

11281

"Actividad biológica de péptidos de caracoles de la superfamilia Conoidea".

Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

José Estuardo López Vera

Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis que presenta el Maestro en Ciencias José Estuardo López Vera, como un requisito
para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Campus Juriquilla. Noviembre de 2005

m. 340324



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.

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de los Dres. Edgar P. Heimer de la Coteria y Manuel Aguilar Ramírez, en el laboratorio de Neurofarmacología Marina en el Instituto de Neurobiología.

El alumno tuvo beca para estudios de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado de agosto/2000 a diciembre/2003.

El trabajo fue apoyado por los donativos IN-206701 (Dr. M. Aguilar) del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT-UNAM), y 36040-N (Dr. J. Riesgo) y 30701-N (Dr. E. Heimer) (CONACYT).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ESTUARDO LOPEZ VEZA

FECHA: 21 ENERO 05

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de nueva cuenta el apoyo incondicional recibido por parte de mi tutor, Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera, en este viaje que se inició hace más de 5 años, con la meta en mente de iniciar un grupo de investigación en México exclusivamente dedicado al estudio de toxinas marinas, cuyo uno de sus objetivos se cumple con la realización de este escrito.

De igual forma agradezco el apoyo del Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez por sus aleccionadoras experiencias compartidas, parte esencial para la terminación de este escrito y por ser un gran amigo.

Al Dr. Baldomero Olivera, quien me ha permitido seguir aprendiendo acerca de este extraordinario mundo de las conotoxinas, por haberme recibido como un miembro más de investigación dentro de su equipo de trabajo en el Departamento de Biología de la Universidad de Utah, Salt Lake City, EUA.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera y Dr. Froylán Gómez Lagunas, por sus sugerencias y comentarios a lo largo de este trabajo.

A los miembros del jurado, Dr. Lourival Possani Postay, Dr. Edgar Heimer de la Cotera, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Ataúlfo Martínez Torres y Dr. Baltazar Becerril Luján por sus comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

Al personal del buque Oceanográfico Justo Sierra por las operaciones en la obtención de los caracoles marinos.

A la Unidad de Bioquímica Analítica y la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Neurobiología.

A la Bióloga Maria Eugenia Ramos Aguilar, por la captura de los organismos que fueron parte fundamental en la realización de este trabajo y al Biólogo Experimental Andrés Falcón Alcántara por su asesoría técnica.

A los Dres. Baltazar Becerril y Enzo Wanke por los datos de biología molecular y electrofisiológicos que acrecentaron este trabajo, y al Dr. Juan R. Riesgo Escovar por su ayuda en el bioensayo empleado en este trabajo.

DEDICATORIAS

A toda la familia López y Vera, con especial cariño a mis padres Ing. Estuardo López Martínez y Profra. Elvira Vera Frutos, por dejarme hacer lo que siempre he querido, como seguir superándome académicamente; y a mi hermana Sandra Luz López Vera.

A mis abuelos biológicos Amalia Frutos Jiménez †, Armando López Martínez† y Regina Martínez Vázquez, y aquellos que han sido adoptados (Mamamama), Profra. Luz María Frutos Jiménez†.

A las tocayas tías Esperanza Vera y Esperanza Gallegos, Anita Frutos, Edith Esquivel y a mis tíos Armando López Martínez y Bernardo Tarango por estar al cuidado de mi persona y seguir animándome con mis estudios.

A mi leoncito, Alma Ariadna Martínez Rocha por su apoyo incondicional otorgado durante estos últimos años y abrirme su corazón.

A todos los integrantes del laboratorio de Neurofarmacología Marina, Andrés, Dorothy, Esther, Leticia, Angélica y Alejandro.

A los cuates del Instituto, Mónica, Ana Cecilia, Míriam, Bertha, Gaby, Jazmín, Pavel, Víctor, Héctor, en especial a la Dra. María Maillo, y cómo no a las niñas Potosinas Griselda y Míriam.

A Leonor Casanova y Carmen Vázquez por el esfuerzo enorme que ha realizado para que cada uno de los estudiantes del posgrado del Instituto; que su estancia sea placentera.

A los integrantes y fundadores del tres veces H. Comité de Tradicionales Daniel y Jorge (El socio).

A los cuates de siempre Malco, Eduardo, Andrés y Pablo

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN _____ | 7 |
| ABSTRACT _____ | 8 |
| ÍNDICE DE FIGURAS _____ | 9 |
| ÍNDICE DE TABLAS _____ | 9 |
| INTRODUCCIÓN _____ | 10 |
| Generalidades sobre la superfamilia Conoidea _____ | 11 |
| ANTECEDENTES | |
| Características del veneno del género <i>Conus</i> _____ | 18 |
| Clasificación de las conotoxinas _____ | 19 |
| Conopéptidos _____ | 28 |
| Otros componentes del veneno de <i>Conus</i> _____ | 30 |
| Nomenclatura de las conotoxinas, conopéptidos y otros componentes del veneno de <i>Conus</i> _____ | 30 |
| Actividad fisiológica de las conotoxinas _____ | 31 |
| Características del veneno de la familia Terebridae _____ | 33 |
| JUSTIFICACIÓN _____ | 34 |
| HIPÓTESIS _____ | 35 |
| OBJETIVOS _____ | 36 |

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| Colecta y transportación de los especímenes _____ | 37 |
| Obtención de los conductos venenosos _____ | 37 |
| Extracción de los venenos _____ | 37 |
| Separación y purificación de los componentes de los venenos _____ | 38 |
| Repurificación de los péptidos _____ | 38 |
| Análisis de la estructura primaria _____ | 39 |
| Reducción y alquilación total de los péptidos _____ | 39 |
| Determinación de las masas moleculares _____ | 39 |
| Determinación de los puentes disulfuro _____ | 40 |
| Extracción del ARN total _____ | 40 |
| Transcripción inversa del ARNm _____ | 41 |
| Amplificación del ADNc _____ | 41 |
| Ligación del ADNc _____ | 42 |
| Transformación de bacterias _____ | 42 |
| Secuenciación del ADNc _____ | 43 |
| Bioensayo conductual en ratones _____ | 43 |
| Bioensayo de sobrevivencia en larvas de mosca _____ | 43 |
| Ensayo electrofisiológico _____ | 43 |

RESULTADOS

| | |
|--|----|
| Identificación de los organismos _____ | 45 |
| Separación de los componentes del veneno de los túrridos _____ | 47 |
| Secuenciación de los péptidos PaIA y GpIA _____ | 47 |
| Determinación de la masa del péptido PaIA _____ | 47 |
| Evaluación biológica del péptido PaIA _____ | 49 |
| Alineamiento de las secuencias de los péptidos PaIA y GpIA _____ | 49 |
| Separación de los componentes del veneno del cónido _____ | 53 |

| | |
|--|----|
| Secuenciación de los péptidos SpIA, SpIB y SpIC _____ | 55 |
| Determinación de la masa de los péptidos SpIA, SpIB y SpIC _____ | 56 |
| Determinación de los puentes disulfuro del péptido SpIB _____ | 57 |
| Clonación del ADNc del precursor de la superfamilia A _____ | 58 |
| Efecto de los péptidos SpIA y SpIB sobre la conducta de los ratones _____ | 59 |
| Efecto de los péptidos SpIA y SpIB sobre los nAChR musculares y neuronales _ | 59 |
| | |
| DISCUSIÓN _____ | 63 |
| | |
| CONCLUSIONES _____ | 71 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA _____ | 74 |

RESUMEN

Actividad biológica de péptidos de caracoles de la superfamilia Conoidea

Los caracoles del género *Conus*, se caracterizan por ser un grupo de depredadores marinos que se alimentan de diversas presas tales como moluscos, gusanos y más notablemente de peces. Sus venenos están compuestos por un vasto número de toxinas, que selectivamente se unen a diferentes blancos moleculares, particularmente a receptores y canales iónicos de los sistemas nervioso y muscular de sus presas. Estas toxinas, que se conocen como "conotoxinas", son usualmente péptidos pequeños con un alto contenido de residuos de cisteína en sus estructuras. El estudio de las conotoxinas en los últimos 20 años ha tenido un impacto significativo en la toxínología, ya que tales estudios no solamente han dilucidado el modo de acción de estos péptidos en el proceso de envenenamiento sino también han generado aplicaciones importantes en las áreas de las neurociencias y ciencias biomédicas.

Existen otros caracoles igualmente venenosos llamados Túrridos, presumiblemente antecesores de los cónidos hablando en términos evolutivos, cuyos venenos no han sido caracterizados bioquímicamente y biológicamente. En este trabajo se presenta la caracterización parcial de los componentes mayoritarios del veneno de la especie *Polystira albida* y *Gemmula periscelida* (superfamilia Conoidea; familia Turridae), y la caracterización completa de tres variantes con modificaciones post-traduccionales de un péptido de la especie *Conus spurius* (familia Conidae).

Se encontró que los péptidos provenientes de las especies de túrridos tienen un gran número de residuos de metionina, arginina y tirosina y pocos o ningún residuo de cisteína. La predicción de estructura secundaria para ambos péptidos sugiere la presencia de α -hélices, y para el péptido de *P. albida* la formación de motivos α -hélices trenzada. Este motivo estructural podría proveer estabilidad conformacional para estos componentes del veneno de túrridos (turritoxinas) la cual en el caso de las conotoxinas es dada por los puentes disulfuro. Estas diferencias estructurales entre conotoxinas y turritoxinas, sugieren estrategias bioquímicas completamente divergentes en los venenos de los principales grupos incluidos en las Superfamilia Conoidea.

El péptido de la especie *C. spurius*, comparte una gran homología estructural con las α -conotoxinas. Los péptidos pertenecientes a esta familia de conotoxinas, antagonizan selectivamente receptores nicotínicos de Acetilcolina. Contrario a las expectativas, este péptido resultó ser un modulador positivo para dichos receptores. Este péptido podría representar una nueva subfamilia dentro de la superfamilia A, la subfamilia de las β -conotoxinas.

ABSTRACT

Biological activity of peptides from snails belonging to the superfamily Conoidea

Cone snails (*Conus*) are marine gastropods that feed on diverse prey such as marine worms, mollusk and most notably, fish. Their venoms are composed by a vast number of specialized toxins that selectively target particular receptors and ion channels in the nervous and muscle systems of their prey. These toxins, collectively called conotoxins, are usually small and highly disulfide-rich peptides. Studies of conotoxins in the last 20 years have had significant impact on toxinology. These studies have revealed the mode of action of peptides from these venoms, and this has led not only to understanding the basic mechanisms that underlie *Conus* envenomation, but also to significant applications in neurobiology and other biomedical sciences.

However, other existing kinds of venomous snails called Turrids, presumably prehistoric compared to the *Conus* in evolutionary terms, but less is scientifically known about their biology and biochemical characterization of the content of their venom. This work presents the partial characterization of two major components of the venom from *Polystira albida* and *Gemmula periscelida* (superfamily Conoidea; family Turridae), and the complete characterization of one peptide with multiple posttranslational modification from the species *Conus spurius* (family Conidae).

These peptides from turrids species were shown to contain a high proportion of Met, Tyr and Arg residues, and few, if any Cys residues. Both peptides are predicted to contain α -helical structures, and the peptide from *P. albida* is also predicted to form α -coiled-coil motif. This structural motif could provide conformational stability for these turrid venom components (turritoxins), which in the case of most conotoxins is achieved by disulfide bridges. These differences between the first turritoxins and the conotoxins, suggest divergent biochemical strategies in the venoms of different major groups included in the superfamily Conoidea.

The peptide from *C. spurius* has a high structural homology with α -conotoxins. Peptides belonging to this conotoxin family selectively affect nicotinic acetylcholine receptors. On the contrary, this peptide causes a positive modulatory on such receptors. This peptide could represent a new subfamily, for which we proposed the name of β -subfamily, within the A-superfamily of conotoxins.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Clasificación de la superfamilia Conoidea | 12 |
| Figura 2. Ejemplares representativos de las familias de Conoidea | 14 |
| Figura 3. Aparato venenoso de los miembros de la familia Conidae | 16 |
| Figura 4. Ejemplos de <i>Conus</i> que habitan en aguas mexicanas | 17 |
| Figura 5. Clasificación de las conotoxinas | 19 |
| Figura 6. Superfamilias de conotoxinas | 20 |
| Figura 7. Bloqueo neuromuscular por camarillas de conotoxinas | 32 |
| Figura 8. Ejemplares de <i>G. periscelida</i> , <i>P. albida</i> y <i>C. spurius</i> | 46 |
| Figura 9. Cromatograma del veneno de <i>G. periscelida</i> y <i>P. albida</i> | 48 |
| Figura 10. Efecto de PaIA sobre las larvas de <i>D. melanogaster</i> | 50 |
| Figura 11. Cromatograma del veneno de <i>C. spurius</i> | 54 |
| Figura 12. Determinación de los puentes disulfuro de SpIB | 55 |
| Figura 13. Clonación del ADNc del precursor de las A-conotoxinas | 57 |
| Figura 14. Efecto de SpIA y SpIB sobre nAChR musculares | 60 |
| Figura 15. Efecto de SpIA y SpIB sobre nAChR neuronales | 61 |
| Figura 16. Efecto de SpIC sobre nAChR musculares | 62 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Toxinas de la superfamilia O | 22 |
| Tabla 2. Conotoxinas μ y μ O | 23 |
| Tabla 3. Conotoxinas α , α A y ψ | 25 |
| Tabla 4. Conotoxinas ρ , λ y χ | 27 |
| Tabla 5. Otros conopéptidos | 29 |
| Tabla 6. Augertoxinas | 33 |
| Tabla 7. Secuencias de PaIA y GpIA | 50 |
| Tabla 8. Alineamiento y estructura secundaria de PaIA y GpIA | 51 |
| Tabla 9. Secuencias y masas de SpIA, SpIB y SpIC | 57 |
| Tabla 10. Comparación de SpIA y SpIB con α -conotoxinas | 70 |

INTRODUCCIÓN

La superfamilia Conoidea (también conocida como Conacea) de caracoles marinos está constituida por las familias Conidae, Turridae y Terebridae, que comparten la característica de poseer un aparato venenoso cuyo producto es utilizado principalmente para la captura de la presa. Observaciones hechas en acuarios sugieren que el veneno es usado también como un mecanismo de defensa contra depredadores o bien en el marcaje del territorio contra posibles competidores (Olivera, 1999).

Los primeros estudios sobre estos caracoles fueron hechos a finales de los años 50 (Kohn, 1956, Kohn et al., 1960). En estos estudios se describió por primera vez la forma de caza de dos caracoles del género *Conus* (familia Conidae), *C. striatus* y *C. catus*. Anteriormente se pensaba que todos los caracoles marinos se alimentaban de peces muertos. Este trabajo dejó ver la toxicidad del veneno de estos caracoles, ya que al momento de introducir un pez vivo en una pecera éste era picado por los caracoles; después de haber sido inyectado el veneno, el pez quedaba paralizado rápidamente y simultáneamente era engullido.

Diez años después se inició el estudio sistemático del veneno de 14 especies de caracoles del género *Conus* (Endean y Rudkin, 1963; Endean et al., 1976). Tales experimentos consistieron en inyecciones de extractos crudos del conducto venenoso en diferentes organismos (ratones, caracoles y peces, entre otros). La farmacología del veneno crudo demostró que los distintos venenos de *Conus* tienen diferentes compuestos biológicamente activos, pero hasta ese momento ninguna caracterización bioquímica acerca de los componentes de estos venenos se había hecho.

No fue sino hasta hace poco más de 20 años que el grupo de Baldomero Olivera determinó por primera vez la secuencia completa de un péptido de 13 aminoácidos aislado del veneno de *Conus geographus* (Cruz et al., 1978). El péptido fue llamado α -conotoxina GI y desde entonces miles de publicaciones acerca del veneno de estos caracoles se han escrito en todo el mundo.

La relevancia del estudio del veneno de estos caracoles radica en la selectividad que las toxinas contenidas en él presentan al unirse a diferentes subtipos de canales iónicos, activados por voltaje o por ligandos, y en algunos casos a receptores acoplados a proteínas G. Por lo tanto, la estrategia general cuando el veneno es inyectado es cambiar el funcionamiento del sistema nervioso del animal por la acción de estos potentes agentes farmacológicos, los cuales pueden servir como herramientas moleculares para el estudio de la estructura y función del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados (Olivera et al., 1990; Olivera, 1997; McIntosh et al., 1999a; Bailey y Wilce, 2001).

Generalidades de la superfamilia Conoidea

Todos los caracoles marinos venenosos o toxoglosos que se conocen hoy en día, incluyendo a los caracoles del género *Conus* son agrupados en un taxón más grande, la superfamilia Conoidea (o Conacea), también conocida como el suborden Toxoglossa. Este grupo está constituido por más de 3000 especies distribuidas principalmente entre las familias Conidae, Terebridae y Turridae. Esta clasificación fue hecha exclusivamente con base en las características morfológicas de la concha. Los trabajos realizados por el grupo de Taylor (1993) consideraron la anatomía de la parte anterior del aparato digestivo de las especies estudiadas y llevaron a incluir 3 familias más: Drilliidae, Pseudomelatonidae y Strictispiridae; esta última es la única familia que no presenta un aparato venenoso, junto con la subfamilia Perevicaciinae de los túrridos (Figura 1).

Superfamilia Conoidea

Familia Drillidae

Familia Terebridae

Subfamilia Pervicaciinae

Subfamilia Terebrinae

Familia Pseudomelatomidae

Familia Strictispiridae

Familia Turridae

Subfamilia Clavatulinae

Crassispirinae

Zonulispirinae

Cochlespirinae

Turrinae

Familia Conidae

Subfamilia Clathurellinae

Coninae

Conorbinae

Oenopotinae

Mangeliinae

Daphnellinae

Taraninae

Figura 1. Nueva clasificación taxonómica de los caracoles marinos pertenecientes a la Superfamilia Conoidea (Taylor 1993).

Los caracoles marinos del género *Conus* son uno de los grupos de depredadores más exitosos hoy en día ya que se conocen alrededor de 500 especies vivientes en todo el mundo. Sin embargo, los *Conus* son solamente una fracción minoritaria de la gran diversidad de moluscos venenosos que existen y probablemente haya un número 10 veces mayor de otras especies de gasterópodos que no pertenecen al género *Conus* (Imperial et al., 2003). Por ejemplo, los túrridos son los gasterópodos más ampliamente distribuidos en las aguas someras del noreste del Océano Pacífico y en aguas profundas del Océano Atlántico (Shimek, 1983; Rex et al., 2000). En general, las familias Turridae, Terebridae y Conidae, son las más estudiadas. Las especies que las constituyen habitan en arrecifes coralinos y en zonas intermareales que presentan sustratos arenosos o rocosos, aunque existen especies que habitan a profundidades mayores a los 400 metros (Figura 2).

Los registros fósiles indican que las 6 familias fueron originadas a partir de los túrridos (Taylor et al., 1993). Sin embargo, los más exitosos en cuanto al gran número de especies dentro de un mismo género han sido los *Conus*, los cuales surgieron recientemente (en términos geológicos), hace 50 millones de años, después de la extinción de los dinosaurios. Esta extinción en tierra coincidió con la desaparición en el mar de moluscos depredadores como los amonites, cuya extinción probablemente permitió la primera radiación de los caracoles del género *Conus*; la segunda fue al principio del Mioceno y continúa hasta nuestros días. Se asume que estas radiaciones, en particular de los *Conus*, y en general de los Toxoglossos, fueron debidas a la evolución de nuevos venenos y de sistemas eficientes para la liberación de los mismos (Kohn, 1990).

Una de las características más relevantes de la superfamilia Conoidea es que, a diferencia de otros caracoles cuya rádula consiste de dientes quitinosos variables en número, tamaño y forma (ubicados en la parte anterior de la faringe), que sirven para la masticación de la comida, las familias que la integran presentan dientes radulares de estructura puntiaguda y hueca, en forma de arpón, para inyectar a través de ellos potentes venenos que paralizan los sistemas nervioso y muscular de sus presas. Sin embargo la única familia que ha sido bien caracterizada en cuanto al sistema de captura de la presa ha sido la familia Conidae.

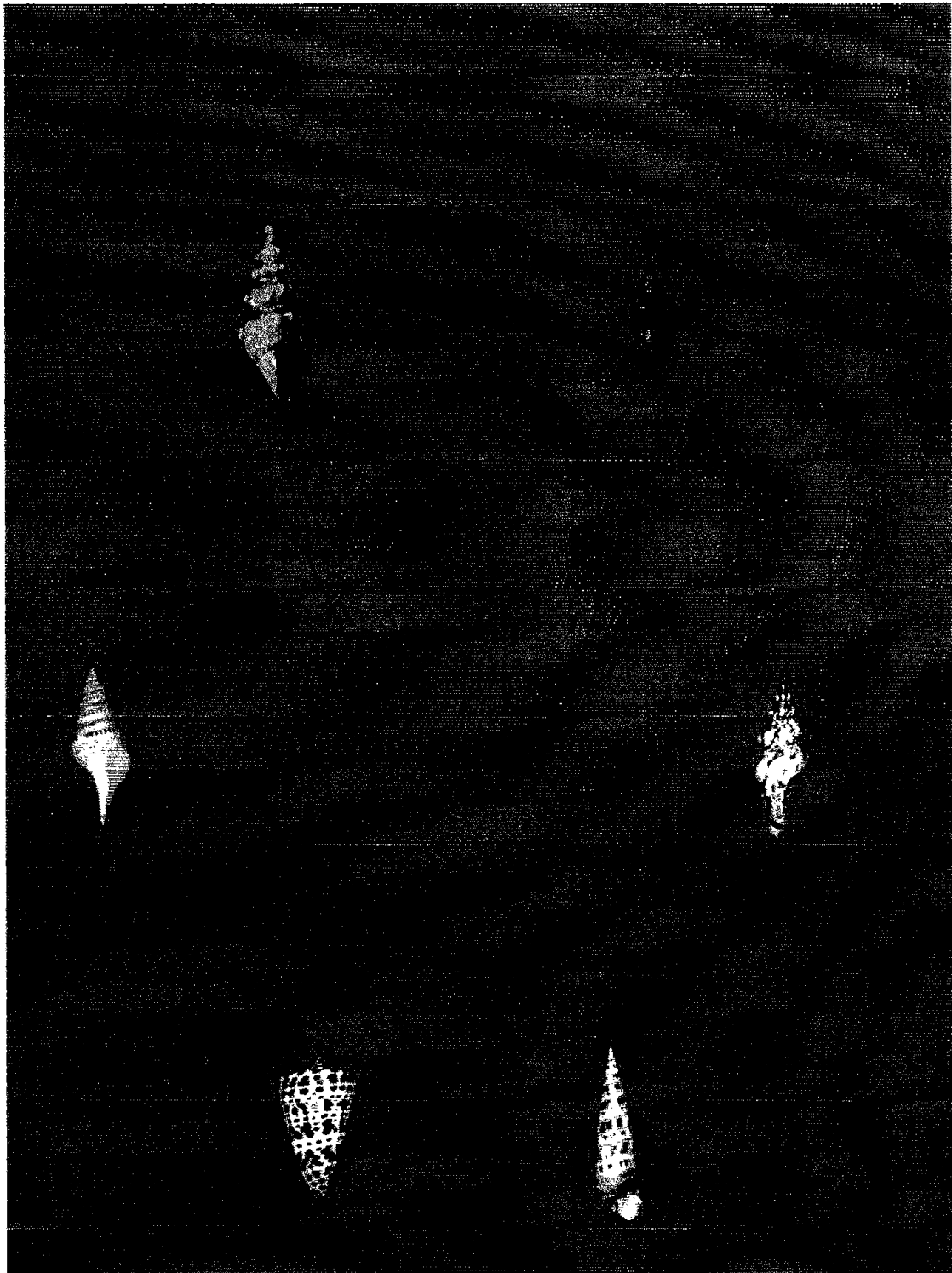


Figura 2. Conchas representativas de cada una de las seis familias propuestas por Taylor (1993).

El aparato venenoso que poseen estas familias está constituido por tres partes: un bulbo venenoso, un conducto venenoso y un saco radular. El veneno es producido en el conducto y es empujado por el bulbo hasta el saco, en el cual se almacenan los dientes desechables en forma de arpón. La caza de la presa la hacen mediante una estructura larga y flexible conocida como probóscide la cual sirve como cordel de pesca debido a que en la punta se localiza uno de los arpones que sirve para inyectar el veneno y sujetar a la presa (Figura 3).

A los miembros del género *Conus* se les ha agrupado dentro de tres grupos, dependiendo de la presa de la cual se alimentan: el grupo más grande es aquel que se alimenta de gusanos, secundándole el que se alimenta de peces y finalmente el que se especializa en moluscos. En los litorales de México se encuentran más de 40 especies de *Conus* cuya mayoría se alimenta de gusanos marinos (Figura 4). Una característica sorprendente de los caracoles del género *Conus*, en especial de las especies piscívoras, es su velocidad de caza, ya que observaciones en acuarios indican que el resultado de una picadura termina en la parálisis completa del pez en menos de 1 segundo (Olivera, 1999; Olivera y Cruz, 2001). Algunas de las especies piscívoras (como *C. geographus*, que habita en la región del Océano Indo-Pacífico) han causado la muerte en humanos (Cruz y White, 1995). Sin embargo son pocos los estudios taxonómicos, toxinológicos y de distribución referente a las otras cinco familias incluidas en la superfamilia Conoidea.



Figura 3. Fotografías tomadas del aparato venenoso de *Conus californicus* y del diente radular de *Conus princeps*. Este es el patrón general de aparato venenoso de todas las especies de caracoles del Género *Conus*. Bv, bulbo venenoso; Cv, conducto venenoso, P; probóscide, R; diente radular en forma de arpón. Un solo arpón es utilizado en la captura de la presa y éste es cambiado por uno nuevo. La escala en color blanco es referente al tamaño del aparato venenoso, mientras que la escala en color marrón es para el diente radular.

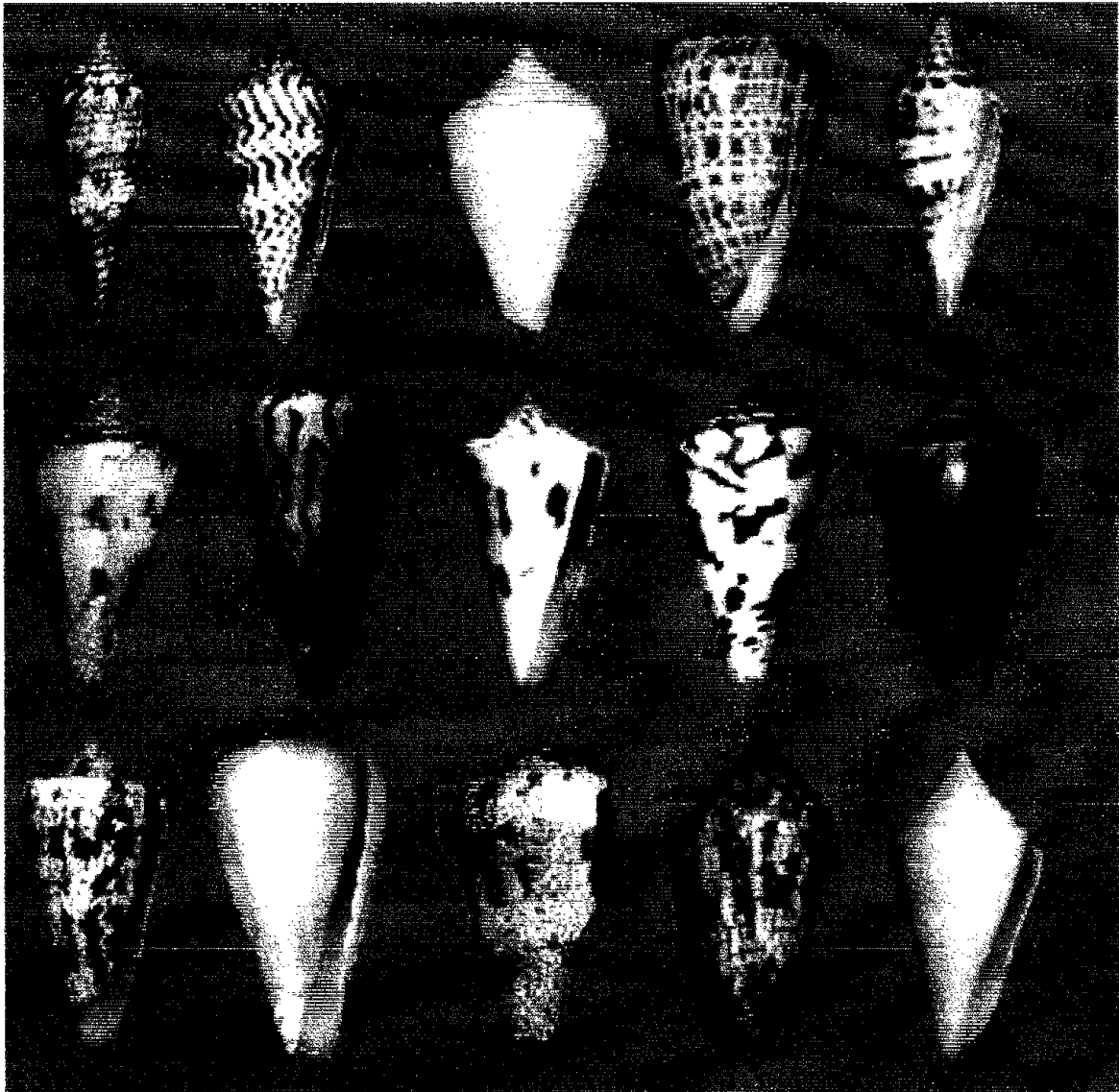


Figura 4. Conchas representativas de las especies de caracoles del Género *Conus* que habitan en las costas mexicanas, de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: *C. granulatus*; *C. delessertii*; *C. austini*; *C. spurius*; *C. mazei*; *C. villepini*; *C. princeps*; *C. poormani*; *C. centurio*; *C. floridanus*; *C. archon*; *C. patricius*; *C. purpurascens*; *C. lucidus* y *C. stimpsoni*.

ANTECEDENTES

Características del veneno del género *Conus*

El veneno de cada especie de *Conus* está constituido por alrededor de 50 a 200 péptidos diferentes entre sí, muchos de los cuales están formados de 6 a 40 aminoácidos, pero la mayoría contiene de 12 a 30 aminoácidos. Una característica común de estos péptidos es la presencia de varios residuos del aminoácido cisteína a lo largo de su estructura primaria, que permiten la formación de enlaces disulfuro intramoleculares que proporcionan una alta estabilidad a la molécula. Los residuos de cisteínas están presentes en patrones definidos, lo cual ha permitido clasificar a los péptidos de acuerdo a este criterio y los miembros de cada clase estructural pueden tener el mismo o diferente blanco de acción. Por ejemplo, el patrón C-C-CC-C-C ("C" indica un residuo de cisteína mientras que "-" indica uno o más residuos de aminoácidos distintos de cisteína) es típico de las ω -conotoxinas, mientras que la disposición CC-C-C corresponde a las α -conotoxinas (Olivera y Cruz, 2001; Jones y Bulaj, 2000). A los péptidos que contienen dos o más enlaces disulfuro se les ha llamado "conotoxinas", mientras que a los que no presentan residuos de cisteínas en su estructura primaria o que tienen solamente un puente disulfuro se les conoce como "conopéptidos" (Figura 5).

Las conotoxinas son más pequeñas que las toxinas de otros animales venenosos como son, por ejemplo, víboras, alacranes y arañas. Las toxinas de estos organismos están compuestas generalmente de 40 a 80 aminoácidos, o más. Debido a su tamaño molecular, las conotoxinas se difunden muy rápidamente en los tejidos de sus presas y alcanzan sus blancos moleculares en un lapso muy breve.

| Superfamilia | Clase de arreglo de cisteínas | | Familia farmacológica |
|--------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| | Patrón | Número asignado | asignada |
| A | CC-C-C | I/II | α |
| | CC-C-C-C-C | IV | αA |
| M | CC-C-C-CC | III | $\mu, \psi, \kappa M$ |
| O | C-C-CC-C-C | VI/VII | $\omega, \delta, \omega O/\kappa$ |
| P | C-C-C-C-C-C- | IX | p |
| S | C-C-C-C-C-C-C-C-C-C | VIII | σ |
| T | CC-CC- | V | T |
| | CC-CPC | X | χ |
| I | C-C-CC-CC-C-C | XI | I |

Figura 5. Número romano asignado de acuerdo al patrón de cisteínas que presentan las familias farmacológicas.

Clasificación de las conotoxinas

Los péptidos mayormente caracterizados y que son los más conspicuos en el veneno de la mayoría de las especies han sido aquellos que contienen múltiples puentes disulfuro, es decir, las conotoxinas. Éstas pueden ser agrupadas en varias familias peptídicas. Los miembros de las familias peptídicas se caracterizan por compartir: 1) un mismo patrón de puentes disulfuro, y 2) un mismo tipo de sitio de acción (blanco molecular). Las familias a su vez se agrupan dentro de superfamilias. Los miembros de cada superfamilia comparten una secuencia señal muy conservada a nivel de precursor y los péptidos maduros tienen, en general, un mismo patrón de cisteínas (McIntosh et al., 1999a). Hasta la fecha se han clasificado siete superfamilias (Figura 6). Por lo tanto, las familias peptídicas representan familias farmacológicas y las superfamilias corresponden de hecho a superfamilias genéticas.

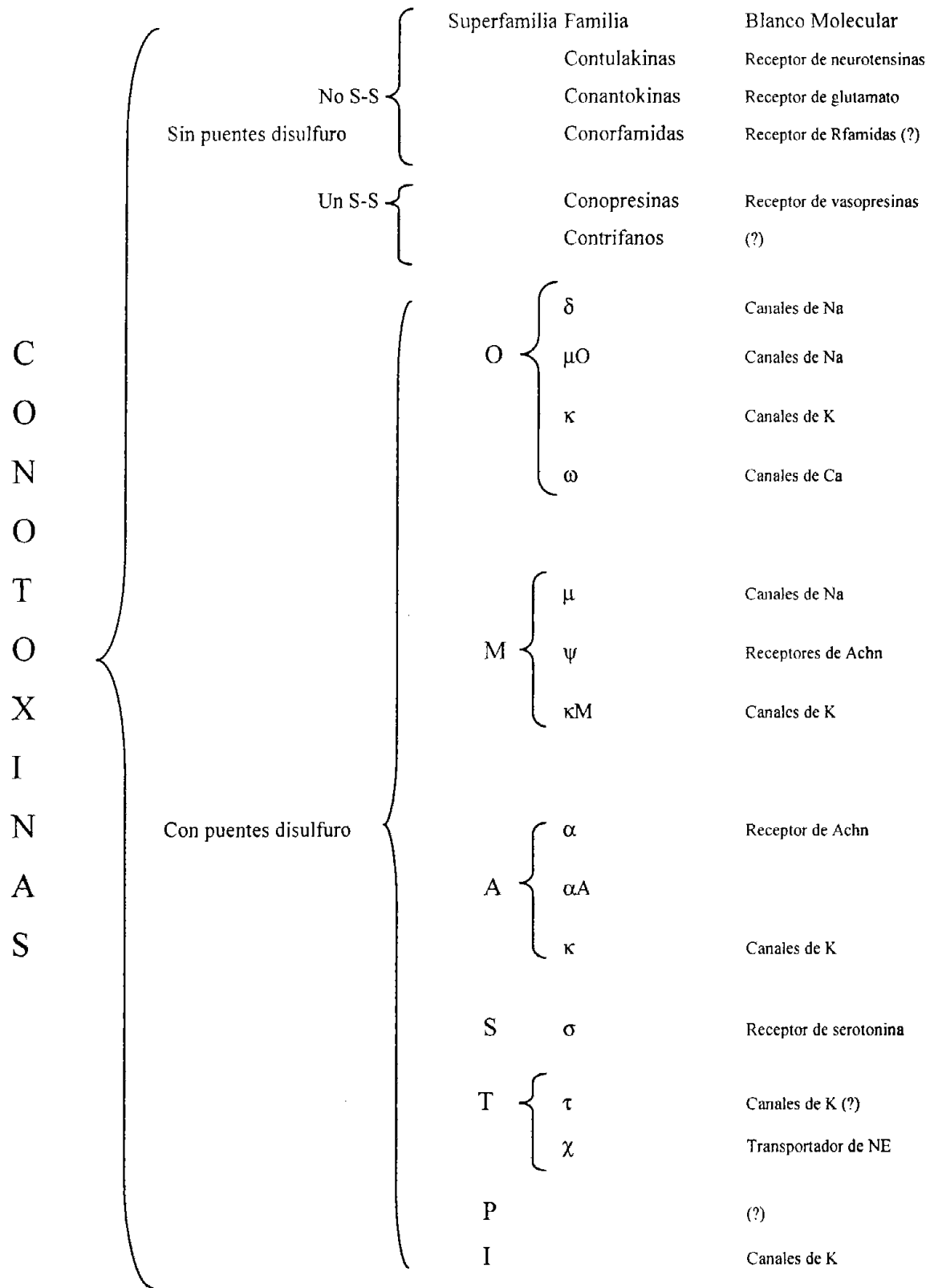


Figura 6. Clasificación de las conotoxinas, en donde se indica la superfamilias, familias y blancos moleculares. Las conotoxinas pueden dividirse en dos grandes grupos: Las que contienen puentes disulfuro y las que no contienen puentes disulfuro o solamente uno.

La **Superfamilia O** abarca distintas familias farmacológicas que incluyen las ω -, κ -, δ - y las μ O-conotoxinas. Las **ω -conotoxinas**, bloquean diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. El grupo donde se han identificado primordialmente es en las especies que se alimentan de peces; sin embargo, también se han encontrado en las especies que se alimentan de moluscos. La ω -conotoxina MVIIA aislada de la especie *C. magus* es específica en inhibir los canales de Ca^{2+} tipo N, mientras que la MVIIIC, de la misma especie, preferentemente bloquea los canales tipo P/Q (Monje et al., 1993; Grantham et al., 1994). Una característica de estas conotoxinas, además de conservar el mismo patrón de residuos de cisteínas, es su alto contenido de residuos de aminoácidos básicos, los cuales se ha demostrado que juegan un papel muy importante en la inhibición de los canales de Ca^{2+} (Tabla 1).

Gracias a la conotoxina MVIIA fue posible caracterizar los canales de Ca^{2+} tipo N en las terminales sinápticas neuronales y por poseer una alta selectividad ha sido usada en protocolos para el tratamiento de dolor crónico en humanos; su nombre comercial es Prialt (Nadasdi et al., 1995; Miljanich, 1997; Shon et al., 2000).

Estudios autorradiográficos indican que el Prialt se une a los canales de Ca^{2+} tipo N en las astas dorsales de la médula espinal donde inervan las vías aferentes nociceptivas. Los únicos tratamientos efectivos contra el dolor crónico están basados en opioides, los cuales bloquean receptores acoplados a proteínas-G. El uso repetido de opioides provoca una regulación a la baja de sus receptores y la aparición de tolerancia. El éxito del Prialt radica en que, a diferencia de los tratamientos basados en opioides, éste no produce regulación a la baja de sus receptores (canales de Ca^{2+}), evitando así el desarrollo de la tolerancia (Miljanich, 1997).

Tabla 1. Conotoxinas que integran la Superfamilia O.

| Péptido | Especie | Subtipo de Receptor | Secuencia |
|------------------|------------------------|-----------------------------|--|
| ω -MVIIA | <i>C. magus</i> | Canales de Ca ⁺⁺ | CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGK* |
| ω -MVIIC | <i>C. magus</i> | Canales de Ca ⁺⁺ | CKGKGAPCRKTMYDCCSGSCGRRGK* |
| δ -TxVIA | <i>C. textile</i> | Canales de Na ⁺ | WCKQSGEMCNLLDQNCDDGYCIVLVCT |
| κ -PVIIIA | <i>C. purpurascens</i> | Canales de K ⁺ | CRIONQKCFQHLDDCCSRKCNRFNKCV |
| κ M-RIIK | <i>C. radiatus</i> | Canales de K ⁺ | LOSCCSLNLRLCOVOACKRNOCT* |
| κ A-SIVA | <i>C. striatus</i> | Canales de K ⁺ | ZKSLVPS ^S VITTCGGYDOGTMCRCNTNSC* |
| R11a | <i>C. radiatus</i> | (?) | GOSFCKADEKOCEYHADCCNCCLSGIC AOSTNWILPGCSTSSFFKI* |
| κ -BtX | <i>C. betulinus</i> | Canales de K ⁺ | CRAY γ GTYC γ NDSQCCLNYCCNGGCGHO CRHP |

O, hidroxiprolina; γ , gammacarboxiglutamato; Z, ácido piroglutámico; S[^], O-glucosilación de la serina; *, amidación del carboxilo terminal.

Las δ -conotoxinas presentan muchos residuos hidrofóbicos al igual que las μ O-conotoxinas y las ω -conotoxinas; la diferencia radica en la secuencia de aminoácidos distintos a cisteínas a lo largo de la secuencia, los cuales confieren esta alta selectividad por los diferentes subtipos de canales de Na⁺ que existen. Las δ -conotoxinas se encontraron por primera vez en caracoles molusquívoros, con una actividad de retraso de la inactivación de los canales de Na⁺ de moluscos; sin embargo la actividad varía dependiendo del sistema en que se ensaye; por ejemplo, la δ -conotoxina TxVIA es muy afin en membranas de cerebro de ratas, sin presentar algún efecto tóxico en otros vertebrados, en experimentos *in vivo* o *in vitro* (Fainzilber et al., 1994) (Tabla 2).

Tabla 2. Conotoxinas que inhiben los canales de Na⁺ sensibles a voltaje.

| Péptido | Especie | Secuencia |
|----------|---------------------------|--------------------------------|
| μ-GIIIA | <i>C. geographus</i> | RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA* |
| μ-PIIA | <i>C. purpurascens</i> | ZRLCCGFOKSCRSRQCKOHRCC* |
| μ-SmIIIA | <i>C. stercusmuscarum</i> | ZRCCNGRRGCSSRWCRDHSRCC* |
| μO-MrIVA | <i>C. marmoreus</i> | ACRKKWEYCIVPIIGFIYCCPQICGPFVCV |

O, hidroxiprolina; Z, ácido piroglutámico; *, amidación del carboxilo terminal.

Las **κ-conotoxinas**, a diferencia de las conotoxinas mencionadas anteriormente, tienen como blancos moleculares a los canales de K⁺ sensibles a voltaje. Son las más diversas de todas las conotoxinas en cuanto al patrón de residuos de cisteínas que presentan; pueden tener 6 residuos de cisteínas con el mismo patrón de las δ, μO y ω-conotoxinas (κ-conotoxinas) o bien con el patrón de la superfamilia M (κM-conotoxinas) o de la superfamilia A (κA-conotoxinas). Las tres familias bloquean al canal de K⁺ tipo "Shaker" clonado de *Drosophila melanogaster* y expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* a concentraciones de 1 μM (Shon et al., 1998; LeGall et al., 1999; Ferber et al., 2003).

Ensayos de unión específica con Saxitoxina (STX) indican que las **μO-conotoxinas** no interaccionan con el sitio I de los canales de Na⁺ y el mecanismo de acción se desconoce. Estudios con preparaciones de células de hipocampo muestran que la μO-conotoxina MrIVA bloquea las corrientes de Na⁺ de manera reversible, tanto en canales sensibles a tetrodotoxina (TTX) como en los no sensibles (Terlau et al., 1999).

Recientemente, se ha caracterizado un grupo muy diverso de conotoxinas con un nuevo patrón de 8 residuos de cisteínas y con propiedades excitatorias en canales de K⁺, y que definen a la **Superfamilia I** (Jimenez et al., 2003; Fan et al., 2003).

La **Superfamilia M** está integrada por las familias μ , ψ y κ M. Las **μ -conotoxinas** bloquean las corrientes de Na^+ compitiendo por el sitio I de los canales de Na^+ sensibles a voltaje, mismo en el que se une la TTX. Hasta ahora son los únicos polipéptidos que bloquean las corrientes en este sitio. La μ -conotoxina GIIIA aislada de *C. geographus* ha sido una de las más estudiadas por diversos investigadores en el mundo (Cruz et al., 1989). Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que el residuo del aminoácido arginina en la posición número 13 es el responsable de ocluir el canal; esta arginina se conserva en las μ -conotoxinas (Becker et al., 1992). Sin embargo, es la arginina en la posición número 14 de la μ -conotoxina PIIIA (*C. pennaceus*) la que da la selectividad de unirse irreversiblemente a los canales de Na^+ musculares en anfibios (Shon et al., 1998).

Recientemente se reportó la μ -conotoxina SmIIIA que bloquea los canales de Na^+ insensibles a TTX en neuronas aisladas de los ganglios dorsales de la médula espinal de ranas (Keizer et al., 2003). Estos resultados sugieren que las μ -conotoxinas son una fuente potencial de antagonistas específicos para el estudio de los diversos subtipos de canales de Na^+ activados por voltaje, a diferencia de las δ y μ O conotoxinas que afectan las corrientes originadas por los canales de Na^+ por otros mecanismos.

Las **ψ -conotoxinas** son las conotoxinas más grandes en cuanto al número de residuos de aminoácidos con efecto antagónico en los receptores de acetilcolina (Tabla 3). Estudios electrofisiológicos de receptores nicotínicos de acetilcolina clonados de músculo esquelético de rata y del órgano eléctrico del pez *Torpedo* han demostrado que las corrientes normales producidas por acetilcolina son antagonizadas por estas toxinas y que la inhibición no es competitiva (Shon et al., 1997).

Tabla 3. Antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina.

| Péptido | Especie | Blanco molecular | Secuencia |
|-----------------|------------------------|------------------|---------------------------------|
| α -MI | <i>C. magus</i> | RnACH muscular | GRCCHPACGKKNYSC* |
| α -SI | <i>C. striatus</i> | RnACH muscular | ICCNPACGPKYSC* |
| α -MII | <i>C. magus</i> | RnACH neuronal | GCCSNPVCHLEHSNLC* |
| α -PNIA | <i>C. penaceus</i> | RnACH neuronal | GCCSLPPCAANNPDYC* |
| α -PNIB | <i>C. penaceus</i> | RnACH neuronal | GCCSLPPCALSNPDYC* |
| α A-EVIA | <i>C. ermineus</i> | RnACH muscular | GCCGKYONAACHOCGCTVGROOYCDROSGC* |
| α A-PIVA | <i>C. purpurascens</i> | RnACH muscular | GCCGSYONAACHOCCKDGROOYCDROSGC* |
| ψ -PIIE | <i>C. purpurascens</i> | RnACH muscular | HOOCCLYGKCRRYOGCSSASCCQR* |

O, hidroxiprolina; *, amidación del carboxilo terminal.

La κ M-conotoxina RIIIK de *Conus radiatus* posee el arreglo de Cisteínas característico de la superfamilia M pero bloquea el poro de canales de potasio tipo "Shaker" (Ferber et al., 2003).

La Superfamilia A está integrada por las familias α , α A y κ A-conotoxinas; las dos primeras son antagonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina y la tercera son antagonistas de canales de K⁺ (Santos et al., 1999b).

Las α -conotoxinas han sido clasificadas en tres grupos con base en el número de residuos que presentan entre la segunda y la tercera cisteína y entre la tercera y la cuarta cisteína: 1) el grupo de las α 3/5; 2) el de las α 4/7; y 3) el grupo heterogéneo donde se ubican péptidos que no pertenecen a ninguno de los dos antes mencionados. Los tres grupos presentan diferente grado de antagonismo en los receptores nicotínicos de acetilcolina (McIntosh et al., 1999b).

Los blancos moleculares de la **subfamilia $\alpha 3/5$** son los receptores nicotínicos de acetilcolina de músculo esquelético. La $\alpha 3/5$ conotoxina MI discrimina en mil veces la interfase α/δ , a diferencia de la interfase α/γ en receptores nicotínicos de mamíferos; no presenta ninguna actividad por otros subtipos como son $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, ni por los homómeros $\alpha 7$ y $\alpha 9$.

Las conotoxinas de la **subfamilia $\alpha 4/7$** son específicas en inhibir los receptores nicotínicos de acetilcolina tipo neuronal. La $\alpha 4/7$ MII presenta una alta afinidad y especificidad por los subtipos $\alpha 3\beta 2$ (McIntosh et al., 1999a). Las toxinas PnIA y PnIB difieren entre ellas solamente en dos aminoácidos en sus estructuras y sus blancos moleculares son los subtipos $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$, respectivamente. Experimentos electrofisiológicos utilizando quimeras de estas dos toxinas han demostrado un cambio dramático en la selectividad y afinidad por los subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales (Luo et al., 1999).

Las **αA -conotoxinas** presentan 6 residuos de cisteínas, sin ninguna homología con las subfamilias $\alpha 3/5$ y $\alpha 4/7$. La αA -EVIA y la αA -PIVA compiten antagónicamente por los receptores nicotínicos de acetilcolina musculares, con una mayor afinidad por el subtipo α/γ a diferencia de las $\alpha 3/5$ (McIntosh et al., 1999a).

Las **κA -conotoxinas** tienen el mismo patrón de cisteínas que las αA -conotoxinas. El péptido SIVA bloquea canales de K^+ en peces y anfibios y fue la primera conotoxina en que se encontró la O-glicosilación de serina como modificación postraduccional (Craig et al., 1998).

Existen dos familias nuevas de conotoxinas con un patrón de cisteínas similar a las α -conotoxinas. Los blancos moleculares de dos de ellas, conocidas como χ y ρ -conotoxinas, están implicados en mecanismos de acción noradrenérgicos. Las **χ -conotoxinas** MrIA y MrIB aisladas de *C. marmoreus*, inhiben a los transportadores de noradrenalina (Sharpe et al., 2001); una diferencia radica en la conectividad de los

puentes disulfuro (1-4, 2-3). La ρ -conotoxina TIA aislada de *C. tulipa* presenta el mismo arreglo que la subfamilia α 4/7, con la misma conectividad de puentes disulfuro pero inhibe a los α 1-adrenoreceptores; este péptido podría pertenecer a la superfamilia A, pero todavía no se ha clonado su precursor. Tres toxinas (CMrVIA, CMrVIB y CMrX) similares (mismo patrón de residuos de cisteína y de puentes disulfuro) a las χ -conotoxinas fueron aisladas del caracol *C. marmoreus* y fueron denominadas λ -conotoxinas (Balaji et al., 2000); sin embargo, sus blancos moleculares se desconocen (Tabla 4). La toxina λ -CMrVIB es idéntica a la χ -MrIA, por lo que los blancos moleculares de las λ -conotoxinas podrían ser también los transportadores de noradrenalina. De hecho, este péptido es idéntico a la toxina mr10a aislada por McIntosh et al. (2000), de la que se sabe que pertenece a la superfamilia T.

Tabla 4. Conotoxinas que inhiben transportadores y receptores noradrenérgicos.

| Péptido | Especie | Blanco molecular | Secuencia |
|------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------------|
| ρ -TIA | <i>C. marmoreus</i> | Receptor de noradrenalina- α 1 | FNWRCCLIPACRRNHKKFC* |
| χ -MrIA | <i>C. marmoreus</i> | Transportador de noradrenalina | NGVCCGYKLCHOC |
| χ -MrIB | <i>C. marmoreus</i> | (?) | VGVCCGYKLCHOC |
| λ -MrVIB | <i>C. marmoreus</i> | (?) | NGVCCGYKLCHOC |
| λ -MrVIA | <i>C. marmoreus</i> | (?) | VCCGYKLCHOC |
| λ -MrX | <i>C. marmoreus</i> | (?) | GICCGVSFCYOC |

O, hidroxiprolina; *, amidación del carboxilo terminal.

Otros miembros de la **Superfamilia T** presentan un patrón distinto de residuos de cisteínas (.CC...CC.) en su estructura primaria; su tamaño promedio es de 10 a 17 aminoácidos y la característica más notable es la gran cantidad de modificaciones postraduccionales que presentan algunos de sus miembros. Las **T-conotoxinas** presentan actividad biológica cuando son inyectadas en peces y la tx5a (de *C. textile*) tiene efecto también en ratones (Walker et al., 1999, Rigby et al., 1999) y reduce la entrada de Ca^{2+} y la liberación del neurotransmisor en la sinapsis colinérgica de *Aplysia* (Rigby et al.,

1999). Estos últimos autores denominaron al péptido tx5a aislado por Walker et al. (1999) como ϵ -TxIX, que define a las **ϵ -conotoxinas** por su posible efecto sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

La **Superfamilia S** está integrada solamente por las **σ -conotoxinas**. La σ -conotoxina GVIII A es el único conopéptido que desplaza competitivamente al antagonista Zacopride de los receptores de serotonina en ensayos de unión específica expresados en la línea celular HEK293; principalmente inhibe al subtipo 5-HT3 (England et al., 1998).

La **Superfamilia P** incluye a los péptidos espasmódicos, nombre dado por inducir una fenocopia del ratón mutante espasmódico, cuando se inyecta intracranalmente (blanco molecular no identificado) (Lirazan et al., 2000).

Conopéptidos

El otro gran grupo de péptidos caracterizados han sido los conopéptidos (Tabla 5). Éstos, a diferencia de las conotoxinas, no presentan residuos de cisteína o bien solamente un par. La mayoría de ellos presentan múltiples modificaciones postraduccionales en algunos de sus aminoácidos y tienen homología con neuropéptidos endógenos. Los primeros conopéptidos de esta naturaleza fueron la **conopresina-G** y la **conopresina-S**, aisladas de *C. geographus* y *C. striatus*, respectivamente, que claramente son nuevos miembros de la familia de las vasopresinas, por la alta similitud que comparten en sus estructuras; además, son agonistas de los receptores de vasopresinas (Cruz et al., 1987).

La **contulakina-G** presenta una similitud con los miembros de la familia de las neurotensinas y se une a los receptores de neurotensina. Es más, produce la misma conducta que ésta cuando es inyectada en ratones (Craig et al., 1999).

La **conorfamida Sr1**, aislada de *C. spurius* por nuestro grupo de investigación, presenta homología con los miembros de la familia de los RF-amido péptidos, algunos de

los cuales activan los canales de Na⁺ activados por protones (DEG/ENaC). Sin embargo el blanco molecular de la conorfamida Sr1 no se conoce (Maillo et al., 2002).

Otros conopéptidos caracterizados son las conantokinas y los contrifanos (Tabla 5). La palabra **conantokina** se deriva del vocablo filipino *antokin* -que significa sueño-, porque cuando se les inyectan estos péptidos directamente en el cerebro a ratones les produce este efecto. Las conantokinas (por ejemplo la conantokina-G, de *C. geographus*) son bloqueadoras de los receptores de glutamato del tipo NMDA. La característica principal es el gran número de modificaciones postraduccionales del residuo glutamato a γ -carboxiglutamato. Estudios de dicroísmo circular han demostrado que en presencia de Ca²⁺ éste es secuestrado por los residuos de γ -carboxiglutamato, confiriendo una estructura α -hélice a la molécula (McIntosh et al., 1984; Olivera et al., 1985; Mena et al., 1990).

La característica principal de los **contrifanos** es la presencia de D-aminoácidos en algunos de sus residuos. El contrifano-Vn modula la actividad de los canales de K⁺ activados por calcio (Raybaudi-Massilia et al., 2001, 2003).

Tabla 5. Otros conopéptidos.

| Péptido | Especie | Blanco molecular | Secuencia |
|-----------------|----------------------|---|--|
| Conopresina-G | <i>C. geographus</i> | Receptor de vasopresina | CFIRNCPLG* |
| Contulakina-G | <i>C. geographus</i> | Receptor de neurotensina | ZSEEGCSNAT ^T KKPYIL |
| Conorfamida-Sr1 | <i>C. spurius</i> | Canales de Na ⁺ | GPMGWVPVFYRF* |
| Conantokina-G | <i>C. geographus</i> | R. Glutamato (NMDA) | GE γ LQ γ NQ γ LIR γ KSN* |
| Contrifano-R | <i>C. radiatus</i> | Canales de K ⁺ | GCOW [@] EPWC* |
| Conodipina-M | <i>C. magus</i> | Actividad de fosfolipasa A ₂ | ZXPSTAELCKINSNACSVPPSXIPCQKXFLAACDRHTCYHC GKHFGFKQDDCDDAFFRDMTALCAHGTDDDEGXCPX |
| Conofisina-R | <i>C. radiatus</i> | (?) | HPTKPCMYCSFGQCVGPHICCGPTGCEMGTAEANMCSEE DEDPIPCQVFGSDCALNNPDNIHGHCVADGICCVDDTCTT HLGCL |

O, hidroxiprolina; γ , gammacarboxyglutamato; Z, ácido piroglutámico; W[@], D-triptofano; T^T, X, aminoácido sin determinar; O-glicosilacion de treonina; *, amidación del carboxilo terminal.

Otros componentes del veneno de *Conus*

La única **conofisina** reportada fue purificada de *C. radiatus* y es el polipéptido más grande caracterizado de los *Conus* hasta la fecha, con 84 residuos de aminoácidos. Esta conofisina contiene catorce residuos de cisteínas y presenta similitud con los péptidos pertenecientes a las familias de las neurofisinas, de tal forma se le nombró a este péptido como conofisina-R. Es el primer miembro de la familia de las neurofisinas purificada de un invertebrado y se cree que es parte del precursor de las conopresinas (Lirazan et al., 2002).

La **conodipina-M** es el único polipéptido de *Conus* que se ha demostrado que presenta una actividad enzimática, de fosfolipasa A2. Está formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por uno o dos puentes disulfuro (McIntosh et al., 1995).

También se han encontrado componentes no peptídicos en el veneno de *Conus*, como son la **serotonina** (McIntosh et al., 1993) y el **ácido araquidónico** (Nakamura et al., 1982).

Nomenclatura de las conotoxinas, conopéptidos y otros componentes del veneno de *Conus*

El nombre que reciben las conotoxinas de cada familia se determina como en el siguiente ejemplo: α -AuIA. La letra griega se refiere a la familia que pertenece una vez que se determinó su blanco molecular (receptores de acetilcolina). Au proviene de la especie de la cual se aisló (*C. aulicus*). El número romano indica el patrón de residuos de cisteína y la letra A se refiere alguna variante específica del péptido. En el caso de los conopéptidos y otros componentes del veneno éstos se nombran de acuerdo a la semejanza que presentan con otros neuropéptidos u otros compuestos endógenos (conopresinas, conorfamidas, conofisinas, contrifanos) o bien por el efecto que producen cuando son inyectados intracerebroventricularmente o intraperitonealmente en algún organismo (conantoquinas, contulakinas) (McIntosh et al., 1999b, Olivera, 2002).

Actividad fisiológica de las conotoxinas

El alto grado de especificidad en la manera de alimentarse de estos caracoles (piscívoros, molusquívoros y vermívoros) sugiere que hay una relación entre la especificidad farmacológica de las toxinas contenidas en los venenos y los tipos de blancos moleculares presentes en cada tipo de presa; así estas neurotoxinas actúan sobre canales y/o receptores específicos según su presa y además ejercen una acción sinérgica con otros componentes de la mezcla de conotoxinas en el veneno para incrementar así la velocidad de acción. Como ejemplo de la actividad de las conotoxinas se han demostrado para la especie *Conus purpurascens* dos fases de acción de su veneno para inmovilizar a su presa.

La primera fase del efecto fisiológico consiste en un choque excitotóxico que requiere la acción combinada de: 1) un péptido que evita el cierre de canales de sodio dependientes de voltaje una vez abiertos, permitiendo así la entrada de este ión a la célula, y 2) de una segunda toxina que inhibe la salida de potasio de ciertos subtipos de canales para este ión. La combinación del incremento de sodio hacia el interior de la célula y la disminución de la salida de potasio da como resultado una despolarización de la red neuronal en el sitio de inyección (Terlau et al., 1996).

La segunda fase es producida por péptidos del mismo veneno que actúan de forma sinérgica bloqueando la transmisión neuromuscular. Este bloqueo se da de tres maneras: 1) por un grupo de péptidos que antagonizan diferentes subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje y de este modo se inhibe la liberación del neurotransmisor (Olivera et al., 1984); 2) por el antagonismo competitivo y no competitivo del receptor de acetilcolina postsináptico que previene la despolarización del músculo (Gray et al., 1984; Shon et al., 1997); y 3) por el bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje en músculo esquelético (Spence et al., 1977; Stone y Gray, 1982; Nakamura et al., 1983) (Figura 7).

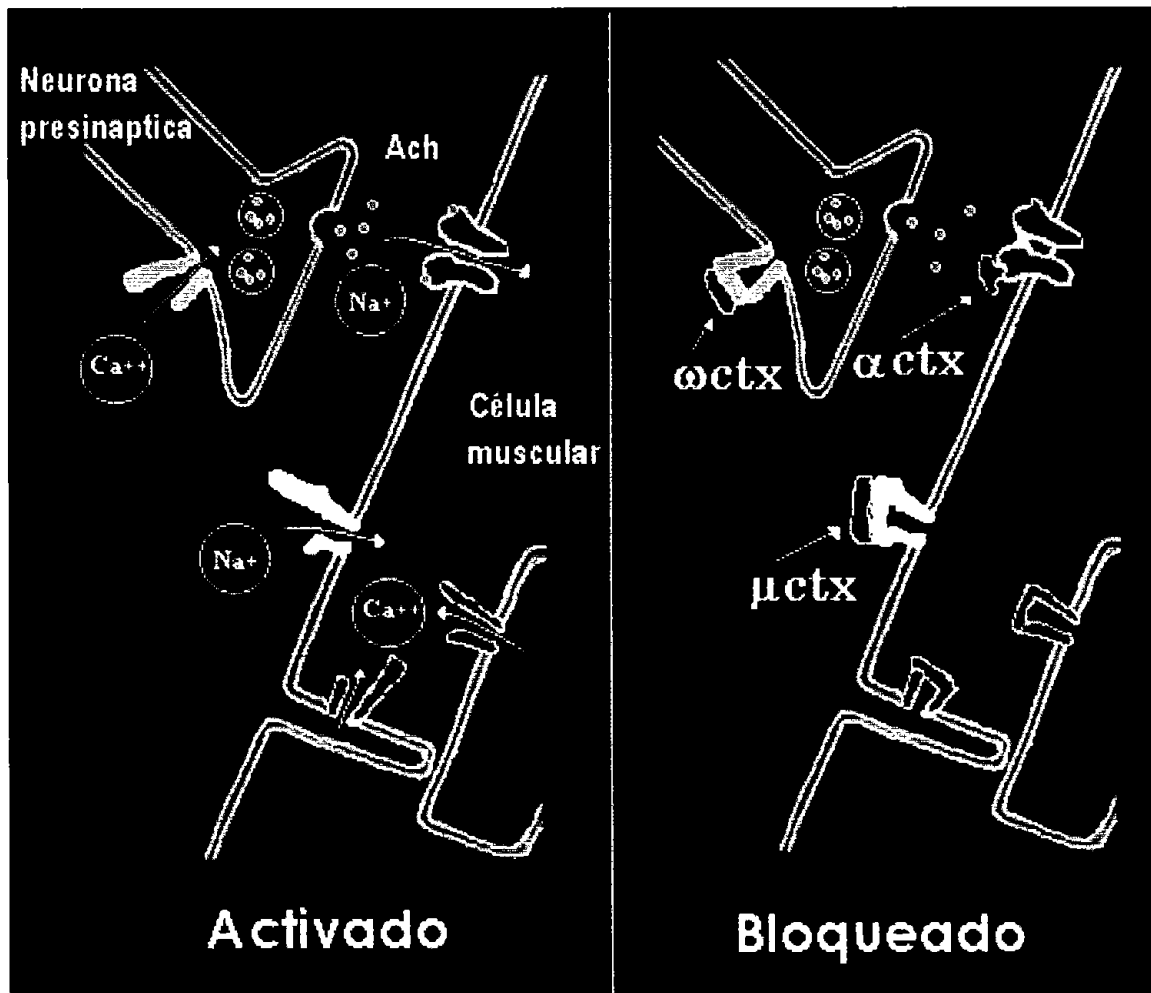


Figura 7. Mecanismo de inhibición en la transmisión neuromuscular 1) canales de Ca^{2+} ; 2) receptores de acetilcolina nicotínicos ; y 3) canales de Na^+ sensibles a voltaje en músculo esquelético

Características del veneno de la familia Terebridae

Se han caracterizado hasta la fecha solamente 3 toxinas de las especie *Terebra subulata*, a las cuales se les ha nombrado como augertoxinas, debido a que las conchas de los terébridos presentan una forma de broca ("auger" en inglés). Las tres augertoxinas S6a, S7a y S11a (mismo sistema de nomenclatura que para las conotoxinas), presentan patrones de residuos de cisteínas similares a la superfamilia O (S6a y S7a) y a la superfamilia I (S11a), respectivamente. Sin embargo, las primeras son de mayor tamaño, alrededor de 42 residuos de aminoácidos. Los precursores de éstas conservan las tres regiones de los precursores de las conotoxinas, sin ninguna similitud entre ellos. El efecto observado cuando fueron inyectadas en *C. elegans* fueron problemas de coordinación motriz durante 10 minutos y eventualmente los gusanos se recuperaron (Imperial et al., 2003) (Tabla 6).

Tabla 6. Augertoxinas.

| Péptido | Secuencia |
|----------|---|
| Agx-s6a | SLDEELKSNDCPEYCPHGNECCEHHECRYDPWSRELKCLDS |
| Agx-s7a | ATNRHQCDTNDCEEDECCVLVGGNVNPNPGVQTRICLACS |
| Agx-s11A | DCEQHTDCSAASGPVYCCQDSDCCGGVDYICTNYGQCVRHF |

JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los caracoles marinos venenosos (superfamilia Conoidea) que han sido estudiados pertenecen a la familia Conidae, y sólo recientemente se inició el análisis de las toxinas de la familia Terebridae. Dado que la familia Turridae es considerada antecesora, en términos evolutivos, de la familia Conidae, el estudio de las toxinas de los túrridos permitiría comenzar a entender cuáles son las características que comparten estas dos familias a nivel de sus toxinas y por lo tanto de sus estrategias de caza y, por ende, de supervivencia.

La mayoría de los caracoles del género *Conus* que han sido estudiados son de especies con hábitos alimenticios piscívoros y molusquívoros. Los blancos moleculares de las toxinas que se han caracterizado de estos dos grupos se dirigen a canales iónicos y receptores involucrados en la transmisión neuromuscular. El estudio de los péptidos presentes en el veneno de más especies vermívoras ampliará el conocimiento sobre las estrategias moleculares (sitios y modos de acción) empleadas por este tipo de caracoles cónidos. Por ejemplo, las conotoxinas α han sido encontradas sólo en una de las especies (*Conus imperialis*) vermívoras que han sido estudiadas; esta especie habita en las aguas del Océano Indo-Pacífico y no hay información reportada sobre conotoxinas α de especies de otras regiones del mundo.

El propósito de este estudio es doble: 1) iniciar la caracterización, a nivel mundial, de los péptidos del veneno de los túrridos, en dos especies que habitan en aguas mexicanas, *Gemmula periscelida* y *Polystira albida*, para empezar a comprender las estrategias biológicas de este tipo de depredadores marinos, y 2) encontrar, tanto bioquímicamente como molecularmente, péptidos y precursores relacionados a las conotoxinas α en una especie vermívora del Mar Caribe mexicano, *Conus spurius*.

HIPÓTESIS

1. Dado que los túrridos *Gemmula periscelida* y *Polystira albida* presentan el mismo tipo de aparato venenoso que los cónidos sus venenos contienen toxinas de naturaleza peptídica con patrones definidos de residuos de cisteínas similares a los encontrados en las conotoxinas.
2. Dado que las α -conotoxinas han sido encontradas en los venenos de los *Conus*, independientemente de su tipo de alimentación, la especie vermívora *Conus spurius* produce α -conotoxinas (identificadas por similitud de secuencia a nivel de la toxina madura y del precursor) y éstas tienen los mismos blancos moleculares (nAChR) y mecanismos de acción (antagonismo competitivo) que las α -conotoxinas reportadas previamente en otras especies.

OBJETIVOS

1. Aislar y caracterizar alguno de los componentes del veneno de cada una de las dos especies de túrridos.
2. Determinar la actividad biológica de las "turritoxinas".
3. Demostrar la presencia de α -conotoxinas en la especie *C. spurius*, desde los puntos de vista bioquímico y de biología molecular.
4. Determinar la actividad de las α -conotoxinas de *C. spurius* sobre distintas preparaciones biológicas: organismo intacto (ratones) y "fracción" molecular (nAChR musculares y neuronales).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y trasportación de los especímenes

Los caracoles de las especies *P. albida* y *G. periscelida* fueron capturados mediante arrastres realizados en la campaña oceanográfica XCAMVO I en la sonda de Campeche con el buque oceanográfico Justo Sierra, perteneciente a la Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM. Los ejemplares de la especie *C. spurius* se obtuvieron a través de redes camarónicas, en las costas de Quintana Roo. El manejo de los caracoles capturados fue bajo estricta congelación (en hieleras con hielo seco) hasta la llegada al laboratorio de Neurofarmacología Marina en el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Obtención de los conductos venenosos

Una vez quebradas las conchas (a través de un tornillo de banco) y liberados los organismos, la disección de los conductos venenosos de *P. albida* y *G. periscelida* se hizo bajo un microscopio estereoscópico, mientras que para *C. spurius* estos se obtuvieron a simple vista. La disección se realizó con la ayuda de unas pinzas y tijeras, con el cuerpo del caracol puesto en una caja Petri sobre hielo. Los conductos venenosos una vez aislados se colocaron en un amortiguador de extracción con una composición de 40% (v/v) de acetonitrilo (ACN) y 2% (v/v) de ácido trifluoroacético (ATF). Para los experimentos de clonación, un ejemplar fue inmediatamente congelado con nitrógeno líquido.

Extracción de los venenos

La extracción del veneno se realizó mediante la homogeneización de los conductos venenosos, siendo el número de éstos variables (ver resultados) en una proporción 5:3 (v/v) de amortiguador de extracción a 4 °C, utilizando un homogeneizador de vidrio con émbolo del mismo material. Una vez obtenido el homogeneizado éste se

centrifugó a 17,000g por 30 minutos a 4 °C. El sedimento se desechó y el sobrenadante se conservó como la fracción que contiene los péptidos.

Separación y purificación de los componentes de los venenos

Los péptidos que constituyen el veneno de estas especies se separaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, con una columna analítica C18 (Vydac 218TP54; 4.6 x 250 mm; 5 µm tamaño de partícula; 300 Å tamaño de poro) y con una precolumna C18 (Vydac 218GK54; 5 µm tamaño de partícula; 300 Å tamaño de poro; 4.6 x 10 mm). Los péptidos se eluyeron a temperatura ambiente con un gradiente que va de 5% de amortiguador A (0.1% de ATF) a 95% de amortiguador B (90% de ACN y 0.085% de TFA), con un incremento de 1% de B por minuto; la detección fue realizada con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm de longitud de onda.

La colecta de los péptidos se realizó de manera manual en tubos Eppendorf de 1.5 ml de volumen, evitando lo máximo posible contaminación de las fracciones adyacentes.

Repurificación de los péptidos

La repurificación de las variantes de conotoxinas alfa se realizó mediante tres recromatografías del material obtenido en la primera elución. Los gradientes de repurificación se diseñaron tomando en cuenta el % de B de elución aparente calculado a partir del tiempo de retención para dicho material; a partir de ese valor se corrió un gradiente de separación que va de 5% de B menor a 5% de B mayor a su % de B de elución aparente. En la primera repurificación se utilizó un gradiente de 1% de B cada tres minutos con la misma columna analítica C18 (Vydac), mientras que la segunda repurificación se usó un gradiente de 1% de B cada siete minutos con el uso de dos columnas analíticas C8 (Pharmacia Biotech, Sephasil peptide, 5 µm, 4.6 x 100 mm; Agilent, Eclipse XDB, 5 µm, 4.6 x 150 mm) conectadas en serie y con una precolumna C8 (MetaGuard, Nucleosil, 5 µm, 4.6 x 10 mm); en la última repurificación se usó el gradiente de 1% de B cada tres minutos con la columna analítica C4 (Nucleosil, 5 µm, 300 Å, 4.6 x 250 mm) con una precolumna C4 (Delta-Pack, 5 µm, 4.6 x 20 mm).

Análisis de la estructura primaria

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos de interés purificados (intactos, reducidos totalmente y alquilados con 4-vinilpiridina, o reducidos parcialmente y alquilados con N-etilmaleimida [ver Determinación de los puentes disulfuro]) fueron analizadas mediante la utilización de un secuenciador automático de proteínas bajo el principio de degradación de Edman (Procise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems, Foster City CA). Se usó el método Pulsed-liquid, modificado para optimizar la separación de los derivados PTH-Lys y PTH- Leu.

Reducción y alquilación total de los péptidos

La reducción total fue hecha utilizando como cantidad mínima, 1 nmol de péptido previamente purificado y concentrado a sequedad; éste fue disuelto en 100 µl de 0.1 M Tris-base con 6 M de clorhidrato de guanidina y reducido con 45 µl de 15 mM de ditioneitról a 65 °C por 25 minutos. La alquilación se hizo agregando 4-vinilpiridina en una proporción de 4 µl/ml y desplazando el aire del tubo con nitrógeno. Se colocaron los tubos en la oscuridad, se mezclaron y se incubaron 16 horas a temperatura ambiente. Los péptidos reducidos y alquilados fueron purificados por HPLC de fase reversa utilizando la columna analítica C18 (Vydac), con un gradiente discontinuo de 10% de solución B durante 15 minutos incrementado después 1% B cada minuto.

Determinación de las masas moleculares

Se utilizó espectrometría de masas por desorción láser. Los espectros de iones positivos de las muestras de cónidos se obtuvieron mediante un espectrómetro de doble trampa iónica (Finnigan LCQ DUO/Thermo Electron Corporation). Estos resultados fueron obtenidos por el Dr. César Batista en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Los espectros de iones positivos de los péptidos de túrridos se obtuvieron usando un espectrómetro Voyager-DE STR MALDI (Perceptive Biosystems/Global Medical

Instrument). Espectros obtenidos por la unidad de espectrometría de masas del departamento de Química, en la Universidad de Utah, Salt Lake City.

Determinación de los puentes disulfuro

La identificación de la conectividad entre los residuos de cisteína se hizo mediante la estrategia de reducción parcial y alquilación en medio ácido, repurificación del péptido parcialmente alquilado, y secuenciación. La reducción parcial se realizó con 12 nmoles de producto de partida (péptido puro), el cual fue disuelto en 10 μ l de amortiguador de citrato 0.1 M (pH 3.0) con 6 M de guanidina y 27.1 μ l del mismo amortiguador con 0.1 M de tri-carboxietilfosfina (TCEP). Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, al término de los cuales se agregó 68 μ l de N-etilmaleimida (NEM) 0.1M disuelta en el mismo amortiguador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los derivados de esta reacción fueron cromatografiados utilizando un gradiente lineal de 10 %B a 30 %B en 120 min con un flujo de 1 ml/min, con el uso de las dos columnas C8 conectadas en serie.

Extracción del ARN total

La extracción de ARN total se realizó empleando el reactivo TRIZOL (Gibco BRL), siguiendo las instrucciones del proveedor. El principio de aplicación de este reactivo se basa en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). El TRIZOL consiste en una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina (purificador de ácidos nucleicos e inhibidor de ribonucleasas, respectivamente) y permite la extracción del ARN en un solo paso. La obtención del ARN total fue a partir de 100 mg de tejido (conducto venenoso con glándula de veneno) de un solo ejemplar que fue previamente congelado con nitrógeno líquido. El ARN purificado se cuantificó en un espectrofotómetro de luz U.V. midiéndose la absorción a 260 nm y finalmente se visualizó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Transcripción inversa del ARNm

En un tubo Eppendorf se mezclaron 10 µg de RNA total con 1µl de oligonucleótido antisentido (oligo-dT) y el volumen necesario de agua para completar 11.5 µl de reacción total. La muestra se incubó a 65° C por 3 minutos y posteriormente se mantuvo en hielo hasta la preparación de los demás reactivos. En otro tubo Eppendorf se mezclaron 4 µl de amortiguador BRL-5X, 2 µl de DTT 0.1 M, 1µl de dNTP's 20 mM, 0.5 µl RNAasin, y 1 µl de la enzima Superscrip II. Esta mezcla se juntó con la previa de ARN total. Se incubó a 42° C por 2 h y posteriormente a 65° C por 20 min. Finalmente se agregó 1 µl de de RNAasa H, por 20 min a 55° C.

Amplificación del ADNc

Los reactivos necesarios para la amplificación fueron 3 µl de cDNA, 6.5 µl de amortiguador de PCR + Mg²⁺, 0.5 µl de cada uno de los oligonucleótidos 5' y 3' específicos para el precursor de las conotoxinas alfa [10 µg/µl], 0.5 µl de dNTP's, 0.3 µl de la enzima Taq +PFU y 38.7 µl de H₂O para completar una reacción de 50 µl totales. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son:

Oligonucleótido precursor de conotoxinas alfa (5') 5'-ATG GGN ATG MGN ATG ATG TT-3' (Met-Gly-Met-Arg-Met-Met-Phe, MGMRMME).

Oligonucleótido parte terminal de conotoxina alfa (3') 5'-CA NAR YTC NGG RTA YTC CAT-3' ("Cys-Leu-Glu-Pro-Tyr-Glu-Met", "CLEPYEM").

El programa utilizado para llevar a cabo la amplificación del precursor de las conotoxinas alfa fue:

| | |
|-------------------|--------------|
| | 94 °C 3 min |
| Desnaturalización | 94 °C 40 seg |
| Alineamiento | 55 °C 40 seg |
| Extensión | 72 °C 1 min |
| | 72 °C 15 min |
| | 4 °C * |

La purificación de la banda esperada fue realizada siguiendo las indicaciones del juego de reactivos de GIBCO (Rapid Gel Extraction Protocol).

Ligación del ADNc

En un tubo se mezclaron 7.5 µl de la banda purificada, 0.5 µl del vector PGEM-T, 1 µl T4 DNA ligasa y 1 µl del amortiguador 5X de la ligasa; se incubó a 4° durante 16 h.

Transformación de bacterias

Se mezclaron 4 µl de la ligación con 50 µl de bacterias competentes (cepas utilizadas, DH5α y JM109) en frío por 30 min. Después se realizó un choque térmico a 41 °C por 2 min y 2 min más en hielo. Se agregó 250 µl de SOC y se incubó por 1 h a 37° C a 250 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se sembraron en una caja de Petri previamente tratada con 1 µl de IPT-G + 40 µl de X-GAL a 37° C por 15 h. Las colonias positivas se cultivaron en 3 ml de medio líquido con ampicilina. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando las instrucciones del juego de reactivos de Sigma (Gen Elute Plasmid Mini-prep Kit).

Secuenciación del ADNc

La secuencia del ADNc fue determinada mediante el método de Sanger en un secuenciador automático Applied Biosystems (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Neurobiología-UNAM).

Bioensayo conductual en ratones

Se utilizaron ratones de 17 días de edad, los cuales fueron inyectados intracranealmente con 1 nmol de los péptidos SpIA y SpIB disueltos en 20 μ l de solución salina normal o con un volumen igual de solución salina normal como control. Después de la inyección los ratones fueron puestos en cajas de acrílico y observados durante dos horas.

Bioensayo de sobrevivencia en larvas de mosca

Se midió la sobrevivencia de larvas de mosca (*Drosophila melanogaster*) en su tercer estadio de desarrollo, luego de ser inyectadas en el cuarto segmento anterior con un volumen de 4.6 nanolitros de dosis conocidas de la toxina a ensayar (10^{-7} y 10^{-6} M), y compararla con la que presentan larvas de moscas inyectadas solamente con solución de Ringer para mosca (composición (mM): KCl, 182; NaCl, 46; CaCl₂, 3; Tris-Cl, 10; pH = 7.2) o con concentraciones de 10^{-4} y 10^{-5} M de albúmina sérica bovina.

Ensayo electrofisiológico

Los estudios electrofisiológicos consistieron en registros de "patch-clamp" en la modalidad de célula completa en dos líneas celulares. Las células TE671 de origen humano como prototipo para el estudio de MnAChR; y células cromafines de rata las cuales expresan los subtipos $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ del NnAChR. Los registros fueron realizados fijando el voltaje de las células a - 60 mV y perfundiendo éstas con periodos cortos de 2 a 30 segundos con concentraciones variables de nicotina y/o los péptidos (SpIA, SpIB,

SpIC) a evaluar (50 ó 100 nM). La mayoría de estos experimentos fueron realizados por el Dr. Enzo Wanke (Universidad de Milán, Italia).

RESULTADOS

Identificación de los organismos

Los organismos utilizados para este estudio se muestran en la Figura 8. Sus conchas fueron previamente limpiadas (eliminación del periostraco) con la finalidad de ver claramente los caracteres morfológicos externos y con ello facilitar su identificación. Las tres especies corresponden a las especies *Conus spurius*, *Gemmula periscelida* y *Polystira albida*. Los caracteres que permitieron la determinación de los organismos son los que se describen a continuación:

Conus spurius

El tamaño promedio fue de 8 cm de largo, coloración blanca con un patrón de manchas en forma de cuadros de color café en una disposición en espiral y el color de la apertura es blanco

Gemmula periscelida

Tamaño de 4 a 5 cm de largo, con el canal en forma de U (turri-muesca) por debajo de la sutura. Presenta una serie de ornamentaciones en forma de rosario a lo largo de cada una de las vueltas más prominentes. La concha es de color blanco marfil.

Polystira albida

Tamaño de 7 a 10 cm de largo, concha de color blanca. Presenta de 5 a 7 vueltas principales de tamaños irregulares. La turri-muesca está en la parte superior del labio exterior.

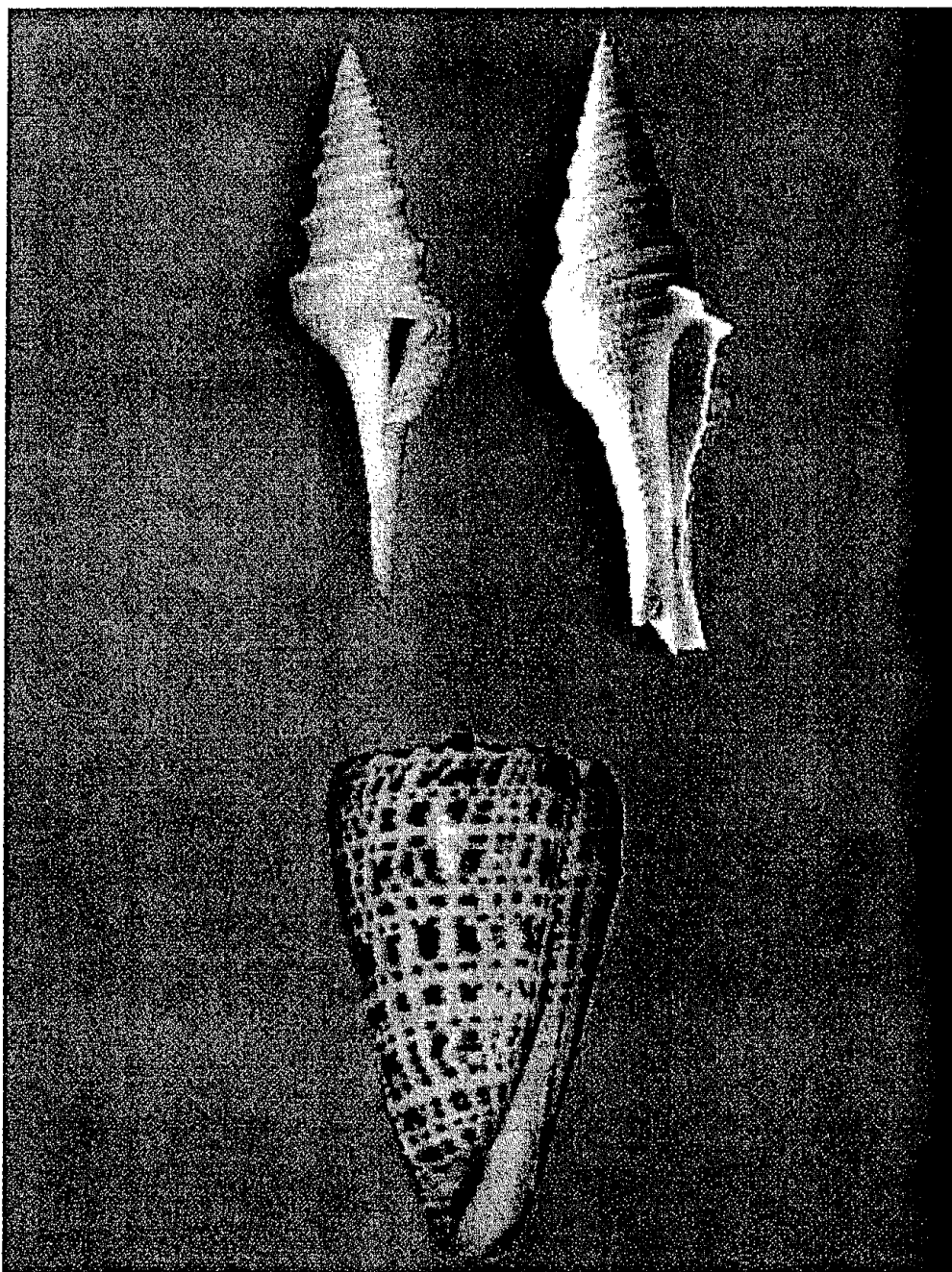


Figura 8. Conchas representativas de las especies utilizadas en este trabajo. De izquierda a derecha y de arriba abajo. *Gemmula periscelida*, *Polystira albida* y *Conus spurius*. Las especies se encuentran a profundidades entre 100 y 300 m.

Separación de los componentes de los venenos de los tórridos

El contenido de los conductos venenosos de 1 y 6 especímenes de *G. periscelida* y *P. albida*, respectivamente, fueron fraccionados por la técnica de HPLC en fase reversa. En ambas especies los cromatogramas presentaron una gran cantidad de componentes que absorben a 220 nm (Figura 9). El pico mayoritario de cada uno de los cromatogramas (PaIA y GpIA en la figura.9 A y B) fueron analizado posteriormente.

Secuenciación de los péptidos PaIA y GpIA

Debido a la escasez de material obtenido de los péptidos PaIA y GpIA indicados arriba, éstos fueron sometidos al análisis de sus estructura primaria sin la previa repurificación y la reducción/alquilación individual. El resultado del análisis de la secuenciación del péptido PaIA reveló 83 feniltiohidantoin-aminoácidos (PTH-aa) de un total de 85 ciclos y no se observaron derivados de PTH-aa en las posiciones 31 y 84. Este resultado representó el 50% del total del material (660 pmol). Cabe mencionar que el rendimiento promedio de la secuenciación automática es de 50 aa y dicho rendimiento depende de las características de cada péptido. Sin embargo, los 85 aa de la secuencia de PaIA fue obtenidos en una sola corrida de manera inesperada. El péptido GpIA al momento de ser secuenciado mostró claramente un total de 38 PTH-aa. Éste fue utilizado en su totalidad para este análisis, lo que representó 28 pmol (Tabla 7). La cuantificación de ambos péptidos se estimó mediante el patrón inyectado de los PTH-aa cuya cantidad es de 10 pmoles. Los péptidos fueron nombrados como PaIA y GpIA respectivamente, siguiendo la nomenclatura propuesta por Olivera (McIntosh et al., 1999b; Olivera, 2002).

Determinación de la masa del péptido PaIA

El péptido PaIA dio dos señales mayoritarias de m/z a 11,869.7 y 5,934.1, consistentes con los iones moleculares $(M + H)^+$ y $(M + H)^{2+}$, respectivamente. La masa promedio experimental (11,867.5 Da) difiere en 931.6 Da de la calculada (10,935.9 Da)

con base en la secuencia determinada, lo cual indica aparentemente la falta de 8 residuos (tomando un promedio de 110 Da por residuo); esto significa que tenemos dilucidado un 91% de la estructura primaria de este péptido.

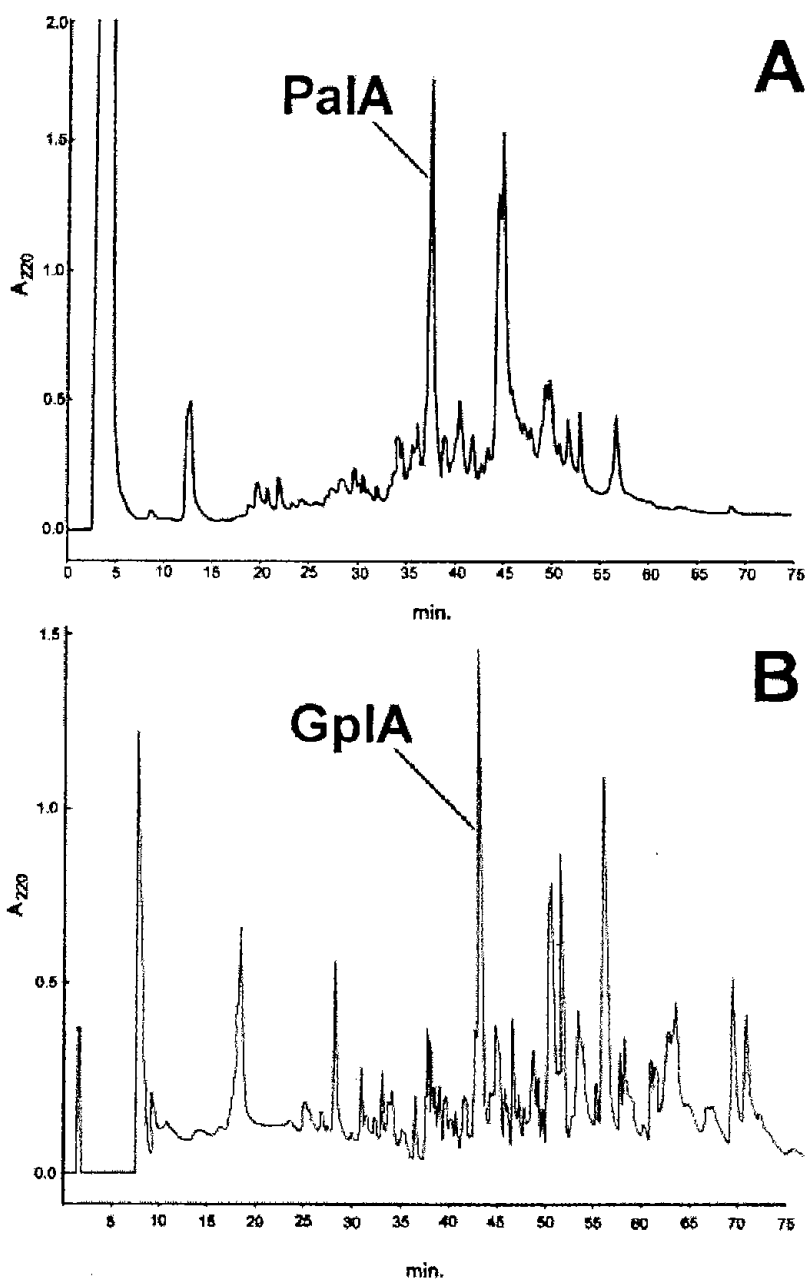


Figura 9. Perfil cromatográfico del veneno de *P. Albida* (A) y *G. Persicelida* (B), obtenidos por HPLC de fase reversa. Los péptidos eluyeron utilizando un gradiente de 5-100% solución B durante 95 min. Los nombres PaIA y GpIA indican los péptidos que fueron estudiados.

Evaluación biológica del péptido PaIA

Por ser PaIA el primer péptido aislado de un turrado, se realizó su evaluación biológica a través de inyecciones en larvas de *Drosophila melanogaster*. Esta metodología permite una evaluación rápida de la toxicidad, así como el uso de nanolitros de material. La inyección de Ringer Krebs de mosca (control negativo) permitió obtener un 82% (ESM 1.2) de sobrevivencia; el 18% restante correspondió a muertes provocadas por la manipulación. El uso de albúmina 10^{-5} y 10^{-4} M dio un 84% (ESM 2.8) y 85% (ESM 1.19) de sobrevivencia, respectivamente. La albúmina fue utilizada como un control de osmolaridad. El control positivo fue realizado mediante inyecciones con Saxitoxina (STX); las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} M redujeron significativamente ($p < 0.01$ y $p < 0.01$, respectivamente) la sobrevivencia de las larvas, en relación al control negativo. El péptido PaIA usado a las mismas concentraciones que la STX produjo una sobrevivencia del 73% (ESM 1.9; 10^{-7} M) y 63% (ESM 1.9; 10^{-6} M); el último valor fue significativo ($p < 0.01$) en comparación con el control negativo y el control de osmolaridad. El efecto de toxicidad producido por PaIA a 10^{-6} se asemeja a valores intermedios entre 10^{-6} y 10^{-5} del alcaloide STX (bloqueador específico de canales de Na^+) (Figura 10).

Alineamiento de las secuencias de los péptidos GpIA y PaIA

Los resultados del alineamiento entre los péptidos PaIA y GpIA utilizando el programa CLUSTAL W 1.81 mostraron que estos péptidos comparten dos regiones con una alta similitud (Tabla 8). De los 38 residuos obtenidos para GpIA 14 de ellos se encuentran en posiciones idénticas en PaIA e interesantemente 5 de éstos son metioninas; además presentan similitudes con residuos polares y apolares en 11 posiciones más. El alto grado de conservación de residuos pocos frecuentes en proteínas (Metionina) sugiere un papel estructural importante de este tipo de aminoácido en los péptidos PaIA y GpIA.

Tabla 7. Secuencia parcial de aminoácidos de los dos péptidos aislados de las especies *G. periscelida* y *P. albida* respectivamente.

| Péptido | Secuencia | | | | |
|---------|--|----|----|----|----|
| GpIA | RYGRSYAMSH MPMSRMGRKM YQNYMYRRMQ ATK MM QYH* | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | |
| PaIA | CKRLFYRYYS HPGNY MYL GH YGRY YNML HN CN AMLLA HQ M | | | | |
| | 10 | 20 | 30 | 40 | |
| | Q AMRRY QH RM RVK QMY RR IK MKQMY R HMKW MGM Y RQAKAA RLRCI* | | | | |
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |

Los amino ácidos están escritos en el código de una letra. Las metioninas en negrillas indican la frecuencia de este amino ácido en la secuencia. Los residuos de cisteínas no han sido determinadas definitivamente. * Secuencias parciales.

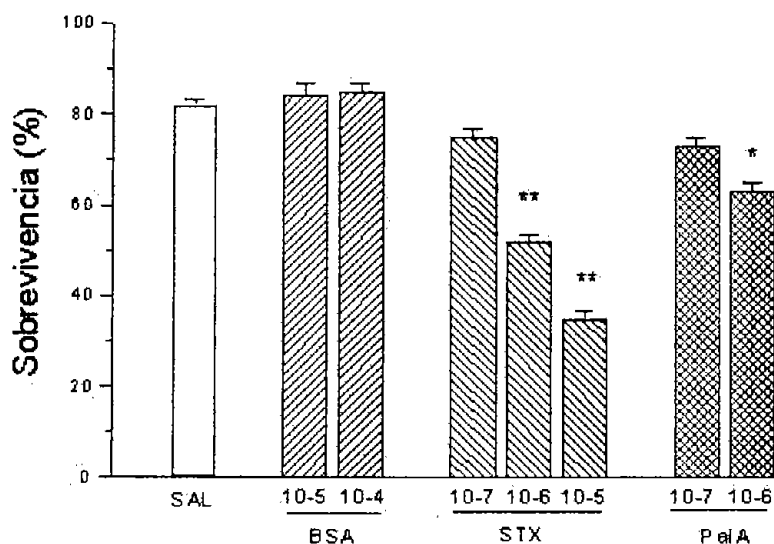


Figura 10. Toxicidad producida por PaIA después de ser inyectada a concentraciones de 10⁻⁷ y 10⁻⁶ en larvas de *D. melanogaster* (PaIA). Se inyectó solución salina como control negativo (SAL). El control de osmolaridad se realizó con albumina sérica bovina a concentraciones de 10⁻⁵ y 10⁻⁴ (BSA). Saxitoxina a concentraciones de 10⁻⁷, 10⁻⁶ y 10⁻⁵ fue inyectada como control positivo. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos ± ESM (n = 25 cada uno). *p<0.05 **p<0.01.

C. Alineamiento entre PaIA y GpIA y estructura secundaria (hélices alfa)

```

PaIA      RKRLFYRYYSHPGNYMYLGHYGRYYNMLHNCNAMLLAHQMOMRRYQHRMRVKQMYRRIKMKQMYRHMKWMGMYRQAKAARLRCI..
GpIA      RYGRSYAMSH-----MPMSRMGRKMYQNYMYRRMQATKMMQYH..

```

D. Alineamiento de las regiones helicoidales largas predichas en PaIA y GpIA y clasificación de los residuos que las forman como miembros de heptadas (abcdefg)

```

PaIA      31
          CNAMLLAHQMOMRRYQHRMRVKQMYRRIKMKQMYRHMKWMGMYRQAKAARLRCI..
          abcdefga d a d a d a d a d
          -----
          . * * : : * : * * * * : : . : * : :
          11
GpIA      -----MPMSRMGRKMYQNYMYRRMQATKMMQYH..
          abcdefga d a d a
          -----

```

Separación de los componentes del veneno del cónido

Se utilizó un total de veneno proveniente de 15 ejemplares de *C. spurius*. El veneno fue fraccionado por HPLC y solamente fueron estudiados los primeros componentes, como se muestra en la Figura 11. Las demás fracciones que se aprecian fueron motivo de estudio de otros trabajos (Maillo et al., 2002). Las fracciones indicadas como SpIA y SpIB en la Figura 11 fueron repurificadas utilizando la columna C18, mientras que para la repurificación de las fracciones SpIB' (Figura 11.1) y SpIC se utilizaron columnas C8 y C4, respectivamente.

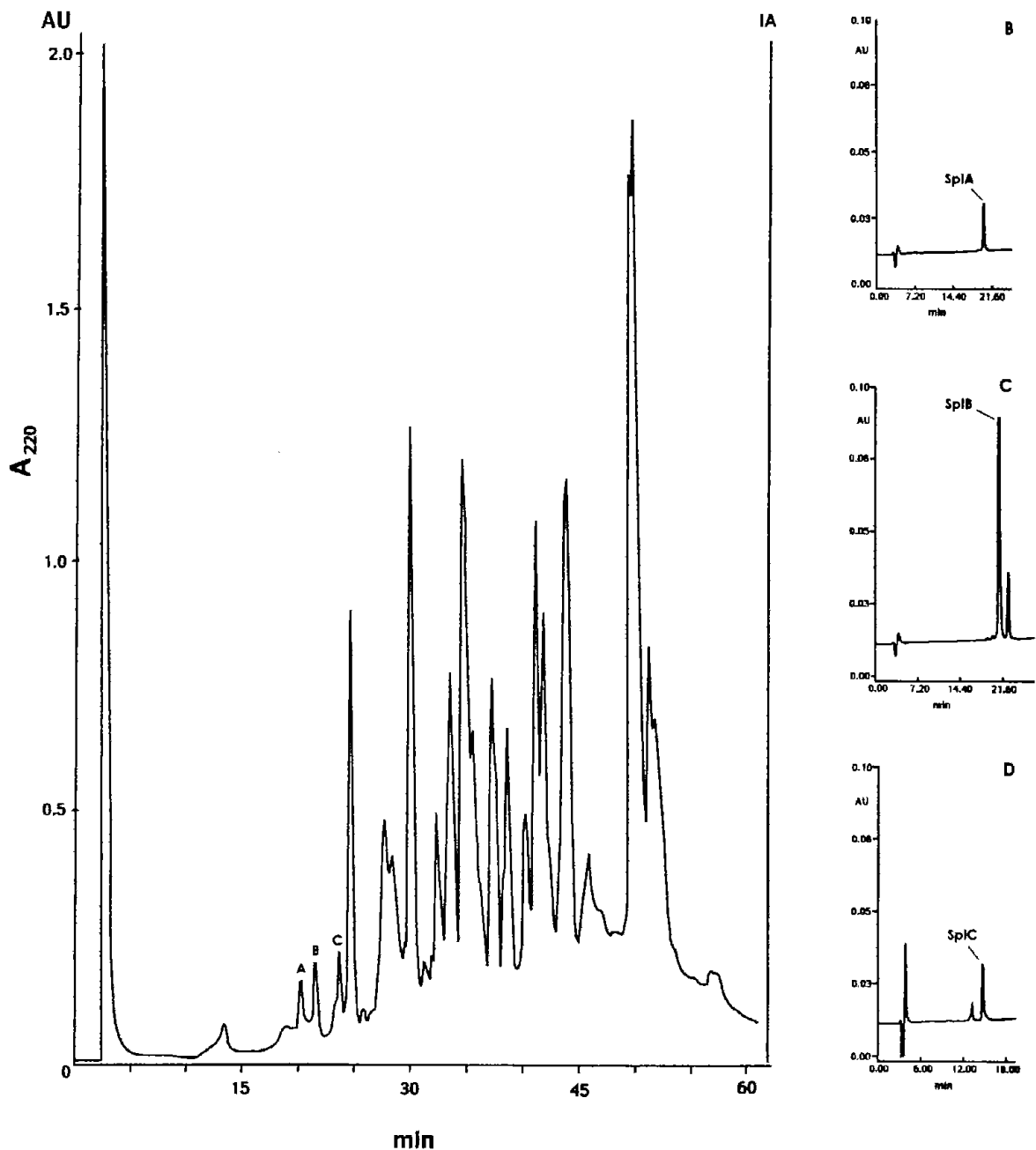


Figura 11. IA Perfil cromatográfico del veneno de *C. spurius*. Las letras A, B y C indican los péptidos que fueron estudiados (SpIA, SpIB y SpIC respectivamente). Los recuadros a la derecha (B, C y D) muestran los perfiles de repurificación de los péptidos estudiados. Los péptidos se purificaron utilizando un gradiente de 5-100% solución B durante 95 min.

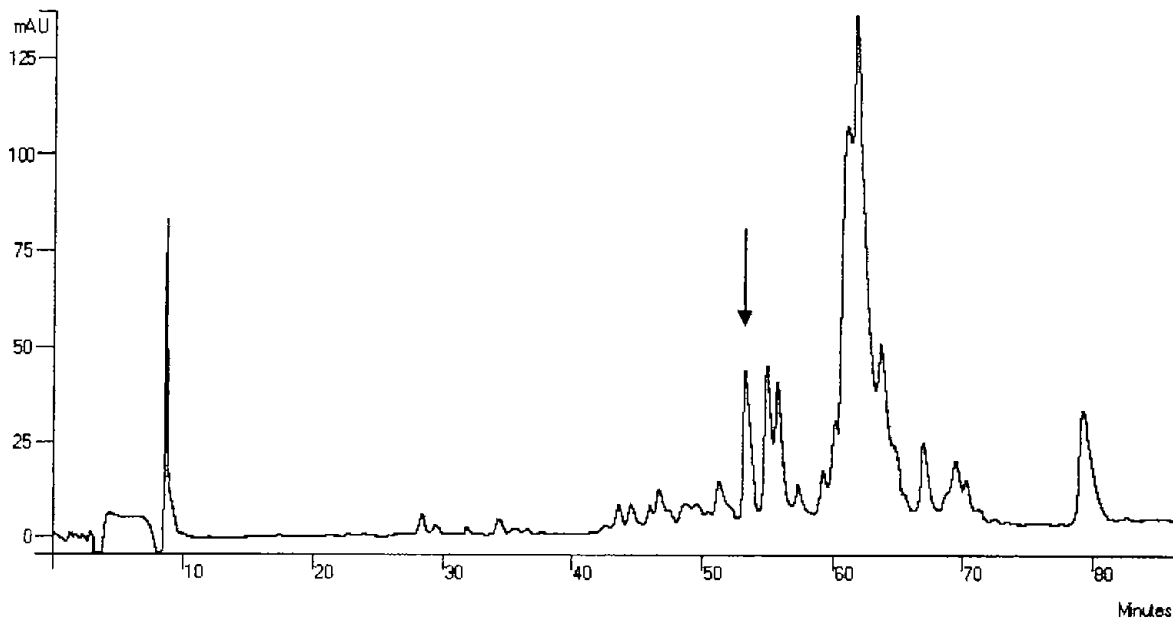


Figura 11.1. Cromatograma obtenido por HPLC de fase reversa, mediante el uso de dos columnas C8. Las fracciones fueron obtenidas utilizando un gradiente lineal de 1% de solución B cada 7min. La flecha indica el péptido SpIB'.

Secuenciación de los péptidos SpIA, SpIB y SpIC

Los péptidos SpIA, SpIB y SpIC después de haber sido alquilados con 4-vinilpiridina dieron una secuencia de 18 aminoácidos cada uno (Tabla 9). En el caso del péptido SpIC, fue posible hacer la asignación de los 18 aminoácidos claramente. En los péptidos SpIA y SpIB se observó un bajo rendimiento de glutamato en las posiciones 15 y 12, y 15 respectivamente, lo que sugiere la presencia de residuos de gamma-carboxiglutamato en dichas posiciones.

El rendimiento neto de material totalmente purificado de los péptidos SpIA, SpIB y SpIC fue de 50.4, 53.5 y 15.1 nmoles, respectivamente. Cabe mencionar que se encontraron seis péptidos similares a SpIA, SpIB y SpIC en los picos adyacentes durante su repurificación (resultados no mostrados); tres de ellos son iguales a estos últimos pero sin el residuo de Arginina en la primera posición; los otros tres difieren de SpIA, SpIB y SpIC sólo en estado de modificación postraduccional del residuo de Prolina en la posición 7 (Tabla 9).

Determinación de la masa de los péptidos SpIA, SpIB y SpIC

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas revelan la presencia de residuos de γ -carboxiglutamato en estos péptidos. Las masas moleculares promedio de los péptidos SpIC, SpIB y SpIA determinadas por ESI/MS son de 2116.6, 2160.1 y 2204.0, respectivamente. La similitud de estos valores respecto a los calculados con base en las secuencias propuestas sustentan la asignación de cada uno de los residuos obtenidos por la secuenciación de Edman. Para el cálculo de las masas se asumió en todos los casos la amidación de carboxilo terminal y dos puentes disulfuro (ver discusión), así como uno o dos residuos de γ -carboxiglutamato (para SpIB y SpIA, respectivamente).

Tabla 9. Comparación de los pesos moleculares obtenidos por ESI/MS contra los calculados

| Péptido | Secuencia | Peso molecular ESI/MS | Masa calculada |
|---------|---|-----------------------|----------------|
| SpIA | RTCCSROTCRM γ YP γ LCG ^a | 2204.0 | 2204.4 |
| SpIA-1 | -TCCSROTCRM γ YP γ LCG | -- | 2048.2 |
| SpIA' | RTCCSRPTCRM γ YP γ LCG | -- | 2187.4 |
| SpIB | RTCCSROTCRMEYP γ LCG ^a | 2160.1 | 2160.4 |
| SpIB-1 | -TCCSROTCRMEYP γ LCG | -- | 2004.2 |
| SpIB' | RTCCSRPTCRMEYP γ LCG | -- | 2143.4 |
| SpIC | RTCCSRPTCRMEYPELCG ^a | 2116.6 | 2116.4 |
| SpIC-1 | -TCCSRPTCRMEYPELCG | -- | 1960.2 |
| SpIC' | RTCCSROTCRMEYPELCG | -- | 2132.4 |

^a, COOH-terminal amidado; O, hidroxiprolina; γ , γ -carboxiglutamato.

Puentes disulfuro del péptido SpIB

Con la finalidad de determinar los puentes disulfuro de estos péptidos, se utilizaron 11.78 nmoles de material de inicio correspondiente al péptido SpIB (elección de éste péptido por disponibilidad de material). La reducción y la alquilación con N-etil maleimida dio como resultado un total de 23 fracciones al momento de ser cromatografiadas (Figura 12). Dos de las fracciones (2 y 3) fueron mayoritarias y en conjunto representan el 95% del total del producto alquilado; la secuenciación indicó que corresponden al producto de partida y a una variante no reducida de éste; las fracciones restantes fueron variantes de los productos de la reducción parcial y alquilación. Sin embargo, las fracciones 7, 11, 17 y 18 permitieron dilucidar que la conectividad entre los residuos de Cisteínas que fue 1-3, 2-4. En ninguna de las fracciones restantes se encontró evidencia de intercambio de puentes disulfuro debido a la metodología utilizada.

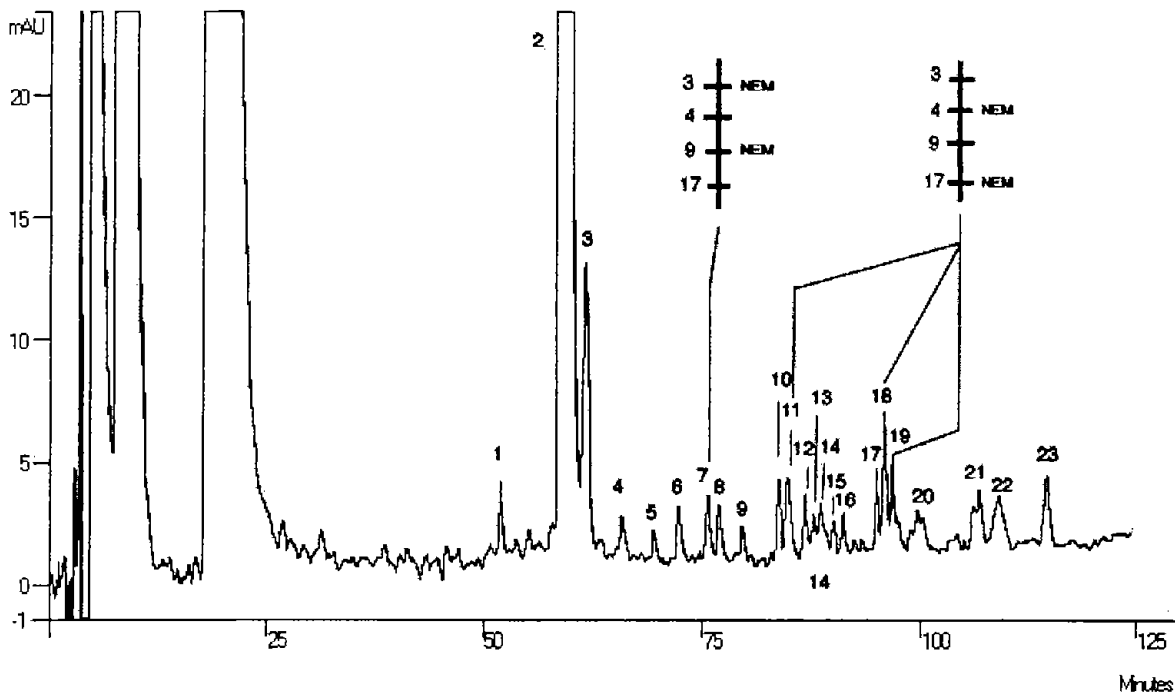


Figura 12. Cromatograma de los productos de la reacción de reducción parcial del péptido SpIB. Los derivados fueron eluidos utilizando un gradiente de 10%B a 30%B en 120 min. Las posiciones de las modificaciones de las cisteínas determinadas por la degradación de Edman, se muestran en la parte superior de la figura.

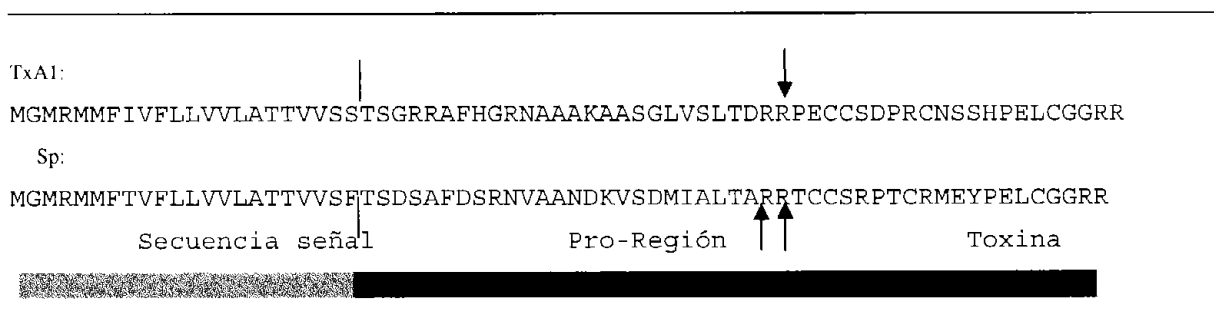
Clonación del ADNc del precursor de la superfamilia A

Se obtuvo la amplificación de un ADNc de aproximadamente 189 pares de bases (pb) a partir del ARNm total obtenido de un solo conducto venenosos de *C. spurius* (100 mg de tejido) amplificado por PCR. El ADNc se insertó eficazmente en el vector utilizado (200 pb) y se obtuvo una banda de aproximadamente 400 pb, la cual fue congruente con lo calculado. La secuencia de los plásmidos obtenidos de varias colonias positivas fueron exactamente las mismas (Figura 13a). La secuencia ya traducida dio un total de 64 aminoácidos, donde se puede apreciar claramente la conservación de las tres partes que integran los precursores de estas conotoxinas: la secuencias señal, la región "pro", y 16 de los 18 aminoácidos correspondientes a la toxinas maduras (13b). Estos resultados fueron confirmados por los Dres. Baltazar Becerril y Ernesto Ortiz (IBT-UNAM), quienes confirmaron los últimos dos residuos faltantes de la toxina madura, mediante el uso de oligonucleótidos diferentes. Los resultados de la secuenciación de Edman y espectrometría de masas, aunados con los de la clonación confirman la estructura primaria de los péptidos purificados, así como la amidación del carboxilo terminal de la toxina madura, que podría predecirse con base en la secuencia obtenida por clonación. Las diferencias entre los péptidos SpIA, SpIB y SpIC solamente se deben a cambios postraduccionales en las posiciones 7, 12 y 15 (Tabla 9).

Figura 13a. Secuencia del ADNc y la seceuncia de aminoacidos deducida del precursor de Sp. Los residuos de aminoacidos que constituyen la toxina madura estan subrayados.

```
ctgcgaatgggcatgcgatgatgttcaccgtgttcctgttggttgtcttggcaaccacagtcgtttccttcacttcagatagtgcat  
L R M G M R M M F T V F L L V V L A T T V V S F T S D S A F  
gatagcaggaatgtcgcagccaacgacaaagtgtctgacatgatcgctctgaccgccaggagaacatgctgttcccgctcctacctgaga  
D S R N V A A N D K V S D M I A L T A R R T C C S R P T C R  
atggaatatccagaactttgtggtggaagacgctgatactccaggaccctctgaaccacgacgttggagca  
M E Y P E L C G G R R *
```

Figura 13b. Comparación de las secuencia de los precursores de *C. spurius* y *C. textile*.



Las líneas verticales indican la separación entre el péptido señal y la región Pro. Las flechas indican el sitio de corte para la liberación de la toxina madura siendo uno para TxA1 y dos posibles para SpIA, SpIB y SpIC

Efecto de los péptidos SpIA y SpIB sobre la conducta de los ratones

La inyección intracraneal de 1 nmol de SpIA y SpIB en ratones de 17 días produjo una leve hiperactividad poco después de la inyección y durante 1 h aproximadamente. Dicha hiperactividad se manifestó como una conducta de exploración a todo lo largo de la caja de observación acompañada de saltos para fugarse de la caja; después de la hora los ratones adoptaron la postura de dormir. Esta misma conducta fue observada, aunque aparentemente en menor grado (5 min), en los ratones control (inyectados con solución salina normal), los cuales se durmieron 30 min después de la inyección.

Efecto de los péptidos SpIA, SpIB y SpIC sobre los nAChR musculares y neuronales

Las toxinas SpIA y SpIB fueron ensayadas a través de registros electrofisiológicos en dos distintos tipos celulares en los que se expresan diferentes subtipos de receptores de acetilcolina nicotínicos musculares y neuronales, mientras que el péptido SpIC sólo fue probado sobre células con subtipos musculares. Los experimentos fueron realizados en la modalidad de fijación de voltaje (a -60 mV) en célula completa. La perfusión consistió en periodos cortos de 2 a 30 segundos con cantidades variables de nicotina, toxina (50 ó 100 nM) o ambas. Se usó nicotina en lugar de acetilcolina para excluir la acción tardía de los receptores muscarínicos y se verificó que toda la respuesta fuera bloqueada por d-tubocurarina (50 µM).

Los registros electrofisiológicos en presencia de SpIA y SpIB mostraron un efecto agonista en ambas líneas celulares, ya que la aplicación de estas toxinas provocó un incremento en la conductancia de los receptores de acetilcolina (Figuras 14 y 15). SpIC produjo un efecto agonista en la línea muscular (Figura 16).

En las células TE671, cuando se probó al mismo tiempo la toxina SpIB [100 nM] con diferentes concentraciones de nicotina, fue necesario usar hasta 2.5 μ M de nicotina para producir el mismo efecto, lo que indica que la SpIB es 25 veces más potente que ésta; además, SpIB provoca una rápida desensibilización. Los péptidos SpIA y SpIC produjeron un efecto agonista menos marcado que SpIB y no provocaron desensibilización (Figuras 14 y 16).

En el caso de las células cromafines ambas toxinas, a concentraciones de 100 nM, provocaron un incremento en la desensibilización de los receptores de acetilcolina. SpIA además produjo una reducción en la amplitud de la corriente inducida por la nicotina (Figura 15).

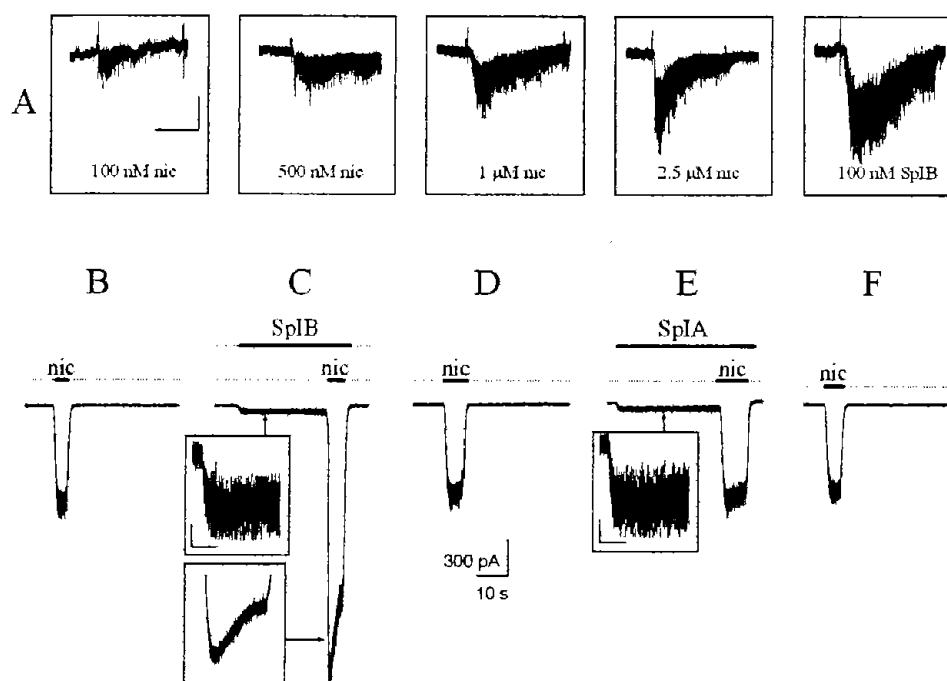


Figura 14. El efecto de 100 nM de las toxinas SpIA y SpIB en las células TE671 comparado con el efecto de nicotina, en la modalidad de fijación de voltaje. A) El registro de las corrientes entrantes producidas por la aplicación de nicotina y/o las toxinas α (fijación del potencial a -60 mV). Los recuadros en el margen superior derecho se refieren a los efectos producidos cuando se aplicaron las siguientes drogas de manera subsecuente: 100 nM SpIB; nicotina 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 2.5 μ M y de nuevo 100 nM SpIB. B-D) Las mismas respuestas de A pero a una escala de tiempo mayor. Se muestra la cinética de apertura y cerrado de los canales de nAChR y la desensibilización producida por SpIB. E-F) Misma descripción que B-D utilizando SpIA, donde se observa que no produjo un efecto en la modulación en la respuesta con nicotina.

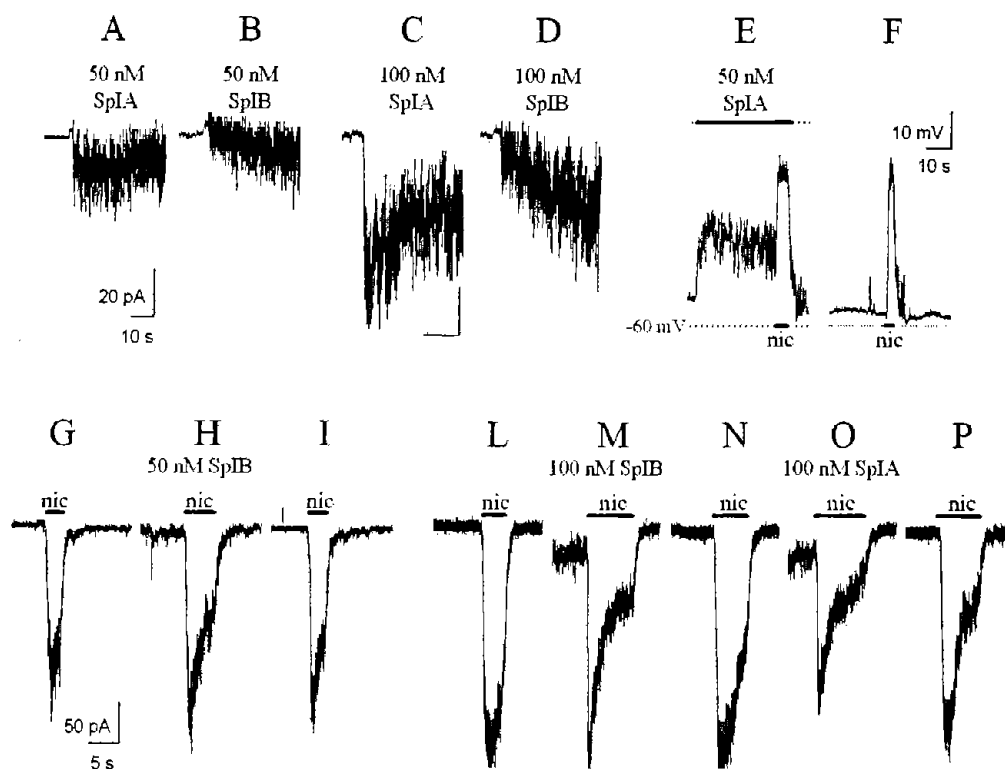


Figura 15. El efecto de 50 y 100 nM de las toxinas en las modalidades de fijación de voltaje y de corriente en las células cromafines de rata. A-B) El incremento en las fluctuaciones durante la aplicación de las toxinas a 50 nM. C-D) Lo mismo que lo anterior pero con 100 nM. E-F). Los registros del potencial de membrana de la célula en estado de reposo, durante la aplicación de SpIA y/o nicotina (en la modalidad de fijación de la corriente). G-I) Registros de las corrientes entrantes producidas por la aplicación de nicotina y/o SpIB [50 nM](en fijación de voltaje). L-P) Registros de corrientes entrantes producidas por la aplicación de nicotina sola o toxinas SpIA/IB y nicotina.

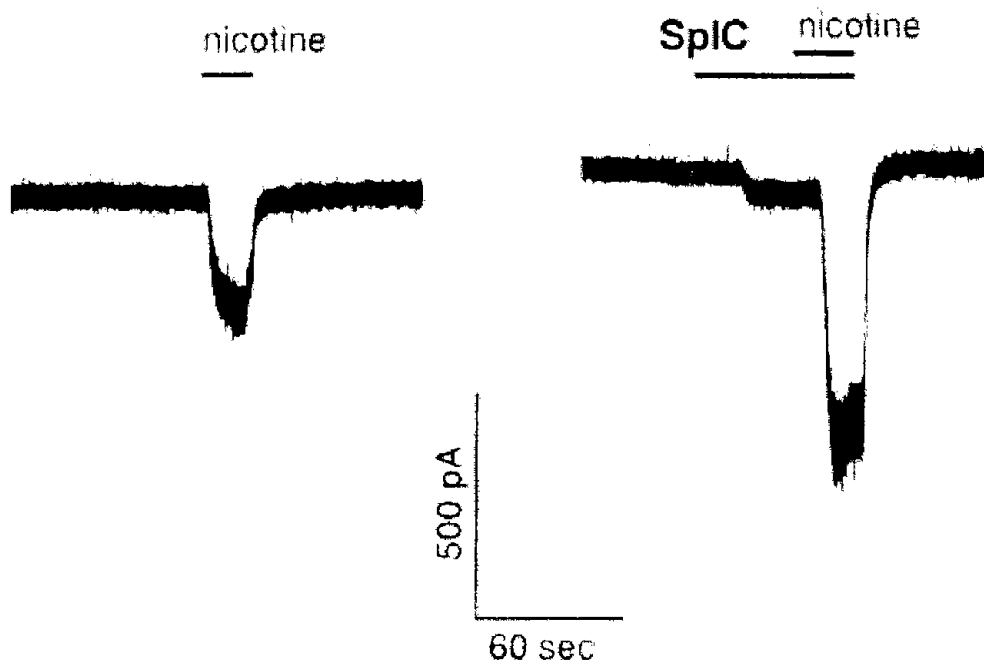


Figura 16. El efecto de SpIC en las células TE671 comparado con el efecto de nicotina. Se muestra el registro de las corrientes entrantes (fijación del potencial a -60 mV) producidas por la aplicación de nicotina ($50 \mu\text{M}$) y/o la toxina a 50 nM.

DISCUSIÓN

TÚRRIDOS

Los caracoles túrridos *Polystira albida* y *Gemmula periscelida* contienen una gran cantidad de componentes en sus venenos. En este trabajo se han caracterizado los componentes mayoritarios de cada una de las especies. Estas son las primeras toxinas aisladas y caracterizadas de este tipo de caracoles venenosos. El extracto de sus conductos venenosos presentan un perfil cromatográfico similar al del veneno de los caracoles cónidos (Gray et al., 1988), los cuales contienen un gran número de polipéptidos (Figura 9). Debido a que ambas especies presentan conductos venenosos de tamaño pequeño y angostos (~10 x 0.05 mm), solamente fue posible obtener una pequeña cantidad de extracto venenoso. Por lo anterior no fue posible realizar algún tipo de repurificación. El análisis de la secuencia del pico PaIA de *P. albida* dio dos claras secuencias que difieren entre sí en siete residuos en la parte amino terminal. Con base en la masa obtenida espectrométricamente, estimamos que el 91% de la estructura primaria del péptido más abundante PaIAa, ha sido determinado. En el caso del pico GpIA de *G. periscelida*, encontramos también dos claras secuencias parciales que difieren en 4 residuos en la parte amino terminal (Ver artículo anexo). El alineamiento muestra que los péptidos de las dos especies de túrridos comparten dos regiones con una alta similitud en las secuencias y podrían ser considerados homólogos (Tabla 8a).

Los resultados preliminares de los bioensayos hechos en larvas de *Drosophila* dan evidencia que PaIA es tóxico (Figura 10) como se esperaba por provenir de un aparato venenoso, pero el mecanismo de acción y blanco molecular no han sido elucidados. Dada la homología de PaIAa y GpIAa, es de esperarse que este último péptido también sea tóxico. Proponemos el nombre de "Turríttoxinas" para los péptidos descritos en este trabajo y para otros péptidos que puedan estar presentes en los conductos venenosos de otras especies de túrridos. Las turríttoxinas caracterizadas no presentan homología con ninguna otra secuencia conocida (determinada tanto por secuenciación química directa o por la traducción de secuencias de ácidos nucleicos).

El veneno de cada uno de los turrídos contiene un péptido mayoritario con una gran cantidad de residuos de Tyr, Arg y Met en sus estructuras primarias que en conjunto son el 45 y 55% de las secuencias conocidas de PaIAa y GpIAa, respectivamente. Los residuos de Met, 5 de los cuales están conservados, promueven la formación de la estructura secundaria α -hélice (Chou y Fasman, 1978) y dos regiones helicoidales son predichas en regiones equivalentes para los dos péptidos (Tabla 8b y c).

La presencia de residuos apolares en las posiciones primera ("a") y cuarta ("d") en la periodicidad de siete residuos (repetición de la heptada) es una de las características estructurales del motivo "hélices trenzadas" (α -helix coiled-coil), donde dos α -hélices se entretrejen para formar una "trenza" (supercoil), y las superficies hidrofóbicas de las hélices anfipáticas están adyacentes. Las regiones ricas en leucinas que forman motivos de hélices trenzadas son clasificadas como motivos de cierres de leucinas (leucine zipper) (Landschulz et al., 1988). A pesar de su simple arquitectura, estos motivos, que son mejor conocidos por su presencia en una clase de factor transcripcional, tienen un papel muy importante en muchas funciones biológicas en las que se incluyen proteínas motoras y esqueléticas, así como también en procesos de reconocimiento molecular (Lupas, 1996a, 1996b; Burkhard et al., 2001). Las regiones helicoidales predichas en ambas turríttoxinas contienen residuos hidrofóbicos en varias de las posiciones "a" y "d" de las heptadas (Tabla 8d) y son lo suficientemente grandes para la formación de dominios de hélices trenzadas, ya que estudios recientes demuestran que un mínimo entre 21 a 23 residuos son necesarios para la formación de trenzas estables (Lumb et al., 1994; Kammerer et al., 1998). Algunas de las proteínas que se considera que forman motivos de trenza son pequeñas (subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa) (Le et al., 2001); de hecho, dichos motivos no son detectados cuando se hace la predicción con los programas normales. En estos turrípéptidos, la cadena lateral de los residuos de metionina localizados en la hélice predicha más grande podría complementarse con otra hélice de una manera similar con la observada en los motivos de cierres de leucinas. Proponemos que podría existir un "cierre de metioninas" como una característica estructural de la arquitectura de estas turríttoxinas, de la misma manera que los arreglos de los residuos de cisteínas determinan la estructura en las conotoxinas.

Debido a que los túrridos (familia Turridae) y los conos (familia Conidae) pertenecen a la misma superfamilia (Conoidea) de caracoles marinos, es intrigante que las primeras turrtoxinas de dos distintas especies contengan muchos residuos de metionina y muy pocos, o ningún residuo de cisteína, que es lo opuesto a lo que ha sido constantemente encontrado en muchas de las toxinas de *Conus* (Gray et al., 1988). Los residuos de cisteína dan estabilidad conformacional a las conotoxinas y en algunos de los conopéptidos pequeños, como las conantokinas, que carecen de residuos de cisteínas, sus moléculas son estabilizadas por la presencia del residuo de γ -carboxiglutamato (Craig et al., 1999). Interesantemente, a pesar de la falta de residuos de cisteína, ha sido demostrado que las conantokinas adoptan una estructura helicoidal (Lin et al., 1997). En el caso de las turrtoxinas descritas aquí, la formación de motivos de hélices trenzadas podría proveerles estabilidad conformacional.

Dentro de la familia Turridae más de 200 géneros han sido descritos. Si se demuestra que las turrtoxinas actúan en canales iónicos, receptores o transportadores (Olivera, 1997; Sharpe et al., 2001; Terlau and Olivera, 2004), como se ha demostrado ampliamente para las conotoxinas, nuestros resultados podrían abrir un nuevo campo de investigación. El entendimiento de las propiedades químicas de estos péptidos y de las similitudes y diferencias de la interacción y efecto de estos péptidos sobre diferentes subtipos de blancos moleculares podría conducir a su uso como herramientas moleculares para estudiar diversas propiedades de éstos.

CONUS

Las diferencias en las estructuras primarias de los péptidos SpIA y SpIB aislados del caracol vermívoro *C. spurius* parecen ser resultado de modificaciones postraduccionales de los residuos prolina y ácido glutámico a partir de un precursor en común. La amidación del carboxilo terminal se dedujo a partir del análisis del DNA complementario en el cual se encuentra codificada la secuencia C-terminal CGGRR (datos no reportados de B. Becerril y E. Ortiz, IBT-UNAM); invariablemente, en los precursores de diversos péptidos que son amidados postraduccionalmente el residuo que está amidado en el péptido maduro se encuentra seguido de un residuo de glicina y de uno o dos residuos básicos. Éstos son removidos postraduccionalmente y el residuo de glicina que precede a estos residuos básicos es utilizado para amidar el residuo que la precede. La amidación fue confirmada por los datos obtenidos por espectrometría de masas de las toxinas SpIA y SpIB, lo cual indica que el

proceso de la amidación del carboxilo terminal en los caracoles cónidos es el mismo que en péptidos de otros orígenes.

Las secuencias de aminoácidos indican que los péptidos SpIA y SpIB pertenecen a la familia de las α -conotoxinas. Ambos péptidos contienen cuatro y siete residuos entre la segunda y la tercera y entre la tercera y cuarta cisteínas, respectivamente. Este espacio define a la subfamilia de α -conotoxinas 4/7 (Tabla 10), la categoría más abundante de antagonistas nicotínicos presentes en el veneno de los caracoles cónidos (McIntosh et al., 1999b).

Las α -conotoxinas 4/7 conservan el residuo de prolina en la primera asa (conformada entre los residuos de la segunda y tercera cisteínas) y los péptidos SpIA y SpIB son las primeras conotoxinas en las cuales la prolina conservada está postraduccionalmente modificada a hidroxiprolina. (Tabla 10). Esta derivación ha sido encontrada en las conotoxinas μ -, ω -, κ -, κA -, αA -, ψ -, χ - y conotoxinas δ (Craig et al., 1999), y recientemente en la α -4/7-conotoxina GID (Nicke et al., 2003). Sin embargo, en esta última toxina la hidroxilación no ocurre en la prolina conservada en la primera asa. Otra característica inusual de los péptidos SpIA y SpIB es la presencia del residuo gamma-carboxiglutamato. Esta modificación postraducciona ha sido descrita en péptidos de *Conus* tales como las conantokinas, las γ -conotoxinas y las ϵ -conotoxinas (Craig et al., 1999). Recientemente, el residuo Gla ha sido encontrado en la parte N-terminal de la α -conotoxina GID (Nicke et al., 2003). Sin embargo, los péptidos SpIA and SpIB son las primeras conotoxinas en las cuales el residuo de γ -carboxiglutamato está en la segunda asa, constituida por los residuos entre la tercera y la cuarta cisteínas.

Los péptidos SpIA y SpIB están constituidos por 18 residuos de aminoácidos con el carboxilo terminal amidado y con una carga neutra y positiva (+1), respectivamente, a pH fisiológico. Se sabe que las α -conotoxinas que son antagonistas específicos para los subtipos neuronales de los receptores nicotínicos de Acetilcolina pertenecen a la subfamilia α 4/7 y que presentan cargas negativas o neutras (con la excepción de la toxina lml; Rogers et al., 2000), mientras que las α -conotoxinas que son específicas para los receptores musculares pertenecen a la subfamilia α 3/5 y poseen carga neta positiva (Hu et al., 1998). De acuerdo con estos autores el péptido SpIA podría ser considerado como un antagonista candidato para los subtipos neuronales de nAChR, mientras que la toxina SpIB podría

ser un antagonista probable de los receptores musculares. Hemos probado ambos péptidos, SpIA y SpIB, en preparaciones biológicas que expresan subtipos de nAChR neuronales (células cromafines de rata) o musculares (línea celular humana TE671). Contrariamente a lo esperado, los péptidos SpIA y SpIB fueron activos en ambos tipos de receptores, lo cual constituye una propiedad nueva de las $\alpha 4/7$ -conotoxinas. Lo más sorprendente fue el hecho de encontrar una actividad agonista en ambos péptidos, propiedad nunca antes descrita en este tipo de $\alpha 4/7$ -conotoxinas (McIntosh et al., 2000).

Un análisis comparativo de los datos de las $\alpha 4/7$ conotoxinas indica que las cadenas laterales de los tres primeros residuos en la segunda asa son importantes para determinar la selectividad y potencia en los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 2$ de receptores nicotínicos de Acetilcolina neuronales (Nicke et al., 2003). Estos autores concluyen que los residuos de arginina y leucina en la primera y segunda posición favorecen la unión a los subtipos $\alpha 7$, mientras que la alanina y la asparagina en las posiciones dos y tres aumentan la unión a los subtipos $\alpha 3\beta 2$. Esta idea es apoyada por los datos obtenidos de análogos de la α -conotoxina PnIA (Luo et al., 1999; Hogg et al., 1999). La presencia de las secuencias Arg-Met-Glu y Arg-Met-Gla en los péptidos SpIB y SpIA, respectivamente, sugiere que ambos péptidos podrían interactuar con el subtipo $\alpha 7$ de los nAChR más que con el subtipo $\alpha 3\beta 2$. De hecho, se sabe que las células cromafines empleadas en este trabajo expresan los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ nAChR, lo cual sustenta que el posible blanco molecular de los péptidos SpIA y SpIB sea el subtipo $\alpha 7$ nAChR. Proponemos que el blanco no es el subtipo $\alpha 3\beta 4$ debido a que dos toxinas (AuIA y AuIC de *C. aulicus*) que se saben que actúan en ellos contienen la secuencia Phe-Ala-Thr en la segunda asa (Luo et al., 1998), diferente a la secuencia de los péptidos SpIA y SpIB en dicha región.

La toxina EI (Martinez et al., 1995) y los péptidos SpIA y SpIB son las únicas $\alpha 4/7$ conotoxinas que se sabe que actúan en nAChR musculares. La primera tiene los residuos Thr y Met en las posiciones 4 de la primera asa y 2 en la segunda asa, respectivamente. Estos residuos no están presentes en ninguna otra $\alpha 4/7$ toxina estudiada hasta ahora (con la excepción de la Met-10 en EpI). Además, estas últimas tienen residuos hidrofóbicos alifáticos similares en la posición 7 de la segunda asa (Ile en la toxina EI, Leu en los péptidos SpIA y SpIB). Residuos de Leu y Ile también están presentes en estas posiciones en las toxinas MII y GIC que actúan en el subtipo $\alpha 3\beta 2$ (Tabla 10). Por lo tanto, parece razonable especular que los residuos Thr, Met y Leu/Ile están involucrados en la unión y/o activación de los receptores nAChR musculares (Hu et al., 1998). En este caso SpIB tiene una

carga neta (+1), también encontrada en EI, la cual podría contribuir a la activación de los receptores musculares. Además, los péptidos SpIA y SpIB comparten el residuo de Tyr en la posición número 4 de la segunda asa con muchas de las α 4/5 conotoxinas, el cual no está presente en ninguna α 4/7 conotoxina conocida previamente (Tabla 10). En resumen, los péptidos SpIA y SpIB contienen elementos estructurales de ambos tipos de α conotoxinas que actúan diferencialmente en los nAChR neuronales y musculares, lo cual podría explicar su actividad sobre ambos tipos de receptores nicotínicos.

La bioactividad de los péptidos SpIA y SpIB de *C. spurius* tiene dos características que son sumamente novedosas: 1) Un amplio espectro de acción sobre los nAChR (musculares y neuronales), y 2) un efecto agonista. Ambas propiedades funcionales podrían ser debidas a la presencia de los residuos de hidroxiprolina y de γ -carboxiglutamato en las posiciones descritas anteriormente. Además de la estabilidad dada por los dos puentes disulfuro común en las α 4/7 conotoxina, los péptidos SpIA y SpIB podrían estar estabilizados por la presencia de los residuos Gla, como se ha visto que ocurre en la Conantokina-T (Lin et al., 1997). El residuo adicional de Gla en el péptido SpIA en comparación con el péptido SpIB podría producir una diferencia en la actividad electrofisiológica entre ellos. Los residuos de hidroxiprolina y de γ -carboxiglutamato localizados en posiciones peculiares en los péptidos SpIA y SpIB podrían proveer un sitio de unión adicional que les permitiera interactuar con un mayor número de subunidades de los receptores nAChR de una “nueva manera”. Un ejemplo remarcable de cómo conopéptidos con estructura similar pueden interactuar en distintos blancos moleculares es la toxina pTIA, de *Conus tulipa*, la cual usa una nueva combinación de residuos de aminoácidos, con un arreglo estructural típico de las α -conotoxinas, para inhibir los adrenoreceptores α 1 de una manera no competitiva (Sharpe et al., 2001). Por tanto, los péptidos SpIA y SpIB son herramientas promisorias para el estudio a nivel molecular de la relaciones actividad-estructura que subyacen a la acción de las α -conotoxinas (McIntosh et al., 2000) y como posibles modelos para el desarrollo de péptidos terapéuticos (Jones & Bulaj, 2000; Shen et al., 2000).

Dado el efecto electrofisiológico claro de los péptidos SpIA y SpIB, sobre subtipos neuronales (α 7) del nAChR de la rata, se esperaba que ambos produjeran alguna alteración conductual al ser inyectados por la vía intracraneal en los ratones. La hiperactividad obtenida con ambos péptidos contrasta con el efecto conductual producido por α -conotoxinas que se unen específicamente a dicho subtipo del nAChR. Por ejemplo, la toxina ImI produce convulsiones complejas al ser inyectada

intracranealmente en ratones y ratas (McIntosh et al., 1994). Esta diferencia, con respecto a las α -conotoxinas "clásicas" (antagonistas), de los efectos de SpIA y SpIB a nivel conductual no es sorprendente dados sus efectos opuestos a nivel electrofisiológico (agonismo).

Tabla 10. Comparación de las secuencias de aminoácidos de SpIA, SpIB y SpIC con algunos miembros de la subfamilia 4/7 α -conotoxinas y con las toxinas ImI y ρ TIA.

| Péptido | <i>Secuencia</i> | <i>Blanco molecular</i> |
|------------|---|--|
| SpIA | RTCCSROTCRM γ YP γ LCG ^a | (α 1) ₂ β 1 $\gamma\delta$, α 7 |
| SpIB | RTCCSROTCRMEYP γ LCG ^a | (α 1) ₂ β 1 $\gamma\delta$, α 7 |
| SpIC | RTCCSRPTCRMEYPELCG ^a | (α 1) ₂ β 1 $\gamma\delta$ |
| GID | IRGgCCSNPACRVNNOHVC | α 7, α 3/ β 2, α 4/ β 2 |
| MII | GCCSNPVCHLEHSNLC ^a | α 3 / β 2 |
| ImI | GCCSDPRCAWRC ^a | α 7 |
| ρ TIA | FNWRCCLIPACRRNHKKFC ^a | α 1-adrenoreceptor |
| PnIA | GCCSLPPCAANNPDYC ^a | α 3 / β 2 |
| GIC | GCCSHPACAGNNQHIC ^a | α 3 / β 2 |
| AuIA | GCCSYPPCFATNSDYC ^a | α 3 / β 4 |
| AuIC | GCCSYPPCFATNSGYC ^a | α 3 / β 4 |
| EpI | GCCSDPRCNMNNPDYC ^a | α 3 / β 2 |
| EI | RDOCCYHPTCNMSNPQIC ^a | (α 1) ₂ β 1 $\gamma\delta$ |
| | * * * . * | |

^aC-terminal amidado; O, hidroxiprolina; γ , γ -carboxiglutamato; * , aminoácidos idénticos

CONCLUSIONES

Túrridos

- Se fraccionaron los extractos del veneno de dos especies de túrridos, *Gemmula periscelida* y *Polystira albida*, y se purificaron parcialmente los componentes mayoritarios, los cuales resultaron ser péptidos.
- Se determinaron las secuencias parciales de aminoácidos de los péptidos mayoritarios de cada especie y se encontró que ambos contienen un gran número de residuos de metionina y muy pocos o ninguno de cisteína, al contrario de lo encontrado en las conotoxinas. Al alinear las estructuras primarias se determinó que los péptidos podrían ser homólogos.
- Se determinó la masa molecular del péptido de *P. albida* y se encontró un valor promedio de 11,867.5 Da, lo que indica que, aproximadamente se ha determinado el 91% de la secuencia de dicho péptido.
- Se compararon las estructuras primarias de los péptidos de los túrridos con bases de datos de proteínas y de nucleótidos y no se encontró similitud global con ninguna secuencia conocida.
- Se analizó la actividad biológica del péptido de *P. albida*, mediante inyección en larvas de *D. melanogaster*, y se encontró que es tóxico a una dosis de 5 fmol.
- Se predijeron las estructuras secundarias de los péptidos mayoritarios de cada especie de túrrido. Se encontró que ambos péptidos podrían contener 2 segmentos helicoidales, uno corto y uno largo. Al alinear las secuencias se observó que ambas α -hélices podrían estar localizadas en regiones equivalentes ("homólogas") en los péptidos.

- Se analizaron los segmentos helicoidales teóricos largos de cada péptido y se encontró que: 1) las hélices son anfipáticas; y 2) si los residuos se nombran de acuerdo a heptadas (a,b,c,d,e,f,g), al menos la mitad de las posiciones "a" y "d" están ocupadas por residuos de metionina. Estas observaciones sugieren la presencia de motivos de hélices trenzadas ("coiled-coils") en ambos péptidos. Se predijo la existencia del motivo de hélices trenzadas en el péptido de *P. albida* y se encontró una baja probabilidad de ocurrencia de dicho motivo, en la región que corresponde al segmento helicoidal largo.

Conus

- Se fraccionó el extracto del veneno de la especie *Conus spurius*, y se purificaron totalmente tres componentes minoritarios.

- Se determinaron las secuencias de aminoácidos completas de los tres péptidos, SpIA, SpIB y SpIC, y se encontró que contienen el arreglo de cisteínas característico de las α -conotoxinas del tipo 4/7. Al comparar entre sí sus estructuras primarias se determinó que los péptidos SpIA y SpIB son variantes postraduccionales generadas a partir del precursor del péptido SpIC.

- Se determinaron las masas moleculares de los péptidos y se encontraron valores consistentes con las modificaciones postraduccionales observadas durante la secuenciación química y que indican que los extremos carboxilo de los tres péptidos se encuentran amidados.

- Se determinaron los puentes disulfuro del péptido SpIB, mediante reducción parcial y alquilación en medio ácido, seguida de secuenciación de Edman. La conectividad (I-III, II-IV) es igual a la encontrada en las α -conotoxinas.

- Se clonó el precursor del péptido SpIC y se encontró que tiene la estructura característica de los precursores de α -conotoxinas: péptido señal, región "pro", y región de la toxina madura. La secuencia del precursor también reveló la posible amidación del extremo carboxilo de la toxina madura.

- Se analizaron las actividades biológicas de los péptidos SpIA y SpIB, mediante inyección intracraneal en ratones, y se encontró que ambos producen hiperactividad a una dosis de 1 nmol.

- Se analizaron las actividades biológicas de los péptidos SpIA, SpIB y SpIC, mediante técnicas electrofisiológicas con células musculares (TE671) en cultivo, y se encontró que los tres producen un efecto agonista sobre los nAChR musculares a partir de una concentración de 50 nM. Los péptidos SpIA y SpIB fueron probados también sobre células neuronales (cromafines) y produjeron el mismo efecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, P. y Wilce, J., 2001. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg Med* 13, 28-36.
- Balaji, R. A., Ohtake, A., Sato, K., Gopalakrishnakone, P., Kini, R. M., Seow, K. T. y Bay B.-H. 2000. λ -conotoxins, a new family of conotoxins with unique disulfide pattern and protein folding. Isolation and characterization from the venom of *Conus marmoreus*. *J. Biol. Chem.* 275, 39516-39522.
- Becker, S., Prusak-Sochaczowski, E., Zompon, G., Beck-Sickinger A. G., Gordo R. D. y French, R. J. 1992. Action of derivatives of μ -conotoxins GIIIA on sodium channels, Single amino acid substitution on the toxin affect association and disassociation rates. *Biochemistry* 31, 8229-8238.
- Burkhard P., Stetefeld J. y Strelkov S. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11, 82-88.
- Chomczynski P. y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chou P. Y. y Fasman G. D. 1978. Empirical predictions of protein structure. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 251-276.
- Craig A. G., Zafaralla G., Cruz L. J., Santos A. D., Hillyard D. R., Dykert J., Rivier J. E., Gray W. R., Imperial J., Delacruz R. G., Sporning A., Terlau H., West P. J., Yoshikami D. y Olivera B. M. An O-glycosylated neuroexcitatory *Conus* peptide. 1998. *Biochemistry* 37, 16019-16025.
- Craig, A. G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navarro, V., Macella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L. J. y Olivera,

- B. M. 1999. Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J. Biol. Chem.* 274, 13752-13759.
- Cruz, L. J. y White, J. 1995. Clinical toxicology of *Conus* snail stings. In: *Clinical Toxicology of Animal Venoms*, Meier J. and White J. Eds., Boca Raton FL. CRC 117-127.
- Cruz, L. J., Gray, W. R. y Olivera, B. M. 1978. Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 539-548.
- Cruz, L. J., De Santos, V., Zafaralla, G. C., Ramilo, C. A., Zeikus, R., Gray, W. R. y Olivera, B. M. 1987. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus striatus* venoms. *J. Biol. Chem.* 262, 15821-15824.
- Cruz, L. J., Kupryszewski, G., LeCheminant, G. W., Gray, W. R., Olivera, B. M. y Rivier, J. 1989. μ -Conotoxin GIIIA, a peptide ligand for muscle sodium channels: chemical synthesis, radiolabeling and receptor characterization. *Biochemistry* 28, 3437-3442.
- Endean, R. y Rudkin, C. 1963. Studies of the venoms of some Conidae. *Toxicon* 1, 49-64.
- Endean, R., Williams, H. Gyr P. y Surrigde, J. 1976. Some effects on muscle and nerve of crude venom from the gastropod *Conus striatus*. *Toxicon* 14, 267-274.
- 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* 281, 575-578.
- Fainzilber, M., Kofman, O., Zlotkin, E. y Gordon, D. 1994. A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs and acts as an antagonist in rat brain. *J. Biol. Chem.* 269, 2574-2580.
- Fan, C.-X., Chen, X.-K., Zhang, C., Wang, L.-X., Duan, K.-L., He, L.-L., Cao, Y., Liu, S.-Y., Zhong, M.-N., Ulens, C., Tytgat, J., Chen, J.-S., Chi, C.-W. y Zhou, Z. 2003. A novel conotoxin from *Conus*

betulinus, κ -BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator. J. Biol. Chem. 278, 12624-12633.

Ferber, M., Sporning, A., Jeserich, G., DeLaCruz, R., Watkins, M., Olivera, B. M. y Terlau, H. 2003. A novel *Conus* peptide ligand for K⁺ channels. J. Biol. Chem. 278, 2177-2183.

Grantham, C. J., Bowman, P., Bath, C. P., Bell, D. C. y Bleakman, D. 1994 Omega-conotoxin MVIIC reversibly inhibits a human N-type calcium channel and calcium influx into chick synaptosomes. Neuropharmacology 33, 255-258.

Gray W. R., Luque F. A., Galyean R., Atherton E., Sheppard R. C., Stone B. L., Reyes A., Alford J., McIntosh M., Olivera B. M., Cruz L. J. y Rivier J. 1984. Conotoxin GI: disulfide bridges, synthesis, and preparation of iodinated derivatives. Biochemistry 23, 2796-2802.

Gray W. R., Olivera B. M. y Cruz L. J. 1988. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. Ann. Rev. Biochem. 57, 665-700.

Hogg R. C., Miranda L. P., Craik D. J., Lewis R. J., Alewood P. F. y Adams D. J. 1999. Single amino acid substitutions in α -conotoxin PnIA shift selectivity for subtypes of the mammalian neuronal nicotinic acetylcholine receptor. J. Biol. Chem. 274, 36559-36564.

Hu S.-H., Loughnan M., Miller R., Weeks C. M., Blessing R. H., Alewood P. F., Lewis R. y Martin J. 1998. The 1.1 Å resolution crystal structure of [Tyr15]Epl, a novel α -conotoxin from *Conus episcopatus*, solved by direct methods. Biochemistry 37 11425-11433.

Imperial, J. S., Watkins, M., Chen, P., Hillyard, P. R., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. 2003. The augertoxins: biochemical characterization of venom components from the toxoglossate gastropod *Terebra subulata*. Toxicon 42, 391-398.

Jimenez, E. C., Shetty, R. P., Lirazan, M. Rivier, J., Walker, C., Abogadie, F. C., Yoshikami, D., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. 2003. Novel excitatory *Conus* peptides define a new conotoxin superfamily. J.

Neurochem. 85, 610-621.

Jones, R. M. y Bulaj, G. **2000**. Conotoxins-New vistas for peptide therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 6, 1249-1285.

Kammerer R. A., Schulthess R., Landwehr R., Lustig A., Engel J., Aebi U. y Steimetz M. O. **1998**. An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13419-13424.

Keizer, D. W., West, P. J., Lee, E. F., Yoshikami, D., Olivera, B. M., Bulaj, G. y Norton, R. S. Structural basis for tetrodotoxin-resistant sodium channel binding by mu-conotoxin SmIIIA. **2003**. *J. Biol. Chem.* 278, 46805-46813.

Kohn, A. J. **1956**. Piscivorous gastropods of the Genus *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 42, 168-171.

Kohn, A., J. **1990**. Tempo and mode of evolution in Conidae. *Malacologia* 32, 55-67.

Kohn, A. J., Saunders, P. R. y Wiener, S. **1960**. Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. *Ann. NY. Acad. Sci.* 90, 706-725.

Landschulz W. H., Johnson P. F., McKnight S. L. **1988**. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 249, 1759-1764.

Le T. H., Blair D., McManus D. P. **2001**. A leucine zipper protein of mitochondrial origin. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 435-443.

Le Gall, F., Favreau, P., Benoit, E., Mattei, C., Bouet, F., Menou, J. L., Menez, A., Letourneux, Y. y Molgo, J. **1999**. A new conotoxin isolated from *Conus consors* venom acting selectively on axons and motor nerve terminals through a Na⁺-dependent mechanism. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3134-3142.

Lin C. H., Chen C. S., Hsu K. S., King D. S., y Liu P. C. **1997**. Role of modified glutamic acid in the helical structure of conantokin-T. *FEBS Lett.* 407, 243-248.

- Lirazan M. B., Hooper D., Corpuz G. P., Ramilo C. A., Bandyopadhyay P., Cruz L. J. y Olivera B. M. **2000**. The spasmodic peptide defines a new conotoxin superfamily. *Biochemistry* 39, 1583-1588.
- Lirazan, M. B., Jimenez, E. C., Craig, A. G., Olivera, B. M. y Cruz, L. J. **2002**. Conophysin-R, a *Conus radiatus* venom peptide belonging to the neurophysin family. *Toxicon* 40, 901-908.
- Lumb K. J., Carr C. M. y Kim P. S. **1994**. Subdomain folding of the coiled coil leucine zipper from the bZIP transcriptional activator GCN4. *Biochemistry* 33, 7361-7363.
- Luo, S., Kulak J. M., Cartier, G. E., Jacobsen R. B., Yoshikami, D., Olivera, B. M. y McIntosh, J. M. **1998**. α -conotoxin AuIB selectively blocks $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J. Neurosci.* 18, 8571-8579.
- Luo, S., Nguyen, T. A., Cartier, G. E., Olivera, B. M., Yoshikami, D. y McIntosh, J. M. **1999**. Single-residue alteration in α -conotoxin PnIA switches its nAChR subtype selectivity. *Biochemistry* 38, 14542-14548.
- Lupas, A., **1996a**. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* 266, 513-525.
- Lupas, A., **1996b**. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 375-382.
- Maillo, M., Aguilar, M. B., Lopez-Vera, E., Craig, A. G., Bulaj, G., Olivera, B. M. y Heimer de la Cotera, E. P. **2002**. Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon* 40, 401-407.
- Martinez J. S., Olivera B. M., Gray W. R., Craig A. G., Groebe D. R., Abramson S. N. y McIntosh J. M. **1995**. α -conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochemistry* 34, 14519-14526.
- Raybaudi-Massilia, G., Schinina, M. E., Ascenzi, P. y Polticelli F. **2001**. Contryphan-Vn: a novel peptide from the venom of the Mediterranean snail *Conus ventricosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 908-913.

Raybaudi-Massilia, G., Eliseo, T., Grolleau, F., Lapied, B., Barbier, J., Bournaud, R., Molgo, J., Cicero, D. O., Paci, M., Schinina, M. E., Ascenzi, P., y Polticelli F. **2003**. Contryphan-Vn: a modulator of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 238-246.

McIntosh, J. M., Olivera, B. M., Cruz, L. J. y Gray, W. R. **1984**. γ -Carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J. Biol. Chem.* 259, 14343-14346.

McIntosh J. M., Foderaro T. A., Li W., Ireland C. M. y Olivera B. M. **1993**. Presence of serotonin in the venom of *Conus imperialis*. *Toxicon* 31, 1561-1566.

McIntosh, J. M., Yoshikami, D., Mahe, E., Nielsen, D. V., Rivier, J. E., Gray, W., R., y Olivera, B. M. **1994**. A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, α -conotoxin Iml. *J. Biol. Chem.* 269, 16733-16739.

McIntosh, J. M., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Dooley, D. J., Stoehr, S. J., Giordani, A. B., Naisbitt, S. R. y Olivera, B. M. **1995**. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* 270, 3518-3526.

McIntosh, J. M., Olivera, B. M. y Cruz, L. J. **1999a**. *Conus* peptides as probes for ion channels. *Methods Enzymol.* 294, 605-624.

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

McIntosh J. M., Corpuz G. O., Layer R. T., Garrett J. E., Wagstaff J. D., Bulaj G., Vyazovkina A., Yoshikami D., Cruz L. J. y Olivera B. M. **2000**. Isolation and characterization of a novel *Conus* peptide with apparent antinociceptive activity. *J Biol Chem* 275, 32391-32397.

Mena, E. E., Gullak, M. F., Pagnozzi, M. J., Richter, K. E., Rivier, J., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. **1990**. Conantokin-G: a novel peptide antagonist to the N-methyl-D-aspartate acid (NMDA) receptor.

Neurosci. Lett. 118, 241-244.

Miljanich, G. P. 1997. Venom peptides as human pharmaceuticals. *Science & Med.* 6-15.

Monje, V. D., Haack, J. A., Naisbitt, S. R., Miljanich, G., Ramachandran, J., Nadasdi, L., Olivera, B. M., Hillyard, D. R. y Gray, W. R. 1993. A new *Conus* peptide ligand for Ca channel subtypes. *Neuropharmacology* 32, 1141-1149.

Nadasdi, L., Yamashiro, D., Chung, D., Tarczy-Hornoch, K., Adriaenssens, P. y Ramachandran, J. 1995. Structure-activity analysis of a *Conus* peptide blocker of N-type neuronal calcium channels. *Biochemistry* 34, 8076-8081.

Nakamura H., Kobayashi J., Ohizumi Y. y Hirata Y. 1982. The occurrence of arachidonic acid in the venom duct of the marine snail *Conus textile*. *Experientia* 38, 897.

Nakamura H., Kobayashi J., Ohizumi Y. y Hirata Y. 1983. Isolation and amino acid compositions of geophaphotoxin I and II from the marine snail *Conus geographus*. *Experientia*. 15: 590-591.

Nicke A., Loughnan M. L., Millard E. L., Alewood P. F., Adams D. J., Daly N. L., Craik D. J. y Lewis R. J. 2003. Isolation, structure, and activity of GID, a novel α 4/7-conotoxin with an extended N-terminal sequence. *J. Biol. Chem.* 278, 3137-3144.

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.

Olivera B. M. 1999. *Conus* venom peptides: correlating chemistry and behavior. *J. Comp. Physiol. A* 185, 353-359.

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

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

- Olivera B. M., McIntosh J. M., Cruz L. J., Luque F. A. y Gray W. R. **1984**. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 23, 5087-5090.
- Olivera B. M., McIntosh J. M., Clark C., Middlemas D., Gray W. R. y Cruz L. J. **1985**. A sleep-inducing peptide from *Conus geographus* venom. *Toxicon* 23, 277-282.
- Olivera B. M., Rivier J., Clark C., Ramilo C. A., Corpuz G. P., Abogadie F. C., Mena E. E., Woodward S. R., Hillyard D. R. y Cruz L. J. **1990**. Diversity of *Conus* nuropeptides. *Science* 249, 257-263.
- Olivera B. M., Miljanich G. P., Ramachandran J. y Adams M. E. **1994**. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 823-867.
- Olivera B. M., Walker C., Cartier G. E., Hooper D., Santos A. D., Schoenfeld R., Shetty R., Watkins M., Bandyopadhyay P. y Hillyard D. R. **1999**. Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. *Ann. NY Acad. Sci.* 870, 223-237.
- Rex M. A., Stuart C. T. y Coyne G. **2000**. Latitudinal gradients of species richness in the deep sea benthos of the North Atlantic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 55-67.
- Rigby A.C., Lucas-Meunier E., Kalume D.E., Czerwiec E., Hambe B., Dahlqvist I., Fossier P., Baux G., Roepstorff P., Baleja J. D., Furie B. C., Furie B. y Stenflo J. **1999**. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca^{2+} influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5758-5763.
- Rogers J. P., Luginbuhl P., Pemberton K., Harty P., Wemmer D. E. y Stevens R. C. **2000**. Structure-activity relationship in a peptidic $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *J. Mol. Biol.* 304, 911-926.
- Santos A. D., McIntosh J.M., Hillyard D.R., Cruz L. J. y Olivera B, M. **2004**. The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence *J Biol Chem* 279, 17596-17606.

Sharpe I.A., Gehrmann J., Loughnan M.L., Thomas L., Adams D. A., Atkins A., Palant E., Craik D. J., Adams D. J., Alewwood P. F. y Lewis R.J. 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoreceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neurosci* 4, 902-907.

Shen G. S., Layer T. y McCabe R. T. 2000. Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. *Drug Delivery Today* 5, 98-106.

Shimek R. L. 1983. The biology of the Northeastern Pacific Turridae. III. The Habitat and Diet of *Kurtziella plumbea*. *The Veliger* 26, 10-17.

Shon, K. J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, G. E., Hopkins, C., Gray, W. R., Watkins, M., Hillyard, D. R., Rivier, J., Torres, J., Yoshikami, D. y Olivera, B. M. 1997. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 36, 9581-9587.

Shon, K. J., Olivera B. M., Watkins M., Jacobsen R. B., Gray, W. R., Floresca, C. Z., Cruz, L. J., Hillyard, D. R., Brink, A., Terlau, H. y Yoshikami, D. 1998. μ -Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J. Neurosci.* 18, 4473-4481.

Shon, S.G., Layer, R.T. y McCabe, R.T. 2000. Conopeptides: from deadly venom to novel therapeutics DDT 5, 98-106.

Spence I., Gillessen D., Gregson R.P. y Quinn R.J. 1977. Characterization of neurotoxic constituents of *Conus geographus* (L) venom. *Life Sci.* 21, 1759-1770.

Stone B.L. y Gray W. R. 1982. Occurrence of hydroxyproline in a toxin from the marine snail *Conus geographus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 16, 765-767.

Taylor J. D., Kantor Y. I. y Sysoev A. V. 1993. Foregut anatomy, feeding mechanism, relationships and classification of the Conoidea (=Toxoglossa)(Gastropoda). *Bull. Nat. Hist. Mus. Lond (Zool.)* 59, 125-170.

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

Terlau, H., Stocker, M., Shon, K. J., McIntosh, J. M. y Olivera, B. M. **1996**. μ O-conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels, but not through site I. *J. Neurophysiol.* 76, 1423-1429.

Terlau H., Boccaccio A., Olivera B. M. y Conti F. **1999**. The block of *Shaker* K^+ channels by κ -conotoxin PVIIA is state dependent. *J. Gen. Physiol.* 114, 125-140.

Walker C., Steel D., Jacobsen R. B., Lirazan M. B., Cruz L. J., Hooper D., Shetty R., DelaCruz R. C., Nielsen J. S., Zhou L., Bandyopadhyay P., Craig A. y Olivera B. M. **1999**. The T-superfamily of conotoxins. *J. Biol. Chem.* 274, 30664-30671.