *Conus apurus* with activity in mice and mollusks, *Peptides* 29 (2) (2008) 186–195, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.022>.
- M.B. Aguilar, L.I. Pérez-Reyes, Z. López, E.P.H. de la Cotera, A. Falcón, C. Ayala, M. Galvín, C. Salvador, L.I. Escobar, Peptide  $\pi$ 11a from *Conus apurus* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels, *Peptides* 31 (7) (2010) 1287–1291, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.04.007>.
- M.B. Aguilar, L. Lezama-Morfil, M. Mailló, H. Pedraza-Lara, E. López-Vera, E. P. Heimer De La Cotera, A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus apurus*, *Peptides* 27 (3) (2006) 500–505, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.020>.
- E. Campos-Lira, E. Carrillo, M.B. Aguilar, J. Gajewiak, F. Gómez-Lagunas, E. López-Vera, Conorfamide-8r3, a structurally novel specific inhibitor of the Shaker K<sup>+</sup> channel, *Toxicol. Sci.* 138 (2017) 53–58, <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.07.024>.
- E. López-Vera, I. Martínez-Hernández, M.B. Aguilar, E. Carrillo, J. Gajewiak, Studies of conorfamide-8r3 on human voltage-gated Kv1 potassium channel subtypes, *Mar. Drugs* 18 (8) (2020) 1–7, <https://doi.org/10.3390/MD18080425>.
- E. López-Vera, M.B. Aguilar, E. Schiavon, C. Marini, E. Ortiz, R. Restano Casanini, C.V.F. Batista, L.D. Pousari, E.P. Heimer De La Cotera, F. Pent, B. Becerril, E. Wank, Novel 8-conotoxins from *Conus apurus* and the 8-conotoxin II share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, *FEBS J.* 274 (15) (2007) 3972–3985, <https://doi.org/10.1111/j.1365-4658.2007.05931.x>.
- M. Mailló, M.B. Aguilar, E. López-Vera, A.G. Craig, G. Bala, B.M. Olvera, E. P. Heimer De La Cotera, Conorfamide, a *Conus venosus* peptide belonging to the Ifamide family of neuropeptides, *Toxicol. Sci.* 40 (4) (2002) 401–407, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00178-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00178-3).
- K.S. Luna-Ramírez, M.B. Aguilar, A. Falcón, E.P. Heimer de la Cotera, B.M. Olvera, M. Mailló, An O-conotoxin from the venomous *Conus apurus* active on mice and mollusks, *Peptides* 28 (1) (2007) 24–30, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.025>.
- R. Zamora-Bustillos, M.B. Aguilar, A. Falcón, E.P. Heimer de la Cotera, Identification, by RT-PCR, of four novel T-1-superfamily conotoxins from the venomous snail *Conus apurus* from the Gulf of Mexico, *Peptides* 30 (8) (2009) 1396–1404, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.003>.
- R. Zamora-Bustillos, M.A. Martínez-Núñez, M.B. Aguilar, R.C. Goll-Duis, D. A. Brito-Domínguez, Identification of novel conotoxin precursors from the cone snail *Conus apurus* by high-throughput RNA sequencing, *Mar. Drugs* 19 (10) (2021) 547, <https://doi.org/10.3390/md19100547>.
- B.M. Olvera, Conus venom peptides: reflections from the biology of clades and species, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33 (2002) 25–47, <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150454>.
- A.C. Bigby, E. Lucas-Menzies, D.E. Kalsame, E. Czarwiec, B. Hambe, I. Dabilyrist, F. Fontana, G. Baux, P. Roesportoff, J.D. Bala, E.C. Paris, B. Paris, J. Stenflo, A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (10) (1999) 5758–5763, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5758>.
- C.S. Walker, D. Steel, R.R. Jacobsen, M.B. Liras, L.J. Cruz, D. Hooper, R. Shetty, R.C. Delacruz, J.S. Nielsen, L.M. Zhou, P. Bandhyopadhyay, A.G. Craig, B. M. Olvera, The T-superfamily of conotoxins, *J. Biol. Chem.* 274 (43) (1999) 30664–30671, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30664>.
- J. Liu, Q. Wu, C. Pi, Y. Zhao, M. Zhou, L. Wang, S. Chen, A. Xu, Isolation and characterization of a T-superfamily conotoxin from *Conus literatus* with targeting tetrodotoxin-sensitive sodium channels, *Peptides* 28 (12) (2007) 2313–2319, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.006>.
- C. Fretwell, H.G. Hocking, M. Reynolds, G. Upreti, P. Fournier, D. Blass, M. Paolini-Bertrand, S. Feigenson, J. Tytgat, N. Gillis, O. Hartley, R. Bodlens, R. Stocklin, D. Servent, Identification, structural and pharmacological characterization of T-6VA, a conopeptide that selectively interacts with  $\alpha$ 1B subunit of NMDA receptor, *Biochem. Pharmacol.* 85 (11) (2013) 1663–1671, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.019>.
- A. Brust, D.E. Croker, B. Collins, L. Ragsvaran, Å. Andersson, K. Jain, S. Garcia-Caraballo, J. Castro, S.M. Brinley, P.F. Alewood, R.J. Lewis, Conopeptide-derived  $\alpha$ -opioid agonists (Conorphins): potent, selective, and metabolically stable dynorphin A mimetics with antinociceptive properties, *J. Med. Chem.* 59 (6) (2016) 2381–2395, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b09011>.
- S. Wang, T. Du, Z. Liu, S. Wang, Y. Wu, J. Ding, L. Jiang, Q. Dai, Characterization of a T-superfamily conotoxin TxVC from *Conus textile* that selectively targets neuronal nAChR subtypes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454 (1) (2014) 151–156, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.055>.
- ICTX-Type [WWW Document], (<http://lin-group.cn/server/ICTX-Type>), (Accessed 25 April 2022).
- H. Ding, E.Z. Deng, L.F. Yuan, L. Liu, H. Lin, W. Chen, K.C. Ghos, ICTX-type: a sequence-based predictor for identifying the types of conotoxins in targeting ion channels, *BioMed Res. Int.* (2014) 1–10, <https://doi.org/10.1155/2014/286418>.
- J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (22) (1994) 4673–4680, <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- NPS@: CLUSTALW multiple alignment, ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_nstomat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_nstomat.pl?page=npsa_clustalw.html)), (Accessed 13 June 2022).
- C. Combet, C. Haaschet, C. Geourjon, G. Delagoutte, NPS@: network protein sequence analysis, *Trends Biochem. Sci.* 25 (3) (2000) 147–150, [https://doi.org/10.1016/S0966-0054\(99\)01540-5](https://doi.org/10.1016/S0966-0054(99)01540-5).
- R. Arteaga-Tiencuil, A.L. Sanchez-Sandoval, B.E. Ramirez-Cordero, M.J. Rosendo-Finada, L. Vaca, J.C. Gonzalez, Increase of CaV3 channel activity induced by HVA  $\beta$ 1b-subunit is not mediated by a physical interaction, *BMC Res. Notes* 11 (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3917-1>.
- L.F. Yuan, C. Ding, S.H. Guo, H. Ding, W. Chen, H. Lin, Prediction of the types of ion channel-targeted conotoxins based on radial basis function network, *Toxicol. Viir.* 27 (2) (2013) 852–856, <https://doi.org/10.1016/j.tv.2012.12.024>.
- N. Pullandren, D. Kosa, P. Fournier, B.M. Olvera, R. Stocklin, Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides, *J. Mol. Evol.* 74 (2012) 297–309, <https://doi.org/10.1007/s00239-012-9507-2>.
- M. De Lencastre, R.L. Kraus, Voltage-gated sodium channel: structure, function, pharmacology, and clinical indications, *J. Med. Chem.* 58 (18) (2015) 7093–7118, <https://doi.org/10.1021/jm501981g>.
- E. Leipold, A. Hensel, B.M. Olvera, H. Terlau, H. Heinemann, Molecular interaction of 8-conotoxins with voltage-gated sodium channels, *FEBS Lett.* 579 (18) (2005) 3881–3884, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.077>.
- L. Wang, J. Liu, C. Pi, X. Zeng, M. Zhou, X. Jiang, S. Chen, Z. Ren, A. Xu, Identification of a novel M-superfamily conotoxin with the ability to enhance tetrodotoxin sensitive sodium currents, *Arch. Toxicol.* 83 (2009) 925–932, <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0453-4>.



- [40] O. Knapp, J.R. McArthur, D.J. Adams, Conotoxins targeting neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: potential analgesics? *Toxins* 4 (11) (2012) 1236–1260, <https://doi.org/10.3390/toxins4111236>.
- [41] E. Leitold, H. de Bie, S. Zorn, A. Borges, B.M. Olivera, H. Terlau, S.H. Heinemann,  $\mu$ -Conotoxins inhibit Nav channels by interfering with their voltage sensors in domain-2, *Channels* 1 (4) (2007) 253–262, <https://doi.org/10.4161/chas.4047>.
- [42] I. Vetter, Z. Dekan, O. Knapp, D.J. Adams, P.F. Alewood, R.J. Lewis, Isolation, characterization and total regioselective synthesis of the novel  $\mu$ -conotoxin MIVIA from *Conus* *resurgens* that targets voltage-gated sodium channels, *Biochem. Pharmacol.* 84 (4) (2012) 540–548, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.05.008>.
- [43] J.M. McIntosh, A. Hanson, M.E. Spira, W.R. Gray, W. Li, M. Marsh, D.R. Hilliard, B. M. Olivera, A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels, *J. Biol. Chem.* 270 (28) (1995) 16796–16802, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16796>.
- [44] J. Gajewiak, L. Azam, J. Imperial, A. Walewska, R.R. Green, P.K. Bandyopadhyay, S. Raghuraman, R. Ueberholz, M. Bern, H.M. Zhou, N.A. Minassian, R.H. Hagan, M. Hingspach, Y. Liu, G. Bujak, A.D. Wickenden, B.M. Olivera, D. Yoshikami, M. M. Zhang, A disulfide tether stabilizes the block of sodium channels by the conotoxin  $\mu$ OS-GVIII, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (7) (2014) 2758–2763, <https://doi.org/10.1073/pnas.1324189111>.
- [45] O. Lopez-Churruarín, P. Pukkassant, S.E. Vela, W.J. Brackembury, T.G. Hales, P. Benson, J.C. Gomez, S. Bastien Roger, Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancer, *Science* 24 (4) (2021) 1–26, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.102270>.
- [46] J.R. Prashanth, A. Brus, A.H. Jin, P.F. Alewood, S. Duterre, R.J. Lewis, Cone snail venomics: From novel biology to novel therapeutics, *Future Med. Chem.* 6 (15) (2014) 1659–1678, <https://doi.org/10.4155/FMC.14.99>.
- [47] K.L. McMahon, H.M.T. Tran, J.R. Dennis, R.J. Lewis, I. Vetter, C.I. Schroeder, Discovery, pharmacological characterization and *in* situ structure of the novel  $\mu$ -conotoxin *salic*, a potent and irreversible nav channel inhibitor, *Biomedicines* 8 (10) (2020) 1–15, <https://doi.org/10.3390/biomed8100391>.
- [48] N.R. Munsinghe, M.J. Christie, Conotoxins that could provide analgesia through voltage-gated sodium channel inhibition, *Toxins* 7 (12) (2015) 5386–5407, <https://doi.org/10.3390/toxins7124890>.
- [49] M. Stevens, S. Peigneur, J. Tytgat, Neurotoxins and their binding sites on voltage-gated sodium channels, *Front. Pharmacol.* 2 (2011) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00071>.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agnew, W.S., Levinson, S.R., Brabson, J.S., Raftery, M.A., 1978. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes (receptor/saxitoxin/electrical excitability/mixed micelle).
- Aguilar, M., Luna-Ramírez, K., Echeverría, D., Falcón, A., Olivera, B., Heimer de la Cotera, E., Maillo, M., 2008. Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from venoms of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides (N.Y.)* 29, 186–195. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Aguilar, M.B., Flores-Torres, A., Batista, C.V.F., Falcón, A., López-Vera, E., de la Cotera, E.P.H., 2009. Structural characterization of five post-translationally modified isomorphs of a novel putative  $\delta$ -conotoxin from the vermivorous snail *Conus delessertii* from the Mexican Caribbean Sea. *Peptides (N.Y.)* 30, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.005>
- Aguilar, M.B., Lezama-Monfil, L., Maillo, M., Pedraza-Lara, H., López-Vera, E., Heimer De La Cotera, E.P., 2006. A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides (N.Y.)* 27, 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.020>
- Aguilar, M.B., López-Vera, E., de la Cotera, E.P.H., Falcón, A., Olivera, B.M., Maillo, M., 2007. I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: Peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides (N.Y.)* 28, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.024>
- Akondi, K.B., Muttenthaler, M., Kaas, Q., Craik, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F., 2014. Discovery, Synthesis, and Structure – Activity Relationships of Conotoxins. *Chem Rev* 114, 5815–5847.
- Barbier, J., Lamthanh, H., le Gall, F., Favreau, P., Benoit, E., Chen, H., Gilles, N., Ilan, N., Heinemann, S.H., Gordon, D., Ménez, A., Molgó, J., 2004. A  $\delta$ -Conotoxin from *Conus ermineus* Venom Inhibits Inactivation in Vertebrate Neuronal Na<sup>+</sup> Channels but Not in Skeletal and Cardiac Muscles. *Journal of Biological Chemistry* 279, 4680–4685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309576200>

- Barnard, E.A., Darlison, M.G., Seeburg, P., 1987. Molecular biology of the GABA<sub>A</sub> receptor: the receptor/channel superfamily. *Trends Neurosci* 10, 502–509. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90130-5](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90130-5)
- Betz, H., 1990. Ligand-gated ion channels in the brain: The amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5, 383–392. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90077-S](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90077-S)
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2003. *Invertebrates*, 2nd ed. Massachusetts.
- Brust, A., Croker, D.E., Colless, B., Ragnarsson, L., Andersson, Å., Jain, K., Garcia-Caraballo, S., Castro, J., Brierley, S.M., Alewood, P.F., Lewis, R.J., 2016. Conopeptide-Derived  $\kappa$ -Opioid Agonists (Conorphins): Potent, Selective, and Metabolic Stable Dynorphin A Mimetics with Antinociceptive Properties. *J Med Chem* 59, 2381–2395. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00911>
- Campos-Lira, E., Carrillo, E., Aguilar, M.B., Gajewiak, J., Gómez-Lagunas, F., López-Vera, E., 2017. Conorfamide-Sr3, a structurally novel specific inhibitor of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Toxicon* 138, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.024>
- Catterall, W., 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem* 64, 493–531. <https://doi.org/10.3109/15569549409089965>
- Celie, P.H.N., Kasheverov, I.E., Mordvintsev, D.Y., Hogg, R.C., van Nierop, P., van Elk, R., van Rossum-Fikkert, S.E., Zhmak, M.N., Bertrand, D., Tsetlin, V., Sixma, T.K., Smit, A.B., 2005. Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an  $\alpha$ -conotoxin PnIA variant. *Nat Struct Mol Biol* 12, 582–588. <https://doi.org/10.1038/nsmb951>
- Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Qu, Y., Sampieri, F., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2006. Structure and Function of the Voltage Sensor of Sodium Channels Probed by a  $\beta$ -Scorpion Toxin \*,S NIH Public Access, *J Biol Chem*.
- ConoServer [WWW Document], n.d. URL <http://www.conoserver.org/?page=classification&type=genesuperfamilies> (accessed 4.25.22).
- Craig, A.G., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., 1999. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *Eur J Biochem* 264, 271–275. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00624.x>
- Darryl, F., Camp, D. (Eds.), 2009. *Gulf of Mexico Origin Waters, and Biota*. Texas A&M University Press, USA.

- de Lera Ruiz, M., Kraus, R.L., 2015. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem* 58, 7093–7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>
- Ding, H., Deng, E.Z., Yuan, L.F., Liu, L., Lin, H., Chen, W., Chou, K.C., 2014. ICTX-type: A sequence-based predictor for identifying the types of conotoxins in targeting ion channels. *Biomed Res Int* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/286419>
- Dutertre, S., Croker, D., Daly, N.L., Andersson, Å., Muttenthaler, M., Lumsden, N.G., Craik, D.J., Alewood, P.F., Guillon, G., Lewis, R.J., 2008. Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like peptides. *Journal of Biological Chemistry* 283, 7100–7108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706477200>
- EMBL\_EBI, n.d. iCTX-Type [WWW Document]. URL <http://lin-group.cn/server/iCTX-Type> (accessed 4.25.22).
- England, L.J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A.G., Gulyas, J., Akhtar, M., Rivier, J., Julius, D., Olivera, B.M., 1998. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* (1979) 281, 575–578. <https://doi.org/10.1126/science.281.5376.575>
- Espiritu, D.J.D., Watkins, M., Dia-Monje, V., Cartier, G.E., Cruz, L.J., Olivera, B.M., 2001. Venomous cone snails: Molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon* 39, 1899–1916. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00175-1)
- Favreau, P., Benoit, E., Hocking, H.G., Carlier, L., D’Hoedt, D., Leipold, E., Markgraf, R., Schlumberger, S., Córdova, M.A., Gaertner, H., Paolini-Bertrand, M., Hartley, O., Tytgat, J., Heinemann, S.H., Bertrand, D., Boelens, R., Stöcklin, R., Molgó, J., 2012. A novel  $\mu$ -conopeptide, CnIIIC, exerts potent and preferential inhibition of NaV1.2/1.4 channels and blocks neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol* 166, 1654–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01837.x>
- Fiedler, B., Zhang, M.M., Buczek, O., Azam, L., Bulaj, G., Norton, R.S., Olivera, B.M., Yoshikami, D., 2008. Specificity, affinity and efficacy of iota-conotoxin RXIA, an agonist of voltage-gated sodium channels NaV1.2, 1.6 and 1.7. *Biochem Pharmacol* 75, 2334–2344. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.019>
- Gajewiak, J., Azam, L., Imperial, J., Walewska, A., Green, B.R., Bandyopadhyay, P.K., Raghuraman, S., Ueberheide, B., Bern, M., Zhou, H.M., Minassian, N.A., Hagan, R.H., Flinspach, M., Liu, Y., Bulaj, G., Wickenden, A.D., Olivera, B.M., Yoshikami, D., Zhang, M.M., 2014. A disulfide tether stabilizes the block of sodium channels by the

- conotoxin  $\mu$ OS-GVIIJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2758–2763.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1324189111>
- 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 (Basel)* 9.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9120397>
- Gilly, W.F., Richmond, T.A., Duda, T.F., Elliger, C., Lebaric, Z., Schulz, J., Bingham, J.P., Sweedler, J. v., 2011. A diverse family of novel peptide toxins from an unusual cone snail, *Conus californicus*. *Journal of Experimental Biology* 214, 147–161.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.046086>
- Goldin, A., Barchi, R., Caldwell, J., Hofmann, F., Howe, J., Hunter, J., Kallen, R., Mandel, G., Meisler, M., Netter, Y., Noda, M., Tamkun, M., Waxman, S., Wood, J., Catterall, W., 2000. Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 28, 365–368.
- Grenningloh, G., Schmieden, V., Schofield, P.R., Seeburg, P.H., Siddique, T., Mohandas, T.K., Becker, C.M., Betz, H., 1990. Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO J* 9, 771–776. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08172.x>
- Halai, R., Craik, D.J., 2009. Conotoxins: Natural product drug leads. *Nat Prod Rep* 26, 526–536. <https://doi.org/10.1039/b819311h>
- Hannon, H.E., Atchison, W.D., 2013. Omega-conotoxins as experimental tools and therapeutics in pain management. *Mar Drugs* 11, 680–699.  
<https://doi.org/10.3390/md11030680>
- Hasson, A., Fainzilber, M., Gordon, D., Zlotkin, E., Spira, M.E., 1993. Alteration of Sodium Currents by New Peptide Toxins From the Venom of a Molluscivorous *Conus* Snail. *European Journal of Neuroscience* 5, 56–64. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00205.x>
- Hille, B., Armstrong, C.M., MacKinnon, R., 1999. Ion channels: From idea to reality. *Nat Med* 5, 1105–1109. <https://doi.org/10.1038/13415>
- Hodgkin, A., Huxley, A., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conductance and excitation. *Journal of Physiology* 117, 500–44.
- Hopkins, C., Grilley, M., Miller, C., Shon, K.J., Cruz, L.J., Gray, W.R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, D., Olivera, B.M., 1995. A new family of *Conus* peptides targeted to the



- nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 270, 22361–22367. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22361>
- Hui, K., Lipkind, G., Fozzard, H.A., French, R.J., 2002. Electrostatic and steric contributions to block of the skeletal muscle sodium channel by  $\mu$ -conotoxin. *Journal of General Physiology* 119, 45–54. <https://doi.org/10.1085/jgp.119.1.45>
- Jimenez, E.C., Donevan, S., Walker, C., Zhou, L.M., Nielsen, J., Cruz, L.J., Armstrong, H., White, H.S., Olivera, B.M., 2002. Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: Determinants for anticonvulsant potency. *Epilepsy Res* 51, 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00101-8)
- Jin, A.H., Israel, M.R., Inserra, M.C., Smith, J.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F., Vetter, I., Dutertre, S., 2015.  $\delta$ -conotoxin SuVIA suggests an evolutionary link between ancestral predator defence and the origin of fish-hunting behaviour in carnivorous cone snails. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0817>
- Jin, A.H., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Himaya, S.W.A., Kaas, Q., Craik, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F., 2019. Conotoxins: Chemistry and Biology, *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00207>
- Kaas, Q., Westermann, J.C., Craik, D.J., 2010. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon* 55, 1491–1509. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.002>
- Knapp, O., McArthur, J.R., Adams, D.J., 2012. Conotoxins targeting neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: Potential analgesics? *Toxins (Basel)* 4, 1236–1260. <https://doi.org/10.3390/toxins4111236>
- Kornreich, B.G., 2007. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology* 9, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2007.02.001>
- Kumar, P.S., Kumar, D.S., Umamaheswari, S., 2015. A perspective on toxicology of Conus venom peptides. *Asian Pac J Trop Med* 8, 337–351. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60342-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60342-4)
- Leipold, E., de Bie, H., Zorn, S., Borges, A., Olivera, B.M., Terlau, H., Heinemann, S.H., 2007.  $\mu$ -Conotoxins inhibit Nav channels by interfering with their voltage sensors in domain-2. *Channels* 1, 253–262. <https://doi.org/10.4161/chan.4847>

- Leipold, E., Hansel, A., Olivera, B.M., Terlau, H., Heinemann, S.H., 2005. Molecular interaction of  $\delta$ -conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett* 579, 3881–3884. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.077>
- Lewis, R.J., Dutertre, S., Vetter, I., Christie, M.J., 2012a. Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacol Rev* 64, 259–298. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005322>
- Lewis, R.J., Dutertre, S., Vetter, I., Christie, M.J., 2012b. Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacol Rev* 64, 259–298. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005322>
- Li, R.A., Ennis, I.L., Xue, T., Nguyen, H.M., Tomaselli, G.F., Goldin, A.L., Marbán, E., 2003. Molecular basis of isoform-specific  $\mu$ -conotoxin block of cardiac, skeletal muscle, and brain Na<sup>+</sup> channels. *Journal of Biological Chemistry* 278, 8717–8724. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210882200>
- Liu, J., Wu, Q., Pi, C., Zhao, Y., Zhou, M., Wang, L., Chen, S., Xu, A., 2007. Isolation and characterization of a T-superfamily conotoxin from *Conus litteratus* with targeting tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *Peptides (N.Y.)* 28, 2313–2319. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.006>
- Liu, L., Chew, G., Hawrot, E., Chi, C., Wang, C., 2007. Two potent  $\alpha$ 3/5 conotoxins from piscivorous *Conus achatinus*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39, 438–444. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00301.x>
- Lopez-Charcas, O., Pukkanasut, P., Velu, S.E., Brackenbury, W.J., Hales, T.G., Besson, P., Gomora, J.C., Bastien Roger, S., 2021. *iScience* Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. <https://doi.org/10.1016/j.isci>
- López-Vera, E., Aguilar, M.B., Schiavon, E., Marinzi, C., Ortiz, E., Restano Cassulini, R., Batista, C.V.F., Possani, L.D., Heimer De La Cotera, E.P., Peri, F., Becerril, B., Wanke, E., 2007. Novel  $\alpha$ -conotoxins from *Conus spurius* and the  $\alpha$ -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Journal* 274, 3972–3985. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05931.x>
- Luna-Ramírez, K.S., Aguilar, M.B., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E.P., Olivera, B.M., Maillo, M., 2007. An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. *Peptides (N.Y.)* 28, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.025>
- Maillo, M., Aguilar, M.B., López-Vera, E., Craig, A.G., Bulaj, G., Olivera, B.M., Heimer De La Cotera, E.P., 2002. Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide

- family of neuropeptides. *Toxicon* 40, 401–407. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00176-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00176-3)
- Malmberg, A., Gilbert, H., McCabe, T., Basbaum, A., 2003. Powerful antinociceptive effects of the cone snail venoms-derived sbtype-selective NMDA receptor antagonists conantokins G and T. *Pain* 101, 109–116. <https://doi.org/10.1016/S0>
- McIntosh, J.M., Hasson, A., Spira, M.E., Gray, W.R., Li, W., Marsh, M., Hillyard, D.R., Olivera, B.M., 1995. A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry* 270, 16796–16802. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16796>
- McIntosh, J.M., Santos, A.D., Olivera, B.M., 1999. Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptors subtypes. *Annu. Rev. Biochem* 68, 59–88. <https://doi.org/10.1002/9783527678679.dg03624>
- McIntosh, J.M., Yoshikami, D., Mahe, E., Nielsen, D.B., Rivier, J.E., Gray, W.R., Olivera, B.M., 1994. A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity,  $\alpha$ - conotoxin Iml. *Journal of Biological Chemistry* 269, 16733–16739.
- McMahon, K.L., Tran, H.N.T., Deuis, J.R., Lewis, R.J., Vetter, I., Schroeder, C.I., 2020. Discovery, pharmacological characterisation and nmr structure of the novel  $\mu$ -conotoxin sxiic, a potent and irreversible nav channel inhibitor. *Biomedicines* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100391>
- Mcmanus, B., Musick, R., 1985. Postsynaptic transmission. *Journal of Neuroscience* 5, 110–116.
- Miller, P.S., Smart, T.G., 2010. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.005>
- Mitchell, S.S., Shon, K.J., Foster, M.P., Davis, D.R., Olivera, B.M., Ireland, C.M., 1998. Three-dimensional solution structure of conotoxin  $\psi$ -PIIIE, an acetylcholine gated ion channel antagonist. *Biochemistry* 37, 1215–1220. <https://doi.org/10.1021/bi972186t>
- Munasinghe, N.R., Christie, M.J., 2015. Conotoxins that could provide analgesia through voltage gated sodium channel inhibition. *Toxins (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/toxins7124890>
- Olivera, B., Rivier, J., Scott, J., Hillyard, D.R., Cruz, L., 1991. Conotoxins. *J Biol Chem* 266, 22067–22070.

- Olivera, B.M., 2002. Conus venom peptides: Reflections from the biology of clades and species. *Annu Rev Ecol Syst* 33, 25–47.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150424>
- Olivera, B.M., 1997. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 8, 2101–2109.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.8.11.2101>
- Olivera, B.M., Cruz, L.J., 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* 39, 7–14.  
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00157-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00157-4)
- Ott, K.H., Becker, S., Gordon, R.D., Rüterjans, H., 1991. Solution structure of  $\mu$ -conotoxin GIIIA analysed by 2D-NMR and distance geometry calculations. *FEBS Lett* 278, 160–166. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80107-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80107-E)
- Petrel, C., Hocking, H.G., Reynaud, M., Upert, G., Favreau, P., Biass, D., Paolini-Bertrand, M., Peigneur, S., Tytgat, J., Gilles, N., Hartley, O., Boelens, R., Stocklin, R., Servent, D., 2013. Identification, structural and pharmacological characterization of  $\tau$ -CnVA, a conopeptide that selectively interacts with somatostatin sst 3 receptor. *Biochem Pharmacol* 85, 1663–1671. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.019>
- Prashanth, J.R., Brust, A., Jin, A.H., Alewood, P.F., Dutertre, S., Lewis, R.J., 2014. Cone snail venomomics: From novel biology to novel therapeutics. *Future Med Chem* 6, 1659–1675. <https://doi.org/10.4155/FMC.14.99>
- Puillandre, N., Koua, D., Favreau, P., Olivera, B.M., Stöcklin, R., 2012. Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides. *J Mol Evol* 74, 297–309.  
<https://doi.org/10.1007/s00239-012-9507-2>
- Rigby, A.C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D.E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J.D., Furie, B.C., Furie, B., Stenflo, J., 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic  $Ca^{2+}$  influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5758–5763.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5758>
- Robinson, S.D., Norton, R.S., 2014. Conotoxin gene superfamilies. *Mar Drugs* 12, 6058–6101. <https://doi.org/10.3390/md12126058>
- Rogers, J.P., Luginbühl, P., Pemberton, K., Harty, P., Wemmer, D.E., Stevens, R.C., 2000. Structure-activity relationships in a peptidic  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *J Mol Biol* 304, 911–926. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4247>

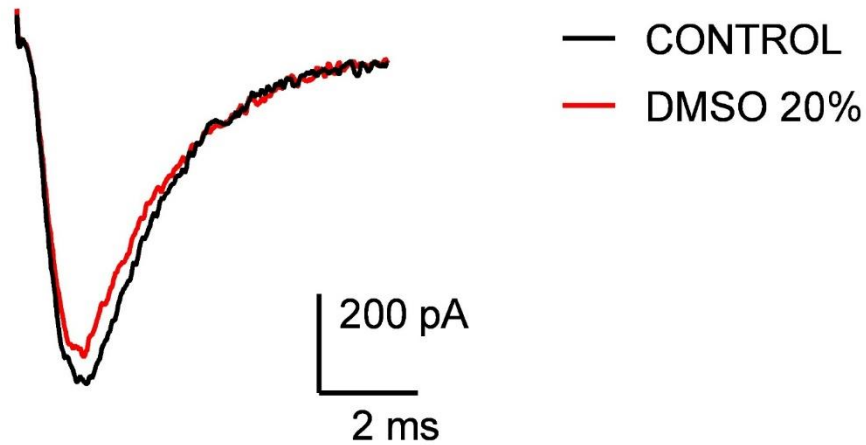
- Safo, P., Rosenbaum, T., Shcherbatko, A., Choi, D.Y., Han, E., Toledo-Aral, J.J., Olivera, B.M., Brehm, P., Mandel, G., 2000. Distinction among neuronal subtypes of voltage-activated sodium channels by  $\mu$ -conotoxin PIIIa. *Journal of Neuroscience* 20, 76–80. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-01-00076.2000>
- Sharpe, I.A., Gehrmann, J., Loughnan, M.L., Thomas, L., Adams, D.A., Atkins, A., Palant, E., Craik, D.J., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J., 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the  $\alpha$ 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nat Neurosci* 4, 902–907. <https://doi.org/10.1038/nn0901-902>
- Sharpe, I.A., Thomas, L., Loughnan, M., Motin, L., Palant, E., Croker, D.E., Alewood, D., Chen, S., Graham, R.M., Alewood, P.F., Adams, D.J., Lewis, R.J., 2003. Allosteric  $\alpha$ 1-Adrenoreceptor Antagonism by the Conopeptide  $\rho$ -TIA. *Journal of Biological Chemistry* 278, 34451–34457. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305410200>
- Shon, K.J., Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M., Hasson, A., Spira, M.E., Hasson, A., Spira, M.E., 1994.  $\delta$ -Conotoxin GmVIA, a Novel Peptide from the Venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry* 33, 11420–11425. <https://doi.org/10.1021/bi00204a003>
- Shon, K.J., Olivera, B.M., Watkins, M., Jacobsen, R.B., Gray, W.R., Floresca, C.Z., Cruz, L.J., Hillyard, D.R., Brink, A., Terlau, H., Yoshikami, D., 1998.  $\mu$ -Conotoxin PIIIa, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *Journal of Neuroscience* 18, 4473–4481. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-12-04473.1998>
- Stevens, M., Peigneur, S., Tytgat, J., 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol* 2 NOV. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00071>
- Terlau, H., Olivera, B.M., 2004. *Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiol Rev* 84, 41–68. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2003>
- Thompson, A.J., Lester, H.A., Lummis, S.C.R., 2010. The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys* 43, 449–499. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000168>
- Thomsen, W.J., Catterall, W.A., 1989. Localization of the receptor site for a scorpion toxins by antibody mapping: Implications for sodium channel topology (electrical excitability/neurotoxin/ion channel), *Pharmacology*.

- Tombola, F., Pathak, M.M., Isacoff, E.Y., 2006. How Does Voltage Open an Ion Channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 23–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020404.145837>
- Tovar, K.R., Westbrook, G., 2012. Ligand-Gated Ion Channel, in: *Cell Physiology Source Book*.
- Tsetlin, V., Kuzmin, D., Kasheverov, I., 2011. Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *J Neurochem* 116, 734–741. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07060.x>
- van der Haegen, A., Peigneur, S., Tytgat, J., 2011. Importance of position 8 in  $\mu$ -conotoxin KIIIA for voltage-gated sodium channel selectivity. *FEBS Journal* 278, 3408–3418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08264.x>
- Vetter, I., J. Lewis, R., 2012. Therapeutic Potential of Cone Snail Venom Peptides (Conopeptides). *Curr Top Med Chem* 12, 1546–1552. <https://doi.org/10.2174/156802612802652457>
- Walker, C.S., Jensen, S., Ellison, M., Matta, J.A., Lee, W.Y., Imperial, J.S., Duclos, N., Brockie, P.J., Madsen, D.M., Isaac, J.T.R., Olivera, B., Maricq, A. v., 2009. A Novel Conus Snail Polypeptide Causes Excitotoxicity by Blocking Desensitization of AMPA Receptors. *Current Biology* 19, 900–908. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.017>
- Wang, L., Liu, J., Pi, C., Zeng, X., Zhou, M., Jiang, X., Chen, S., Ren, Z., Xu, A., 2009. Identification of a novel M-superfamily conotoxin with the ability to enhance tetrodotoxin sensitive sodium currents. *Arch Toxicol* 83, 925–932. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0453-8>
- Wang, Shuo, Du, T., Liu, Z., Wang, Sheng, Wu, Y., Ding, J., Jiang, L., Dai, Q., 2014. Characterization of a T-superfamily conotoxin TxVC from *Conus textile* that selectively targets neuronal nAChR subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 454, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.055>
- Waxham, M.N., 2014. *Neurotransmitter Receptors, From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397179-1.00010-5>
- Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2018. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* 87, 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>

- Wilson, M.J., Yoshikami, D., Azam, L., Gajewiak, J., Olivera, B.M., Bulaj, G., Zhang, M.M., 2011.  $\mu$ -Conotoxins that differentially block sodium channels Na V1.1 through 1.8 identify those responsible for action potentials in sciatic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10302–10307. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107027108>
- Woodward, S.R., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Hillyard, D.R., 1990. Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO J* 9, 1015–1020. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08204.x>
- Yu, F.H., Catterall, W.A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>
- Yuan, L.F., Ding, C., Guo, S.H., Ding, H., Chen, W., Lin, H., 2013. Prediction of the types of ion channel-targeted conotoxins based on radial basis function network. *Toxicology in Vitro* 27, 852–856. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.024>
- Zamora-Bustillos, R., Aguilar, M.B., Falcón, A., Heimer de la Coteria, E.P., 2009. Identification, by RT-PCR, of four novel T-1-superfamily conotoxins from the vermivorous snail *Conus spurius* from the Gulf of Mexico. *Peptides (N.Y.)* 30, 1396–1404. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.003>
- Zamora-Bustillos, R., Martínez-Núñez, M.A., Aguilar, M.B., Collí-Dula, R.C., Brito-Domínguez, D.A., 2021. Identification of Novel Conotoxin Precursors from the Cone Snail *Conus spurius* by High-Throughput RNA Sequencing. *Mar Drugs* 19, 547. <https://doi.org/10.3390/md19100547>.

## Anexo I

Trazo representativo de las corrientes de  $\text{Na}_v1.5$  en condiciones control y en presencia del vehículo de la conotoxina sr5a, DMSO al 20%. El DMSO no modifica las corrientes de  $\text{Na}_v$ . En color negro está el trazo control, mientras que en color rojo está el trazo en presencia de DMSO.



Trazo representativo de las corrientes de  $\text{Na}_v1.6$  en condiciones control y en presencia de TTX  $1\mu\text{M}$ . En color negro está el trazo control, mientras que en color rojo está el trazo en presencia de TTX, con lo que se demuestra que el canal responde a un activador clásico.

