

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE cDNAs PARCIALES
DE PRECURSORES DE O-CONOTOXINAS DEL CARACOL
MARINO *Conus brunneus*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

REGINALDO RIVERA REYES

DIRIGIDA POR

Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE cDNAS PARCIALES
DE PRECURSORES DE O-CONOTOXINAS DEL CARACOL
MARINO *Conus brunneus*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

REGINALDO RIVERA REYES

DIRIGIDA POR

Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ

SINODALES

Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
DIRECTOR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO
SINODAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
SINODAL

Dra. LAURA C. BERUMEN SEGURA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Los conos marinos	3
II.2. <i>Conus brunneus</i>	5
II.3. Conotoxinas	6
II.4. Clasificación y nomenclatura de conotoxinas	11
II.5. Las O-conotoxinas	15
II.6. Utilización de la biología molecular para la secuenciación de de precursores	16
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	21
IV.1. General	21
IV.2. Específicos	21
V. METODOLOGÍA	22
V.1. Materiales	22
V.1.1. Material biológico	22
V.1.2. Equipo	22
V.2. Métodos	23
V.2.1. Purificación de ARN total de conducto venenoso	23
V.2.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	24
V.2.3. Generación de ADNc	25
V.2.3.1. Síntesis de ADNc de cadena sencilla	25
V.2.3.2. Síntesis de ADNc mediante RCP-LD	26

V.2.4. Amplificación de secuencias de ADN de toxinas objeto de estudio	27
V.2.5. Aislamiento de las secuencias de ADN amplificadas	29
V.2.6. Ligación de los fragmentos de ADN en el vector de clonación	30
V.2.7. Transformación y cultivo de bacterias	30
V.2.8. Purificación de los plásmidos que contenían fragmentos de ADN	31
V.2.9. Confirmación de la presencia de los insertos de ADN esperados en el plásmido	32
V.2.10. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN	33
VI. RESULTADOS	35
VI.1. Purificación del ARN total de conducto venenoso	35
VI.2. Generación de ADNc	37
VI.3. Amplificación de secuencias de ADN de toxinas objeto de estudio	37
VI.4. Aislamiento y clonación de los fragmentos de ADN obtenidos	39
VI.5. Purificación de plásmidos y verificación de los insertos	40
VI.6. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN	40
VII. DISCUSIÓN	46
VII.1. La Familia O1	49
VII.2. La Familia O2	51
VII.3. La Familia O3	51
VII.4. Análisis comparativo	52
VIII. CONCLUSIONES	59
IX. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Venenos de conos con potencial terapéutico	7
2	Clasificación de los péptidos de <i>Conus</i> de acuerdo a sus enlaces disulfuro	8
3	Modificaciones postraduccionales de las conotoxinas	10
4	Arreglos de cisteína encontrados en conotoxinas	11
5	Secuencias conocidas de péptido señal	13
6	Parámetros obtenidos en la cuantificación de ARN por espectrofotometría	35
7	Determinación de la cantidad de ADN necesaria para la ligación de los productos de las RCPs	39
8	Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP SFOF2-adCDS	41
9	Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP 5' PCR Primer-SFOR1	41
10	Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP SFOF1-SFOR1	42
11	Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP SFOF1-adCDS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Dos especies de conos marinos	3
2	Aparato venenoso del cono	4
3	Concha de <i>Conus brunneus</i>	5
4	Estructura del precursor de conotoxinas	9
5	Comparación de residuos entre conotoxinas	12
6	Clasificación de las conotoxinas	14
7	Proceso de producción de las conotoxinas	19
8	Ecuación para diseñar la ligación de los fragmentos de la RCP	30
9	Conducto venenoso de <i>C. brunneus</i>	35
10	Electroforesis nativa en gel de agarosa de ARN	36
11	Electroforesis en gel de agarosa del ADNc	37
12	Cebadores usados en las RCP realizadas	38
13	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RCP	39
14	Alineamiento de los precursores obtenidos	44
15	Alineamiento de las toxinas maduras predichas de los precursores	44
16	Cladograma consenso de las secuencias de precursores de O-conotoxinas	45
17	Alineamiento de la toxina madura de Br7.1 con distintas toxinas antes reportadas	54
18	Alineamiento de la toxina madura de Br7.5 con distintas toxinas antes reportadas	55
19	Alineamiento de la toxina madura de Br7.7 con distintas toxinas antes reportadas	56
20	Alineamiento de la toxina madura de Br7.13 con distintas toxinas antes reportadas	56

21	Alineamiento de la toxina madura de Br7.15 con distintas toxinas antes reportadas	57
----	---	----

RESUMEN.

Los conos marinos son depredadores que utilizan veneno para paralizar a las presas con las que se alimentan. Este veneno contiene conotoxinas proteicas que atacan blancos celulares en las presas. La existencia de similitudes estructurales entre los blancos celulares de las toxinas en las presas y los receptores celulares humanos hace posible utilizar las conotoxinas para desarrollar agentes bioactivos potencialmente útiles para tratar enfermedades o como herramientas de investigación. En la presente tesis, se utilizaron las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa y Amplificación Rápida de los Extremos de ADNc, ("PCR" y "RACE") para identificar los precursores de O-conotoxinas en el ácido desoxirribonucleico complementario del conducto venenoso de *Conus brunneus*, un cono que habita en las costas mexicanas del Pacífico. Este trabajo dio como resultado la secuencia de 42 precursores de O-conotoxinas que contienen 11 nuevas toxinas. La amplia variedad de efectos generados por miembros de esta familia de péptidos genera expectativas acerca del potencial uso de las toxinas identificadas.

I. INTRODUCCIÓN.

La búsqueda de compuestos activos a partir de fuentes naturales es una estrategia común usada en la farmacología y la investigación básica. Se ha encontrado una gran cantidad de compuestos activos importantes para el desarrollo humano en diversos organismos. Esta búsqueda continúa en nuestros días para generar conocimiento y fármacos para tratar enfermedades humanas.

Los gasterópodos del género *Conus* o conos marinos son un grupo de depredadores estudiado en todo el mundo por producir compuestos activos y usarlos como veneno. Su distribución geográfica es muy amplia; especies de este grupo habitan en cada uno de los continentes y algunas se encuentran en México.

La mayor característica del género es la concha cónica que los organismos poseen, además, todas las especies de conos son depredadores estrictos; su estrategia de caza se basa en la inyección de compuestos con actividad sobre el sistema nervioso a sus víctimas para paralizarlas, lo que facilita la captura de las presas y la alimentación de los conos. El veneno posee una elevada eficacia debido a que está constituido de hasta 200 péptidos distintos, cada uno de los cuales presenta una potencia y especificidad extraordinarias, incluyendo compuestos más potentes que la morfina para aliviar el dolor que no generan adicción ni tolerancia, como la ω -conotoxina MVIIA, que fue aprobada a finales de 2004 para el tratamiento del dolor crónico.

La gran diversidad de péptidos presentes en este veneno y la amplia variedad de especies de conos (de 500 a 700) conforman una “biblioteca natural de compuestos activos” de gran valor para la investigación neurológica y farmacológica.

El veneno de los conos está constituido en gran parte por péptidos con múltiples enlaces disulfuro llamados conotoxinas, las cuales son expresadas inicialmente

como prepropéptidos, es decir, forman parte de un precursor peptídico más largo y se ubican en el extremo carboxilo.

A partir del conocimiento de la estructura conservada de precursores de conotoxinas en los años 90, se aborda el estudio de los componentes venenosos mediante biología molecular; las secuencias nucleotídicas obtenidas de esta forma son usadas para conocer la composición peptídica de los venenos y posteriormente caracterizarlos.

Actualmente se desconoce el potencial del veneno de muchas especies, por lo que es importante investigar la composición peptídica de estos venenos.

II. ANTECEDENTES.

II.1. Los conos marinos.

Los caracoles cono o conos marinos son gasterópodos que conforman el género *Conus* y se encuentran en regiones tropicales de mares y océanos en todo el mundo: desde *C. textile* en la región del Indo-pacífico, hasta *C. spurius* en la región del Atlántico occidental (Abbot y Dance, 2000). En la Figura 1 se muestran fotografías de especímenes vivos de dos especies diferentes de conos marinos colectados en las costas de Jalisco.

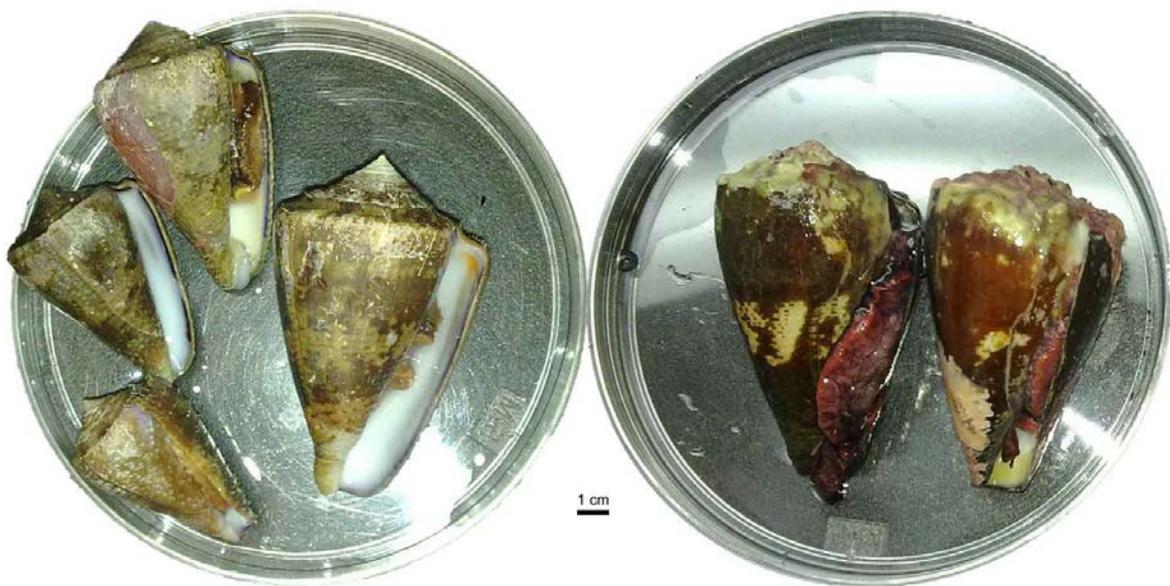


Figura 1. Dos especies de conos marinos. Izquierda, especímenes de *Conus purpurascens*. Derecha, especímenes de *Conus brunneus*. Nótese el periostraco y el crecimiento de coral asociado a las conchas.

La evidencia paleontológica data los primeros ejemplares confirmados del género hace 50 a 55 millones de años con un gran aumento de especies en los últimos 2 millones de años (Kohn, 1990).

El primer esfuerzo por clasificar a los conos marinos lo realizó Carl Linnaeus en su obra *Systema Naturae* en 1758, donde aparecen agrupados dentro de la clase “*Vermes*” (Linnaeus, 1758). El género está actualmente clasificado dentro del phylum Mollusca, clase Gastropoda, superfamilia Conoidea, familia Conidae y contiene aproximadamente 700 especies (Halai y Craik, 2009).

La totalidad de las especies son depredadoras, aun frente a la lentitud de su movilidad. El éxito de su estrategia de caza se basa en la inyección de poderosos venenos con un aparato anatómico característico, que se muestra en la Figura 2.

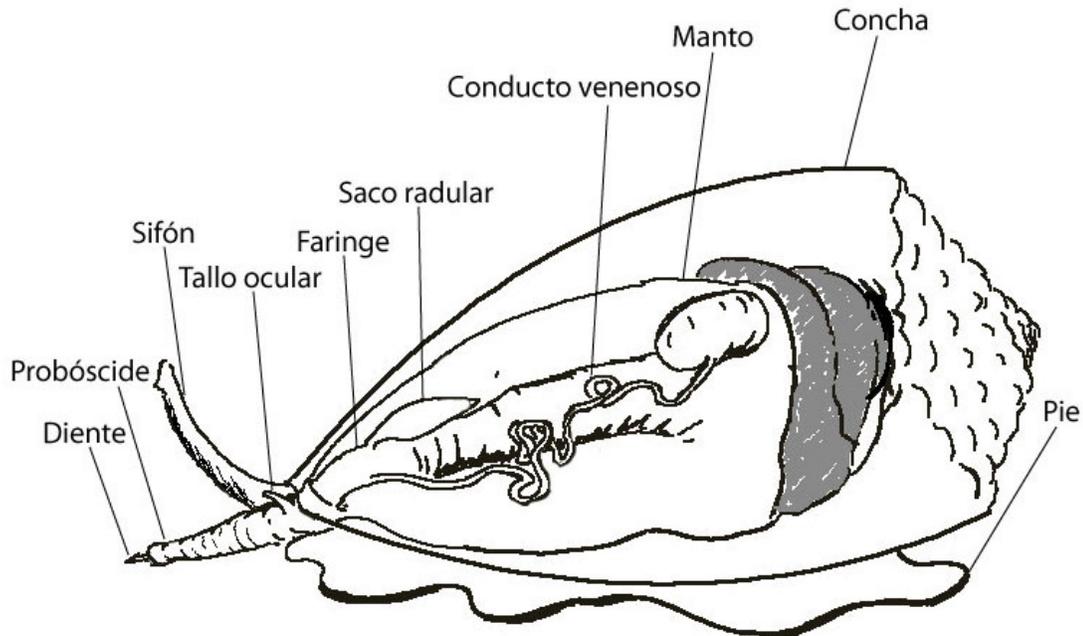


Figura 2. Aparato venenoso del cono. El aparato venenoso se compone de un conducto donde se produce el veneno; la faringe y probóscide son compartidas con el tubo gástrico, mientras que los dientes para la inyección del veneno son producidos en el saco radular (modificado de Halai y Craik, 2009).

Cuando los conos sienten a su presa mediante el sifón y su órgano quimiorreceptor, el osfradio, usan uno de sus dientes provenientes del saco radular como arpón; la probóscide es capaz de proyectar el diente hacia la víctima e

inyectar el veneno. Este diente está conectado a un ligamento para que la víctima no pueda escapar (Schulz y col., 2004).

La dieta de cada especie es siempre especializada y se clasifican de acuerdo a ésta en vermívoros, molusquívoros y piscívoros. Sin embargo algunas especies como *Conus californicus* se alimentan de todas estas fuentes (Duda y col., 2001).

II.2. *Conus brunneus*.

Conus brunneus es un cono marino de concha color café-marrón y moteado blanco irregular en la parte media de la concha, llega a medir hasta 8 cm de largo por 4 cm de ancho. La corona de su concha por si sola es característica pues presenta nódulos regulares y es de color claro. La Figura 3 muestra la concha característica de *C. brunneus*.



Figura 3. Concha de *Conus brunneus* (Paganelli, 1998).

El cono marino *C. brunneus* fue identificado por primera vez en 1828 por John Wood en su obra *Index Testaceologicus* (Wood, 1828). Su distribución se extiende en el Pacífico Este, desde México hasta Ecuador; su hábitat son regiones intermareales y poco profundas del lecho marino. En México, *C. brunneus* se puede encontrar comúnmente en la costa de todos los estados que limitan con el océano Pacífico, desde Baja California Norte hasta Chiapas (Abbot y Dance, 2000).

C. brunneus es un cono vermívoro, que se alimenta de forma predominante de gusanos de fuego o poliquetos anfinómidos. A diferencia de éstos, *C. brunneus* no es capaz de moverse rápidamente, por lo que necesita inmovilizarlos mediante su veneno (Duda y col., 2001).

Cabe añadir que *C. brunneus* ha sido poco estudiado, en especial lo que se refiere a sus venenos (Kaas y col., 2008; Sayers y col., 2009). Por un lado, se han secuenciado fragmentos de su ARN ribosomal 12S y 16S, fragmentos de su proteína calmodulina y la subunidad I de su citocromo oxidasa para estudiar su filogenia. Por otra parte, se conoce un fragmento de precursor de una A-conotoxina obtenido mediante biología molecular (Olivera, 2006) y 4 toxinas maduras, secuenciadas por degradación de Edman y parcialmente caracterizadas; una perteneciente a la superfamilia A, dos a la superfamilia M y una más de la superfamilia P (Pellicer, 2006).

II.3. Conotoxinas.

El veneno de los conos es una mezcla de compuestos activos, en el que se han identificado pocos elementos de origen no peptídico como la serotonina (McIntosh y col., 1993), por lo que se considera que su actividad proviene en su mayor parte de péptidos. El tamaño de los péptidos en el veneno es muy variado y los blancos de éstos sobre la célula van desde canales iónicos activados por ligando como el receptor de acetilcolina nicotínico (nACh) (Livett y col., 2006), canales iónicos activados por voltaje como canales de calcio (Bowersox y Luther, 1998), hasta

proteínas acopladas a proteína G como el receptor α_1 adrenérgico y transportadores de neurotransmisor como el transportador de noradrenalina (Sharpe y col., 2001).

La eficacia del veneno se debe a una mezcla de hasta 200 péptidos, cada uno con gran potencia y especificidad por su blanco en la célula (Olivera y col., 1990). Las características de este veneno y la amplia variedad de especies de conos conforman una “biblioteca natural de compuestos activos” de gran valor para la investigación neurológica y farmacológica (Becker y Terlau, 2008). En el Cuadro 1 se muestran algunos de los péptidos provenientes de conos con posibilidades de usarse como medicamentos en un futuro.

Cuadro 1. Venenos de conos con potencial terapéutico (Olivera, 2006; Kaas y col., 2010).

Blanco molecular	Conopéptidos	Aplicación terapéutica	Compañía	Etapas de desarrollo
Canales de calcio tipo N (Cav2.2)	ω -MVIIA	Dolor	Elan(Neurex)	Aprobado por la FDA en 2004
	ω -CVID	Dolor	Amrad	Fase 1
Receptores de neurotensina	Contulaquina-G	Dolor	Cognetix	Fase 1
Transportadores de norepinefrina	X-MrIA	Dolor	Xenome	Fase 2
Receptores nicotínicos	α -Vc1.1	Dolor	Metabolic	Fase 1
Receptores NMDA	Conantoquina-G	Epilepsia, dolor	Cognetix	Fase 1
Canales de potasio Kv1	κ -PVIIA	Infarto al miocardio	Cognetix	Ensayos pre-clínicos
Canales de sodio	μ O-MrVIB	Dolor	Cognetix	Ensayos pre-clínicos

En la actualidad se estudian estos péptidos y algunos de sus derivados para desarrollar medicamentos; un caso excepcional es el de la toxina MVIIA, más potente que la morfina para aliviar el dolor, pero sin la adicción y tolerancia asociadas a ésta (Bowersox y Luther, 1998).

Los péptidos del veneno de los conos se clasifican de acuerdo a su estructura; el grupo mayoritario de péptidos posee múltiples enlaces disulfuro y es conocido como conotoxinas. Los péptidos con uno o ningún enlace disulfuro se designan con otros nombres: conantoquinas, conorfamidas, conopresinas, etc. El Cuadro 2 muestra esta clasificación.

Cuadro 2. Clasificación de los péptidos de *Conus* de acuerdo a sus enlaces disulfuro. Se muestran ejemplos de las familias de péptidos y sus blancos (Norton y Olivera, 2006).

Peptidos de <i>Conus</i> con 1 o ningún puente disulfuro						
	Sin puentes disulfuro			Con un puente disulfuro		
Familia	Contulaquinas	Conantoquinas	Conorfamidas	Conopresinas	Contrifanos	
Blanco	Receptor de neurotensina	Receptor NMDA	Receptor de FMRFamida	Receptor de vasopresina	Canal de Ca ²⁺ tipo L	
Peptidos de <i>Conus</i> ricos en puentes disulfuro (Conotoxinas)						
Superfamilia	O	M	A	S	T	I
Blancos	Canal de Na ⁺ Canal de K ⁺ Canal de Ca ²⁺	Canal de Na ⁺ Canal de K ⁺ Receptor nACh	Canal de K ⁺ Receptor nACh	Receptor 5-HT ₃	Transportador de norepinefrina	Canal de K ⁺

El estudio de las conotoxinas inició con el análisis de extractos venenosos en los años 50s por Kohn y Endean (Olivera y Cruz, 2001). La secuenciación de algunas conotoxinas se realizó a inicios de los 80s (Gray y col., 1981), utilizando un enfoque bioquímico en el que la cromatografía en columna y la degradación de Edman eran las principales herramientas.

En las siguientes décadas la caracterización farmacológica de distintas conotoxinas purificadas incrementó el interés sobre estos péptidos en el ámbito científico, convirtiéndolas en herramientas importantes de la neurobiología. En ese punto, se estudiaba únicamente la estructura de las toxinas maduras y se desconocía la de sus precursores (Olivera y Cruz, 2001).

En la década de 1990 el descubrimiento de la estructura conservada de los precursores de conotoxinas, realizado mediante la secuenciación de bibliotecas genéticas (Woodward y col., 1990), develó la posibilidad de obtener secuencias de conotoxinas con mayor facilidad. Con estas secuencias ha sido posible secuenciar y caracterizar estos péptidos cada vez con mayor rapidez.

Las conotoxinas son péptidos que se expresan inicialmente como prepropéptidos, es decir, inicialmente forman parte de un precursor peptídico más largo y se ubican en el extremo carboxilo de este, así como se ilustra en la Figura 4.



Figura 4. Estructura del precursor de conotoxinas.

Las secuencias de sus segmentos tienen distintas características. El péptido señal, secuencia señal o secuencia “pre” consta de aproximadamente 20 residuos y tiene una secuencia muy conservada, el propéptido o secuencia “pro” varía de 20 a 60 residuos y tiene bajo grado de conservación, mientras que la toxina madura, que ostenta la actividad biológica, posee entre 12 y 33 residuos y es altamente variable (Halai y Craik, 2009).

Los segmentos de las conotoxinas difieren no solo en variabilidad o tamaño, sino también en su función. El rol del péptido señal o secuencia señal es identificar al péptido en traducción para internarse en el retículo endoplásmico, donde es removido del precursor (Lodish y col., 2003). El propéptido resultante sufre diversas modificaciones postraduccionales en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi para liberar la toxina madura. La secuencia pro juega un papel indispensable en ciertas modificaciones del péptido como la γ -carboxilación de glutamatos, pero su función en la oxidación de la toxina madura y la división del propéptido ha sido

puesta en duda (Bulaj y Olivera, 2008). El resultado de estas modificaciones es la toxina madura.

Los péptidos producidos por especímenes del género *Conus* destacan porque pueden ser sometidas a una gran cantidad de modificaciones postraduccionales. Se han detectado hasta 16 modificaciones diferentes de aminoácidos en todas las toxinas conocidas, incluyendo la formación del puente disulfuro y las divisiones proteolíticas del precursor que sufren todas las toxinas. Estas modificaciones se señalan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Modificaciones postraduccionales de las conotoxinas. Se muestran los aminoácidos modificados y las reacciones de modificación identificadas en algunas conotoxinas (Buczek y col., 2005; Kaas y col., 2010).

4-hidroxi prolina	5-hidroxisilisina
Bromo triptófano	Amidación del carboxilo terminal
D-leucina	D-fenilalanina
D-triptófano	γ -carboxiglutamato
γ -hidroxi-D-valina	Serina glicosilada
Treonina glicosilada	Ácido piroglutámico
Sulfotirosina	Proteólisis del péptido señal
Proteólisis del propéptido	Oxidación de cisteínas

La proteólisis de los precursores de conotoxinas es realizada por proteasas, las cuales fueron caracterizadas recientemente. Estas proteasas reaccionan mediante una triada catalítica de aminoácidos similar a la de las serín-proteasas y su actividad es dependiente de la secuencia del sustrato (Milne, 2008).

La caracterización de estas proteasas permitió predecir con mayor exactitud el sitio de corte del precursor que produce las toxinas maduras, pues anteriormente solo se infería este sitio de corte comparando a las toxinas maduras con los precursores de los que provenían. El sitio de corte está caracterizado por una secuencia de dos aminoácidos básicos, que frecuentemente incluyen arginina y/o lisina. La enzima que proteolisa las O-conotoxinas en los conductos de *Conus literattus* es Tex31, un

miembro por homología de la familia “CRISP” (“Cysteine Rich Secretory Proteins”) (Milne y col., 2003). Actualmente es posible predecir los sitios de corte de las proteasas que dan lugar a las toxinas maduras.

II.4. Clasificación y nomenclatura de conotoxinas.

Las conotoxinas se clasifican para su estudio en Superfamilias génicas, que están delimitadas por dos factores: 1) se toma en cuenta la disposición de las cisteínas en la secuencia de la toxina madura o arreglo de cisteínas y 2) se considera la secuencia peptídica del péptido señal, la cual es muy conservada. En el Cuadro 4 se muestran los arreglos de cisteínas conocidos.

Cuadro 4. Arreglos de cisteína encontrados en conotoxinas. Se muestran solo las conectividades entre cisteínas conocidas (Kaas y col., 2010).

Nombre	No. de Cisteínas	Arreglo de Cisteínas	Conectividad
I	4	CC-C-C	(1-3)(2-4)
II	6	CCC-C-C-C	
III	6	CC-C-C-CC	(1-4)(2-5)(3-6), (1-6)(2-4)(3-5), (1-5)(2-4)(3-6)
IV	6	CC-C-C-C-C	(1-5)(2-3)(4-6)
V	4	CC-CC	(1-3)(2-4)
VI/VII	6	C-C-CC-C-C	(1-4)(2-5)(3-6),
VIII	10	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	
IX	6	C-C-C-C-C-C	(1-4)(2-5)(3-6),
X	4	CC-C-C	(1-4)(2-3)
XI	8	C-C-CC-CC-C-C	(1-4)(2-6)(3-7)(5-8)
XII	8	C-C-C-C-CC-C-C	
XIII	8	C-C-C-CC-C-C-C	
XIV	4	C-C-C-C	(1-3)(2-4)
XV	8	C-C-CC-C-C-C-C	
XVI	4	C-C-CC	
XVII	8	C-C-CC-C-CC-C	
XVIII	6	C-C-CC-CC	
XIX	10	C-C-C-CCC-C-C-C-C	
XX	10	C-CC-C-CC-C-C-C-C	

La clasificación de las conotoxinas de acuerdo al arreglo de cisteínas se debe a que todas las conotoxinas poseen 4 o más de estos residuos para formar puentes disulfuro entre sí. Por ejemplo, el grupo de conotoxinas con arreglo I lo componen conotoxinas con 4 cisteínas en un arreglo CC-C-C, es decir, la secuencia contiene un par de cisteínas adyacentes y la tercera y cuarta cisteína están separadas mediante otros aminoácidos.

El arreglo de cisteínas no solo proporciona estabilidad a la estructura de la proteína, sino también le da la conformación o estructura terciaria, indispensable para interactuar con su blanco, por esta razón es importante para la clasificación. Esta clasificación se inició a la par de estudios para conocer la conectividad de las cisteínas en el puente disulfuro; esa es la razón de la diferenciación de los arreglos I y X. Sin embargo, ha evolucionado para mantener el paso con los descubrimientos y ahora incluye conectividades distintas en un solo arreglo como en el caso del arreglo III.

La importancia del arreglo de cisteínas se evidencia al comparar secuencias de conotoxinas. En la Figura 5 se muestra una comparación entre dos conotoxinas de distintas especies con el mismo tipo de alimentación. En esta figura se muestra la similitud en el alineamiento en la secuencia señal y el marco de cisteínas de la

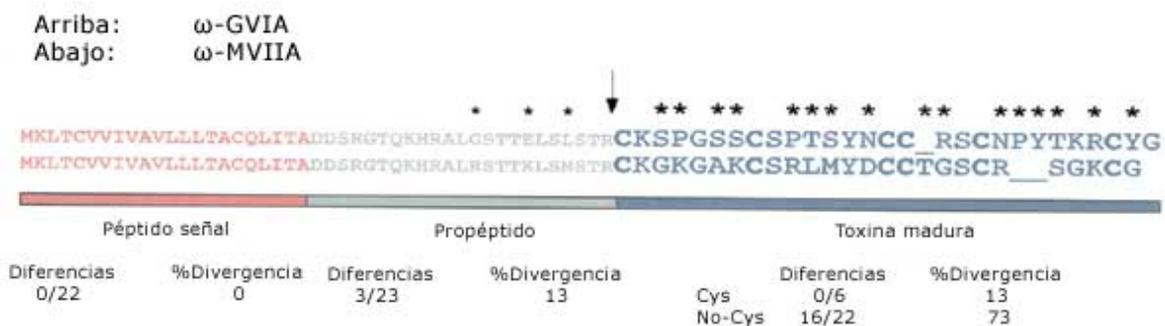


Figura 5. Comparación de residuos entre conotoxinas. El péptido GVIA proviene del veneno de *Conus geographus*, mientras que MVIIA del veneno de *Conus magus*. Los asteriscos señalan diferencias y la flecha señala el inicio de la toxina madura (Olivera, 1997).

toxina madura en el alineamiento, además de la pronunciada divergencia en los demás aminoácidos de la toxina madura.

Una vez conocidas las secuencias conservadas de sus precursores, las conotoxinas fueron clasificadas de acuerdo a superfamilias génicas, las cuales están delimitadas por secuencias consenso en el péptido señal.

Las secuencias consenso son fruto de la secuenciación de bibliotecas de ácido desoxirribonucleico complementario (“ADNc”), pues la caracterización bioquímica habitual no permite analizar los precursores completos de conotoxinas. Las secuencias de los péptidos señal se exponen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Secuencias conocidas de péptido señal. Secuencias de aminoácidos en código abreviado; las secuencias consenso fueron obtenidas de la base de datos Conoserver y presentan los residuos con 60% de similitud en un alineamiento; las X simbolizan posiciones sin residuos predominantes (Kaas y col., 2010).

Superfamilia génica	Secuencia del péptido señal consenso		
	Amino terminal (cargado positivamente)	Dominio central (hidrofóbico)	Dominio carboxilo terminal (hidrofílico)
A	MGMRMMFT	VFLLVVLATTVV	SFTSG
D	MPKLXXX	LLVLLILPLS	YFXAAGG
I1	MKLCXT	FLLVLXILXS	VTGG
I2	MMFRTS	VXCFLLVIXX	LNL
I3	MKLVLA	IVXILMLLS	LSTGA
J	MPSVRS	VTCCCLLWMMLSV	QLVTPGSP
L	MKLSVM	FIVFLMLTMP	MTCA
M	MMSKLG	VXLXIXLXLFP	XXLQLDA
O1	MMKLTC	VXIVAVLFLTA	XXLXTA
O2	MEKLT	LLLVAAVLM	STQALXQX
O3	MSGLGI	MVLTLLLLVFM	XTSHQ
P	MHXXLXXSA	VLILLLXAXX	NFXVVQS
S	MMLKMG	AMFVLLLLFXL	XSSQQ
T	MRCLPV	FXILLLLIXSA	PSVDA
V	MMP	VILXLLLSLAI	RXXDG
Y	MQKAT	VLLLALLLLLP	LSTA

El papel de las secuencias señal es dirigir o marcar a la proteína para su posterior secreción. La conservación de estas secuencias ha abierto la puerta a la identificación de más conotoxinas.

Teniendo en cuenta este par de factores, las superfamilias génicas están delimitadas por una secuencia de péptido señal consenso y ésta a su vez coincide con ciertos marcos de cisteínas. En las excepciones a la regla se favorece siempre a la clasificación por el péptido señal consenso.

Las conotoxinas también se clasifican desde un punto de vista farmacológico. Esta clasificación se basa en los blancos farmacológicos con que estas toxinas interactúan y complementa la clasificación de las superfamilias génicas. En la Figura 6 se muestra la clasificación de las conotoxinas según superfamilias y la caracterización farmacológica de algunos de sus miembros hasta hace poco.

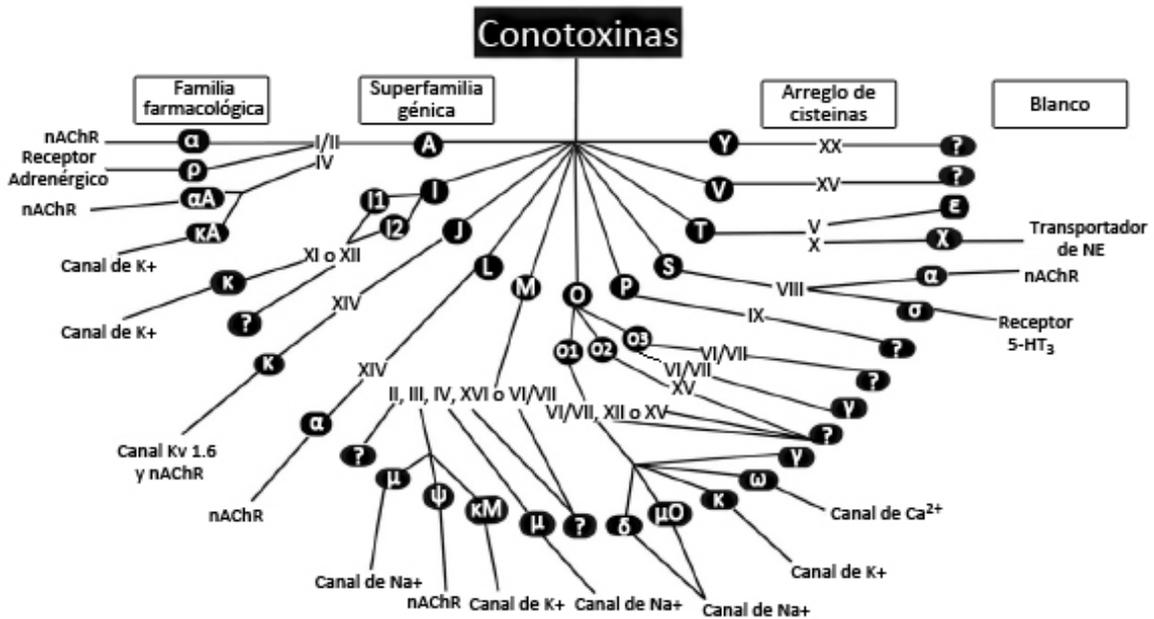


Figura 6. Clasificación de las conotoxinas. Se muestra la clasificación general de las conotoxinas en superfamilias génicas y su correspondencia con los arreglos de cisteínas y familias farmacológicas (Halai y Craik, 2009).

Por último, la nomenclatura de las conotoxinas y sus precursores es diferente. Las secuencias peptídicas con blanco molecular conocido se nombran con una letra mayúscula o un par de letras, mayúscula y después minúscula, que corresponden a la especie de origen, seguidas del marco de cisteínas en números romanos y de una letra mayúscula que distingue a las conotoxinas por orden de aparición. Por ejemplo, la conotoxina MVIIA fue extraído de *C. magus* y tiene el marco de cisteínas VII; la A en el nombre la reconoce como la primera en ser caracterizada bajo estas condiciones.

Los péptidos con blanco desconocido se nombran con un par de letras minúsculas para diferenciar la especie de que provienen, seguidas del número arábigo correspondiente al marco de cisteína y una letra minúscula de identificación de acuerdo a su orden de aparición. El péptido It7b, por ejemplo, es la conotoxina de *Conus litteratus* con arreglo de cisteínas 7 y segunda en conocerse, de ahí la b.

Los precursores de origen nucleotídico se designan con un par de letras, mayúscula y minúscula, seguidas de un número arábigo correspondiente al marco de cisteínas del precursor, un punto y enseguida un número arábigo que señala el orden de aparición. Como ejemplo, Sr5.7 es la toxina de *Conus spurius* con arreglo de cisteínas 5 y séptima en ser descubierta.

II.5. Las O-conotoxinas.

La superfamilia O de conotoxinas consta de 3 familias: O1, O2 y O3 (Zhangsun y col., 2006). La familia de conotoxinas O1 consta de propéptidos con secuencia señal consenso MMKLTC que se organizan en los marcos VI/VII de 6 cisteínas y XII de 8 cisteínas. Esta familia de conotoxinas es por mucho la más extensa de todas las familias de conotoxinas pues incluye hasta el momento 224 secuencias nucleotídicas de precursores completos distintos. Las conotoxinas O1 actúan sobre múltiples blancos moleculares como canales iónicos activados por voltaje y por ligando (Kaas y col., 2010).

La familia O2 de conotoxinas la conforman péptidos con secuencia señal MEKLTl y se encuentran en los marcos VI/VII de 6 cisteínas y XV de 8 cisteínas. Se ha reportado que algunas de estas toxinas actúan sobre canales de cationes activados por voltaje (Fainzilber y col., 1998). Solo se conocen 44 precursores incluidos en esta familia.

La familia O3 de conotoxinas se compone de precursores con secuencia señal MSGLGI y posee un marco de cisteínas VI/VII. Existen únicamente 20 secuencias completas de estas toxinas.

II.6. Utilización de la biología molecular para la secuenciación de precursores.

La identificación de secuencias mediante clonación de ADNc tiene sus precedentes en la década de 1970. A inicios de esta década se descubrió la capacidad de las transcriptasas reversas virales de sintetizar la doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de un molde de ácido ribonucleico (ARN), así como la posibilidad de obtener ADNc a partir del ARN mensajero (ARNm) (Ross y col., 1972).

Casi al mismo tiempo empezaron a diseñarse plásmidos al combinar fragmentos propios de plásmidos bacterianos y fragmentos de ADN obtenidos de otros individuos o cepas, esto mediante enzimas de restricción, conjugando así las propiedades de los 2 fragmentos. Esta técnica es importante pues permite obtener mayores cantidades de este material genético mediante la reproducción de las bacterias (Cohen y col., 1973).

Por otro lado, la secuenciación de ácidos nucleicos mediante el método de terminación de la cadena fue desarrollada a finales los 70s (Sanger y col., 1977).

Más adelante, la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (del inglés “Polymerase chain reaction” o “PCR”) estableció nuevos estándares en el manejo del ADN pues permitió obtener mayores cantidades de material genético (Saiki y col., 1985); aunque las polimerasas termo-resistentes ya habían sido caracterizadas, no fue sino hasta finales de la década de 1980 que se utilizaron en una RCP y la volvieron muy flexible (Chien y col., 1976; Saiki y col., 1987).

La RCP hace uso de oligonucleótidos complementarios a la secuencia que se pretende copiar para generar un número exponencial de copias de una cadena de ADN molde mediante la enzima ADN polimerasa; la extensión de las copias de la cadena está delimitada por la secuencia de los oligonucleótidos, que deben ser complementarios en su secuencia al fragmento que se desea amplificar. Esta reacción es capaz de copiar desde un pequeño número de nucleótidos hasta 40 kilobases, una cantidad mayor que la de algunos genomas virales (Cheng y col., 1994).

La amplificación rápida de los extremos del ADNc (AREA) (del inglés “Rapid amplification of cDNA ends” o “RACE”) es una estrategia de clonación que proviene del uso de la técnica de retrotranscripción seguida de RCP y sirve para generar material genético suficiente como para la clonación de ADNc de poca abundancia en vectores o plásmidos (Frohman y col., 1988). La importancia de la AREA es que restringe la amplificación de ADNc que provienen únicamente de ARNm mediante cebadores o “primers”; esto facilita la clonación de fragmentos específicos de ADNc ya que ciertas moléculas de ARNm se encuentran en bajas concentraciones frente a otros ARNs.

Para conocer las características probables de los resultados esperados mediante clonación de ADNc es necesario conocer el proceso de producción natural de las conotoxinas, el cual se lleva a cabo en diversos pasos en el aparato venenoso del cono.

Las células glandulares que fabrican el veneno se encuentran a todo lo largo del conducto venenoso y es donde se conoce que ocurre la mayor parte de este proceso (Marshall y col., 2002). Primeramente transcriben el ADN genómico en copias de ARN; se ha demostrado que algunos de estos pre-ARNm contienen secuencias de intrones (Yuan y col., 2007), por lo que necesitan ser ajustados y procesados por la poliadenil transferasa y el complejo enzimático de encapuchamiento para convertirse en ARN mensajero (Lodish y col., 2003). La secuencia de estos eventos se inicia por el encapuchamiento del ARNm; tan pronto la ARN polimerasa transcribe la integridad del gen, es añadido a este transcrito de ARN la cola de poli A característica del ARNm. El proceso de ajuste o “splicing” de este pre-ARNm es llevado a cabo después de ser transcrito el gen (Lodish y col., 2003), ya que los genes de conotoxinas no son tan largos en general.

Una vez madurado el ARN en ARNm, sale del núcleo por sus poros y es traducido en los ribosomas. Cabe añadir que al traducirse el ARNm en proteínas, la secuencia señal que contiene dirige al péptido al retículo endoplásmico y es aquí en donde se corta por primera vez al precursor de conotoxina para producir el propéptido.

Después del paso del propéptido por el retículo endoplásmico, pero antes de su excreción al lumen del conducto, este propéptido debe ser procesado en la toxina madura y empaquetado en gránulos, presumiblemente en el complejo de Golgi (Bulaj y Olivera, 2008). Este proceso es esquematizado en la Figura 7.

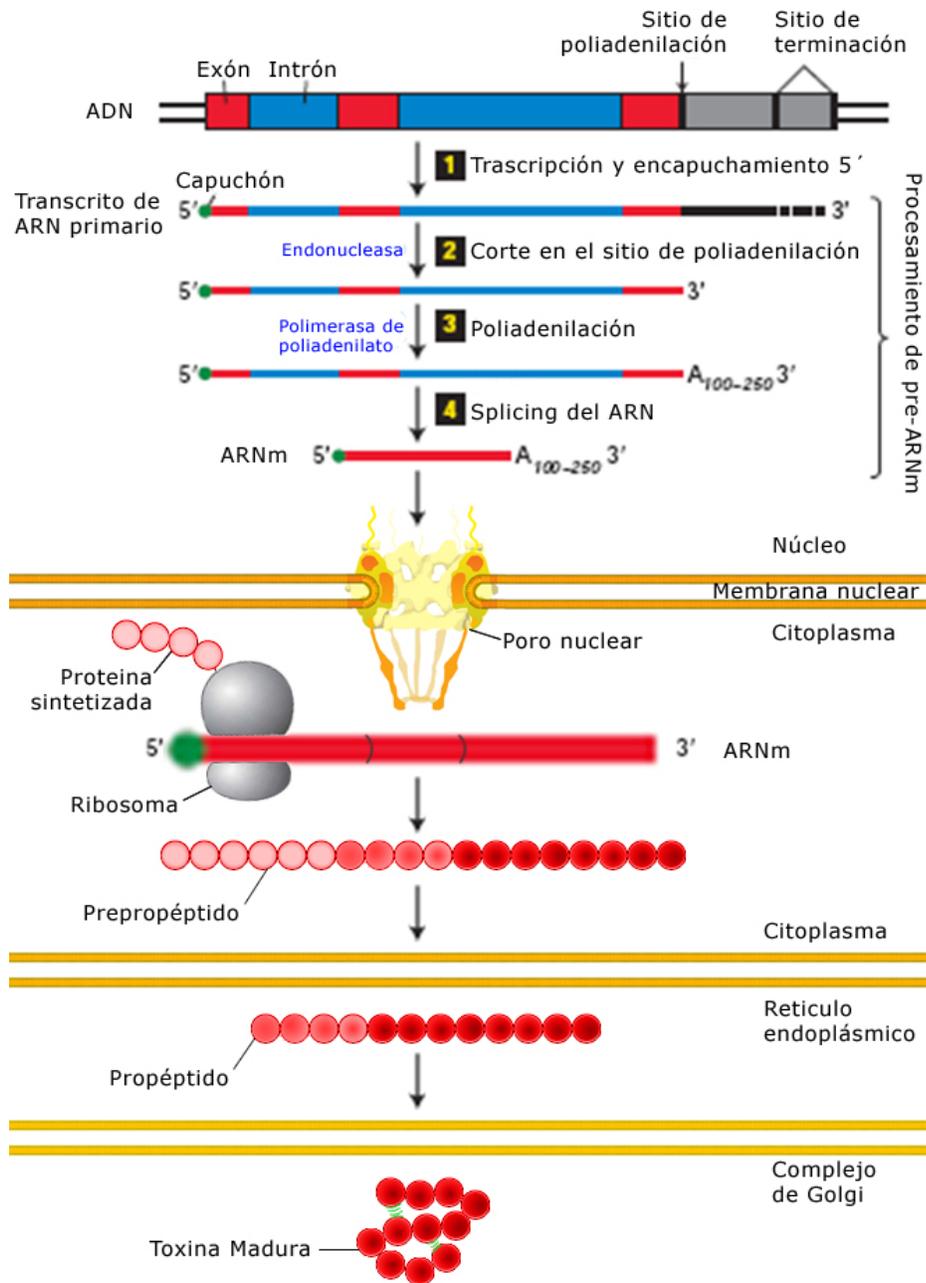


Figura 7. Proceso de producción de las conotoxinas. Se ilustran la transcripción del ADN en ARN, su maduración en ARNm y la traducción del ARNm en proteína, así como el proceso de maduración de la toxina (modificado de Lodish y col., 2003).

III. HIPÓTESIS.

El veneno de la especie *Conus brunneus* encontrada en el Pacífico mexicano contiene conotoxinas de la superfamilia O, cuya secuencia se desconoce.

IV. OBJETIVOS.

IV.1. General.

Obtener las secuencias de los precursores de O-conotoxinas del cono marino *Conus brunneus* contenidos en su material genético.

IV.2. Específicos.

- Diseñar el conducto venenoso de un espécimen de *Conus brunneus* y extraer su ARN.
- Sintetizar el ADNc correspondiente mediante transcripción reversa.
- Buscar los precursores de conotoxinas de la superfamilia O mediante la RCP.
- Clonar y purificar los fragmentos de ADN de los precursores de O-conotoxinas encontrados en bacterias *E. coli* para secuenciarlos.
- Analizar las secuencias de precursores identificadas respecto a su posible función y utilidad.

V. METODOLOGÍA.

V.1. Materiales.

V.1.1. Material biológico.

Un espécimen de *C. brunneus* colectado en la playa de Barra de Navidad, Jalisco.

Retrotranscriptasa “SuperScript II Reverse Transcriptase™”.

Polimerasa “GoTaq Flexi™”.

Vector de clonación “pGEM T-Easy™”.

Células *Escherichia coli* XL1-Blue ultracompetentes.

“SV Total RNA Isolation System”.

“SMART™ cDNA Library Construction Kit”.

“PureLink Quick Gel Extraction Kit”.

“Wizard Plus SV Miniprep Purification System”.

V.1.2. Equipo.

Microscopio estereoscópico.

Kit de disección.

Congelador -20°C y -70°C.

Micropipetas 10 µl, 100 µl y 1 ml.

Homogeneizador.

Microcentrífuga.

Termociclador.

Cámara de electroforesis horizontal.

Transiluminador ultravioleta.

Espectrofotómetro.

Incubadora con agitación orbital.

Centrífuga.

V.2. Métodos.

V.2.1. Purificación de ARN total de conducto venenoso.

Se disecó un espécimen vivo de *C. brunneus*; primeramente se rompió la concha del caracol con una prensa y mucha precaución, enseguida se retiraron con pinzas de disección todos los fragmentos de concha e inmediatamente se localizó la porción superior del cuerpo, cubierta por el manto y que se encuentra justo detrás de la probóscide y los tallos oculares. Una vez ubicado este punto, se abrió el cuerpo del animal al pellizcarlo con unas pinzas de disección afiladas para acceder a las vísceras del caracol.

Abierto el cuerpo del caracol, se pudo distinguir un conducto largo de color blanquecino de diámetro cercano a 1 mm. Este conducto estaba conectado a un bulbo en forma de frijol. El conducto se extrajo en toda su longitud y se introdujo enseguida en 1 ml del reactivo RNAlater dentro de un tubo eppendorf (en lo sucesivo, se usará el término tubo eppendorf para referirse a tubos de propileno de 1.5 ml) para proteger su ARN de degradación. Siguiendo el protocolo, se dejó por una noche a 4°C antes de congelarlo en un ultracongelador BioFreezer Forma Scientific a -70°C hasta su posterior procesamiento.

Para extraer el ARN mediante el kit “SV Total RNA Isolation System”, se descongeló el conducto incluido en RNAlater y se trasladó a un tubo eppendorf con 1 ml de amortiguador de lisis, la composición del amortiguador es isotiocianato de guanidina 4 M, Tris 0.01 M y β -mercaptoetanol 0.97%. Se homogeneizó el contenido del tubo con un homogeneizador Glas-Col a 4,000 rpm y un pistilo de plástico previamente tratado con agua con 0.1% de dietil-pirocarbonato y esterilizado.

Al homogenizado resultante se agregaron 350 μ l de amortiguador de dilución de ARN, el contenido del tubo se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos y el sobrenadante se trasvasó a un tubo eppendorf nuevo.

Al sobrenadante obtenido se agregaron 200 µl de etanol 95% y el contenido del tubo se transfirió a una columna de separación por adsorción con un tubo de recolección y se centrifugó a 12,000 x g por 1 minuto. En adelante se vació el tubo de recolección entre cada paso para reusarlo hasta la elución del ARN.

Se agregaron 600 µl de solución de lavado de ARN, que está compuesta por acetato de potasio 60 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y 60% etanol, y se centrifugó a 12,000 x g por 1 minuto. La columna de separación retiene todos los ácidos nucleicos de la muestra, incluyendo el ADN genómico que representa una contaminación al usar ARN, por lo que esta se trató con 50 µl de una solución ADNasa 1 U/µl y 9 mM de MnCl₂ disueltos en amortiguador de concentración 22.5 mM TRIS y 1.125 M NaCl con pH 7.5. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 15 minutos.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se adicionaron 200 µl de solución de paro de ADNasa, su composición es isotiocianato de guanidina 2 M, Tris-HCl 4 mM pH 7.5 y etanol 57%, y se centrifugó a 12,000 x g por un minuto; se procedió a lavar el material retenido en la columna con 600 µl más de solución de lavado de ARN y centrifugarlo a 12,000 x g, repitiendo este paso con 250 µl más de solución de lavado de ARN.

Por último, se eluyó el ARN de la columna con 100 µl de agua libre de nucleasas en un tubo eppendorf nuevo al centrifugarlos juntos a 10,000 x g por 2 minutos. Alícuotas del ARN obtenido se usaron en la cuantificación de ARN por espectrofotometría y se analizó su integridad en electroforesis en geles nativos de agarosa al 1% en amortiguador TAE.

V.2.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

La electroforesis de ARN en gel se llevó a cabo en geles de agarosa 1% o agarosa de bajo punto de fusión 1.5% disuelta en amortiguador TAE 1x. La composición del

amortiguador fue la siguiente: Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM con pH final 7.5.

Los geles de 10 cm de largo fueron vaciados en una bandeja molde y se les agregó 1 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml, se agitaron y se les adaptó un peine de plástico, del cual se separaron hasta su solidificación.

Una vez que se formaron los pozos se colocaron los geles en el amortiguador TAE de corrida 1X y se cargaron las muestras que contenían 1:1 volúmenes de muestra y amortiguador de carga “Green GoTaq Flexi Buffer” 1x. El campo eléctrico de la cámara de electroforesis se mantuvo a 10 V/cm durante 1 hora o 45 minutos. La electroforesis de ADN se realizó con geles nativos de agarosa al 1% de la misma forma que el ARN.

V.2.3. Generación de ADNc.

V.2.3.1. Síntesis de ADNc de cadena sencilla.

La síntesis del ADNc se realizó con el “SMART™ cDNA Library Construction Kit” de Clontech. La síntesis de la cadena sencilla de ADN se dirigió solo al ARN mensajero, o ARNm, mediante el uso de un cebador o “primer” poliT capaz de hibridar con la cadena de adeninas característica del ARNm, además de un oligonucleótido, que junto a la enzima retrotranscriptasa del virus de leucemia murina finaliza la síntesis de cada extremo 3' de ADN en una secuencia de nucleótidos conocida.

Se agregaron a un tubo de 0.2 ml, 3 µl de ARN, equivalentes a 1 µg de ARN total, 1 µl de oligonucleótido SMART IV™ (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGC CATTACGGCCGGG 3') 12 µM y 1 µl de cebador adaptador CDS III/3' (5' ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGCCGACATG(T)₃₀VN 3') 12 µM; se mezclaron suavemente con una punta de micropipeta y se incubaron a 72°C en un baño seco

por 2 minutos. El tubo se enfrió en hielo por 2 minutos y posteriormente se agregaron 2 μl de amortiguador de cadena sencilla 5X (250 mM Tris, 30 mM MgCl_2 , 375 mM KCl, pH 8.3), 1 μl de ditioneitol (DTT) 20 mM, 1 μl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM y 1 μl de retrotranscriptasa “Smartscribe™ MMLV Reverse Transcriptase” 100 U/ μl .

El contenido del tubo se mezcló con la punta de una micropipeta nuevamente y el tubo se incubó a 42°C por 1 hora. Al terminar, se dejó enfriar el tubo en hielo.

V.2.3.2. Síntesis de ADNc mediante RCP-LD.

La reacción en cadena de la polimerasa de larga distancia (RCP-LD) (del inglés “long distance polymerase chain reaction”) fue utilizada para sintetizar el ADNc de doble cadena correspondiente al ARNm del conducto venenoso y amplificar su número de copias. A un tubo de 0.2 ml se agregaron 2 μl del producto de la reacción de retrotranscripción, 30.2 μl de agua libre de nucleasas, 10 μl de “5X Colorless GoTaq Flexi Buffer”, 3 μl de MgCl_2 25 mM, 1.4 μl de cebador 5' PCR primer 12 μM , 1.4 μl de cebador CDS III/3' 12 μM , 1.2 μl de dNTP Mix 10 mM y 0.4 μl de polimerasa GoTaq 5 U/ μl de acuerdo a los protocolos del laboratorio.

El contenido del tubo se mezcló con la punta de una micropipeta y el tubo se colocó en un termociclador para correr el programa consistente en 1 min a 95°C seguido de 20 ciclos de 15 segundos a 95°C y 6 minutos a 68°C. Una vez terminado el programa, el ADNc se guardó a -20°C.

Una alícuota de 5 μl de ADNc obtenido de esta manera se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% en amortiguador TAE junto a marcadores de peso molecular de ADN con pesos que oscilan entre 100 pares de bases (pb) y 12 kilobases (kb).

V.2.4. Amplificación de secuencias de ADN de toxinas objeto de estudio.

El ADNc obtenido se usó para amplificar fragmentos de ADN que codifican precursores de O-conotoxinas mediante la RCP. Para ello se utilizaron distintos juegos de cebadores para abarcar las familias de O-conotoxinas conocidas.

Todos los cebadores usados en las RCPs provienen de secuencias consenso encontradas en grupos de conotoxinas de cada familia de precursores, ya sea que se ubiquen en la RNT o al inicio del MAL. Por consenso se entiende que el cebador está basado en la mayoría de secuencias y que no todos los ADNs complementarios conocidos son exactamente iguales al cebador. Los cebadores utilizados se dividieron en cebadores anversos o “forward” y reversos o “reverse”. Los nombres de los cebadores corresponden al nombre de la superfamilia O, SFO, y las letras F o R posteriores los identifican como cebadores anversos (F) o reversos (R). Los números añadidos los distinguen entre sí.

Para la familia O1, se utilizaron los cebadores SFOF1 (5' CATCGTCAAG ATGAAACTGACGTG 3') y SFOR1 (5' CACAGGTATGGATGACTCAG 3'). SFOF1 corresponde tanto a un fragmento de región no traducida (RNT) 5', como a 14 nucleótidos de la secuencia del marco abierto de lectura (MAL) que incluyen al codón de inicio. SFOR1 corresponde a una secuencia de la RNT 3' aproximadamente 50 nucleótidos río abajo del codón de paro de la toxina. Los dos fueron reportados previamente (Duda y Palumbi, 1999).

Para la familia O2 se usaron los cebadores SFOF2 (5' GACCCTGCCGTCATCTCAGC 3'), SFOR2 (5' ATTGCYATGRSGRTTATTM 3'), SFOR3 (5' AGCCTTGAAGTCTCTGAAGA 3') y SFOR4 (5' ATTGCRATGYSGYTT TATTK 3'). SFOF2 corresponde a la secuencia de la RNT 5', 52 nucleótidos río arriba del codón de inicio; SFOR2 y SFOR4 se encuentran 107 nucleótidos río abajo del codón de paro, mientras que SFOR3 recae en la secuencia de la RNT 3',

39 nucleótidos río abajo del codón de paro. Las secuencias de SFOF2 y SFOR3 se obtuvieron de la literatura (Conticello y col., 2001), SFOF2 se encuentra en la mayoría de los precursores reportados, sin embargo, la secuencia exacta de SFOR3 solo en 7 de los 45 precursores conocidos, ya que hay hasta 3 nucleótidos que pueden variar entre secuencias. SFOR2 y SFOR4 fueron sintetizados en el laboratorio previamente.

Para la familia O3 se diseñaron 2 cebadores específicos basándose en secuencias conservadas de la RNT 3', SFO3F1 (5' TTCAGGATGTCARGATTGG 3') y SFO3F2 (5' CACTACGTGGCAGTTGCAGT 3'). SFO3F1 contiene el inicio del péptido señal y un fragmento de la RNT 3'; por su parte, SFO3F2 se encuentra 55 nucleótidos río arriba del codón de inicio. Estas secuencias se encuentran en todos los precursores de O3-conotoxinas conocidos.

Para elaborar las RCPs, se conjugaron cada uno de los cebadores anversos con el cebador 3' adCDS (5' ATTCTAGAGGCCGAGGCGGC 3'), que es un fragmento del adaptador adCDS III/3', lo que constituye un AREA 3'. Por otra parte, cada uno de los cebadores reversos se usaron junto al cebador 5', 5' PCR primer (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'), que es un fragmento del cebador SMART IV, en lo que constituye un AREA 5'.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (RCPs) se llevaron a cabo en microtubos de 0.2 ml. A 1 µl de ADNc se agregaron 0.6 µl de cebador anverso 12 µM y 0.6 µl de cebador reverso 12 µM, seguidos de 5 µl de "5X Colorless GoTaq Flexi Buffer", 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.6 µl de mezcla de dNTPs 10 mM y 0.2 µl de polimerasa GoTaq 5 U/µl, completando el volumen a 25 µl con agua libre de nucleasas, de acuerdo a los protocolos del laboratorio.

El programa de termociclado consistió en 1 minuto a 95°C, seguido de 25 ciclos consistentes en 1 minuto a 95°C, 1 minuto a la temperatura de hibridación teórica más baja del juego de cebadores, calculadas de acuerdo al método del vecino más

cercano (Breslauer y col., 1986), y 1 minuto a 72°C, para terminar con 7 minutos a 72°C. Las reacciones se detuvieron al enfriar a 4°C y se preservaron a -20°C.

V.2.5. Aislamiento de las secuencias de ADN amplificadas.

Las RCPs con bandas de ADN prominentes en electroforesis en gel, que poseían un peso molecular por encima de las 400 pb, se cargaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en amortiguador TAE y se corrieron en una electroforesis en gel para purificar el ADN de las bandas del gel.

Una vez ubicadas las bandas en el transiluminador se escindieron del gel con una navaja limpia y se purificó el ADN que contenían mediante el “PureLink Quick Gel Extraction Kit” de Invitrogen.

Brevemente, se colocaron los pedazos de gel de peso menor a 400 mg que contenían las bandas de ADN en un tubo eppendorf y se agregó 1 ml de amortiguador de solubilización de gel, el contenido se incubó a 50°C y se agitó cada 3 minutos hasta cumplir 20 minutos. La solución se transfirió a una columna de purificación acoplada a un tubo recolector y se centrifugó a 12,000 x g por 1 minuto. Se vació el contenido del tubo recolector y se acopló nuevamente para agregar 700 µl de amortiguador de lavado a la columna e incubar 5 minutos a temperatura ambiente; pasados los 5 minutos se centrifugó la columna a 12,000 x g por 1 minuto.

Para eluir el ADN deseado se cambió la columna de purificación a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de amortiguador TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.5) a 70°C; por último se centrifugó el tubo a 10,000 x g por 2 minutos y el eluato se guardó a -20°C hasta su uso. Se obtuvo la concentración de los fragmentos de ADN en un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de 260 nm para determinar la concentración usando el amortiguador TE como blanco.

V.2.6. Ligación de los fragmentos de ADN en el vector de clonación.

Una vez purificados los fragmentos de ADN se ligaron al vector “pGEM-T Easy” de Promega mediante la estrategia T-A; 50 ng de vector de 3 kb de longitud se ligaron a los fragmentos de ADN purificado en una relación 1:3 vector-fragmento; para ello, se agregaron 5 µl de amortiguador de ligación 2X, 1 µl de vector “pGEM-T Easy” 50 ng/µl, el número de ng del fragmento obtenido de la fórmula en la Figura 8, 1 µl de ligasa T4 3 U weiss/µl y el volumen de agua para completar 10 µl a un microtubo de 0.2 ml. La reacción se mantuvo a 4°C por una noche. Al cabo de esta, el tubo se mantuvo a -20 °C hasta la transformación.

$$ADN(ng) = 3 \times \left(\frac{50ng \text{ vector} \times \text{longitud aproximada del fragmento (kb)}}{3 \text{ kb}} \right)$$

Figura 8. Ecuación para diseñar la ligación de los fragmentos de ADN obtenidos de las RCPs.

V.2.7. Transformación y cultivo de bacterias.

La transformación de células *E. coli* con los vectores que contenían los fragmentos resultantes se realizó de la siguiente manera: los 10 µl de reacción de ligación se calentaron a 75°C por 10 minutos para inactivar la ligasa y una vez transcurridos los 10 minutos se tomaron 5 µl de la reacción y se transfirieron a un tubo eppendorf, se agregaron 50 µl de células *E. coli* XL1-blue ultracompetentes provenientes de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología; la dilución de estas células fue de OD₆₀₀= 0.5 en 20 ml de amortiguador TB con 6.5% de dimetil sulfóxido (Inoue y col., 1990). A continuación se transformaron las células mediante choque térmico; se incubaron por 30 minutos en hielo, seguidas de 3 minutos a 42°C y 2 minutos más en hielo. Se agregaron 450 µl de medio LB a las células y se incubaron por 1 hora a 37°C.

El vector “pGEM-T Easy” permite la selección de colonias transformadas respecto de aquellas que no contienen inserto o que no contienen plásmido cuando se cultivan las bacterias en placas de Agar LB-Ampicilina-X-Gal-IPTG. 100 µl de bacterias *E. coli* transformadas se cultivaron en placas de agar LB-Ampicilina-X-Gal-IPTG y se incubaron a 37°C por 1 noche. Se escogieron las colonias blancas resistentes a ampicilina de la placa y con ellas se inocularon tubos de polipropileno con 5.5 ml de medio LB. Las células se incubaron a 37°C por 1 noche en agitación constante, para después extraerles el plásmido que contenía el fragmento de ADN esperado.

V.2.8. Purificación de los plásmidos que contenían fragmentos de ADN.

La purificación de los plásmidos se efectuó con el kit “Wizard Plus SV Miniprep Purification System” de Promega. Se centrifugó el cultivo de bacterias *E. coli* durante 15 minutos a 3,000 x g, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla celular. La pastilla se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión celular, compuesta por Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 µg/ml, y se transfirió a un tubo eppendorf; a este se agregaron 250 µl de solución de lisis celular, NaOH 0.2 M y SDS 1%, y se mezcló el contenido, que se volvió traslúcido. Se agregaron 10 µl de solución de proteasa alcalina y se mezcló vigorosamente; esta proteólisis se lleva a cabo mediante 250 µg de la subtilisina Carlsberg de *Bacillus licheniformis*; la reacción se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y terminado este periodo se inactivó la proteasa con 350 µl de solución de neutralización, cuya composición es: hidrocloreuro de guanidina 4.09 M, acetato de potasio 0.759 M y ácido acético glacial 2.12 M con pH 4.2, y se agitó el contenido del tubo. Se centrifugó el tubo a 12,000 x g por 10 minutos para obtener el sobrenadante acuoso, que se transfirió a una columna de separación acoplada a un tubo de recolección. La columna se centrifugó a 12,000 x g por 1 minuto y el líquido recolectado se descartó. La columna fue lavada con 750 µl de solución de lavado de columna, que está constituida por acetato de potasio 60 mM,

Tris-HCl 8.3 mM, EDTA 0.04 mM y 60% de etanol, y centrifugada a 12,000 x g por 1 minuto para descartar el líquido de lavado. Se lavó la columna una vez más con 250 µl de solución de lavado de columna pero esta vez se aseguró que la columna se secase al centrifugarla a 12,000 x g por 2 minutos.

Para eluir el ADN plasmídico se transfirió la columna a un tubo eppendorf, se agregaron 50 µl de agua libre de nucleasas a la columna y esta se centrifugó a 10,000 x g por un minuto. El ADN resultante se guardó a -20 °C.

V.2.9. Confirmación de la presencia de los insertos de ADN esperados en el plásmido.

Para confirmar la presencia del fragmento de ADN esperado, se realizó una RCP a cada muestra con los cebadores M13. Éstos cebadores son capaces de hibridar con secuencias de ácidos nucleicos que flanquean el sitio de clonación del vector; los cebadores en detalle son “M13 Forward” (código 1, según Sambrook y Russell, 2001) (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') y “M13 Reverse” (Codigo 4) (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3').

Para preparar la reacción, se agregó a un microtubo de polipropileno de 0.2 ml 1 µl del plásmido purificado, 2.5 µl de amortiguador “5X Colorless GoTaq Flexi Buffer”, 0.75 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.3 µl de dNTPs 10 mM, 0.2 µl de cada cebador M13 12 µM, 7.45 µl de agua y 0.1 µl de polimerasa GoTaq 5 U/µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en el programa: 1 minuto a 95°C, 25 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C y un paso terminal de 7 minutos a 72°C. 5 µl de las RCPs se corrieron en un gel de TAE-agarosa 1% para verificar la longitud de los insertos en el vector, a los cuales se agregaron 263 pares de bases propias de la secuencia del vector.

V.2.10. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN.

Los plásmidos que contenían los fragmentos de ADN esperados se llevaron a la concentración de 120 ng/ μ l de acuerdo a su cuantificación con espectrofotometría. Una alícuota de 15 μ l se envió al Departamento de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad para su secuenciación. La secuenciación se realizó con la técnica de los terminadores didesoxi en un secuenciador 3730xl DNA Analyzer de Applied Biosystems.

Se asignó un nombre para cada precursor distinto de acuerdo a la nomenclatura de las conotoxinas. Las secuencias de ADN obtenidas se analizaron con el software ORFinder para obtener la traducción y el marco de lectura del precursor de conotoxina (Tatusov y Tatusov, 2010). El nombre incluye 2 letras que identifican la especie, seguidos del número de arreglo de cisteínas al que pertenece, un punto y finalmente, el número de precursor consecutivo. Se predijo la extensión del péptido señal de cada secuencia mediante el software signalP (Bendtsen y col., 2004).

Por otro lado, se predijo el corte proteolítico que produciría la toxina madura para cada precursor y se obtuvo la secuencia de todos los precursores de O-conotoxinas registrados en la página electrónica Conoserver (Kaas y col., 2008).

Todas las secuencias de péptidos obtenidas se alinearon en el programa ClustalW en un alineamiento múltiple construido en base al puntaje de alineamiento por pares (Chenna y col., 2003). En base al alineamiento se construyó un cladograma en el programa MEGA4. El cladograma se basó en la distancia entre secuencias de aminoácidos obtenidas con el método basado en la matriz JTT; las distancias se expresan como el número de sustituciones de aminoácidos por sitio en la secuencia. Los espacios derivados del alineamiento se eliminaron solo en la comparación por pares de secuencias. La topología del cladograma se calculó en base a las distancias entre secuencias de acuerdo al algoritmo del vecino más cercano o “neighbor-joining”. El árbol construido se validó por remuestreo por

reemplazamiento o “bootstrap analysis” 2000 veces para obtener las distancias con un intervalo de confianza del 95% (Saitou y Nei, 1987; Jones y col., 1992; Tamura y col., 2007).

VI. RESULTADOS.

VI.1. Purificación del ARN total de conducto venenoso.

La disección del conducto venenoso se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina. El conducto venenoso obtenido es un tubo de tejido de unos 7 cm de largo y 2 a 3 mm de diámetro con un peso cercano a los 70 mg. El tubo se guardó de acuerdo a las instrucciones del fabricante en solución estabilizadora RNAlater como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Conducto venenoso de *C. brunneus*. Se muestra el conducto venenoso en RNAlater después de descongelarse.

La purificación de ARN realizada en columnas de separación fue eficiente ya que el procedimiento es simplificado. El ARN obtenido se trata con ADNasa I para eliminar contaminación de ADN y la calidad del ARN siempre fue consistente. En el Cuadro 6 se muestran los parámetros obtenidos al determinar la calidad del ARN utilizado, de acuerdo a la cuantificación espectrofotométrica.

Cuadro 6. Parámetros obtenidos en la cuantificación de ARN por espectrofotometría

	A ₂₆₀	[ARN]ng/μl=A ₂₆₀ × 40	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /230
<i>C. brunneus</i>	9.071	362.9	2.1	2.24
Araña	15.183	607.3	2.17	2.36

De acuerdo a la literatura, el ARN en solución acuosa tiene una relación A_{260}/A_{280} óptima de 2.0 ± 0.1 y una relación A_{260}/A_{230} óptima mayor que 2.0 y menor que 2.4. Los parámetros del ARN obtenidos en nuestros experimentos fueron $A_{260}/A_{280} = 2.1$ y $A_{260}/A_{230} = 2.24$, los cuales están dentro de estos rangos (Farrell, 2010).

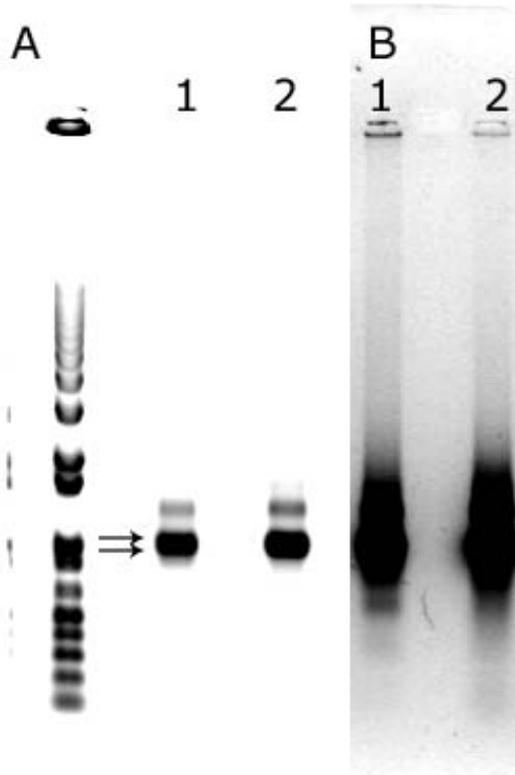


Figura 10. Electroforesis nativa en gel de agarosa de ARN. 1. ARN extraído del conducto venenoso de *C. brunneus*. 2. ARN extraído de una araña de peso similar al conducto. A. Fotografía con exposición baja. B. Mismo gel con una exposición mayor. Las flechas señalan la ubicación de las especies de ARN mayoritarias.

En la Figura 10 se muestra el ARN extraído del conducto venenoso y el de una araña con un peso equivalente, en una electroforesis nativa en un gel de agarosa al 1%. Un barrido de la señal a lo largo del carril y sobre todo en la parte inferior indicaría la degradación del ARN, pero este no se observó. El marcador de peso molecular de ADN en la Figura 10 A se cargó con fines de estandarización.

VI.2. Generación de ADNc.

La RCP-LD generó un barrido de ADN de acuerdo al protocolo del fabricante del kit. El barrido supone la amplificación de todas las especies de ARN poliA+, siendo que estas se distribuyen en un margen amplio de longitudes. El barrido era visible hasta por encima de las 2 kb. Cabe mencionar que no todas las especies de mensajero amplificadas son visibles en la electroforesis (Figura 11).

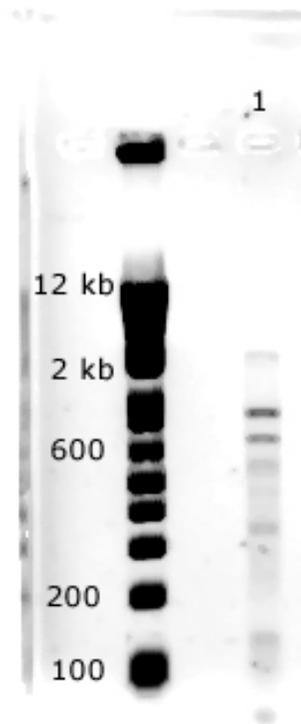


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del ADNc. 1. ADNc obtenido en la reacción de RCP-LD. Se muestra marcador de peso molecular “1 kb DNA Plus Ladder” de Invitrogen

VI.3. Amplificación de secuencias de ADN de toxinas objeto de estudio.

El resultado de las RCPs llevadas a cabo con el ADNc fueron bandas bien definidas en los juegos de cebadores SFOF1-adCDS 3', SFOF1-SFOR1, 5' PCR

primer-SFOR1 y SFOF2-adCDS 3', no así en los demás juegos de cebadores (Figuras 12 y 13).

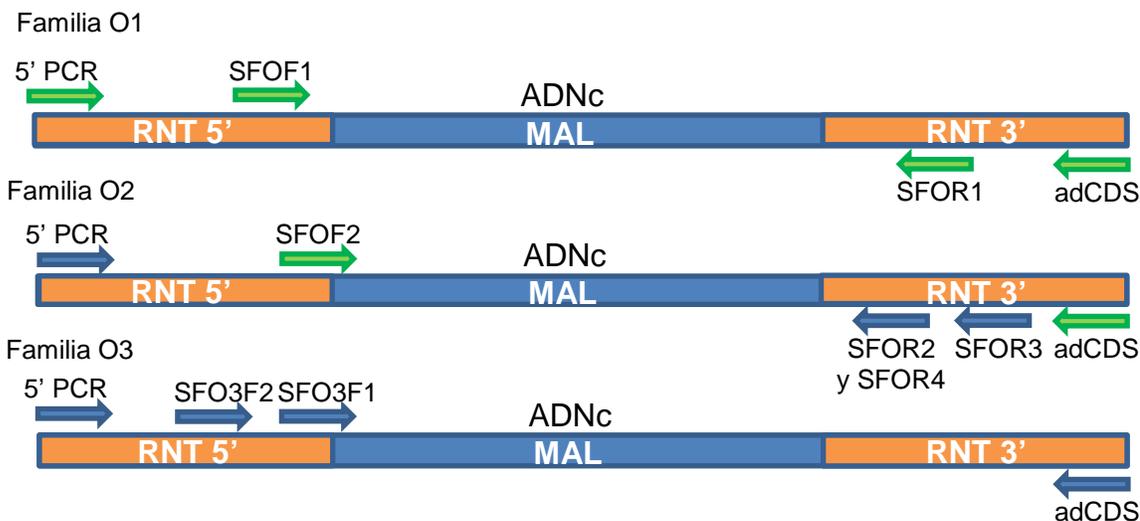


Figura 12. Cebadores usados en las RCPs realizadas. Se muestra un diagrama con la ubicación ilustrativa de los cebadores. Las flechas verdes corresponden a los cebadores que amplificaron fragmentos de ADN

Al usar el juego de cebadores SFOF1-adCDS para amplificar la familia O1, se amplificó un fragmento de 450 pb que correspondería al MAL y la RNT 3' completa del ARNm (Figura 13).

El juego de cebadores SFOF1-SFOR1 amplificó unas 400 pb que comprenden tanto al MAL como algunos nucleótidos de las RNTs (Figura 13).

El juego de cebadores 5' PCR primer-SFOR1 incluye un fragmento de la RNT 3', el MAL y la RNT 5' completa. El resultado fue una amplificación de alrededor de 450 pb (Figura 13).

Mientras que en la familia O2, SFOF2-adCDS amplificó un fragmento de 500 pb que correspondería a una secuencia corta de la RNT 5', el MAL y la RNT 3' (Figura 13).

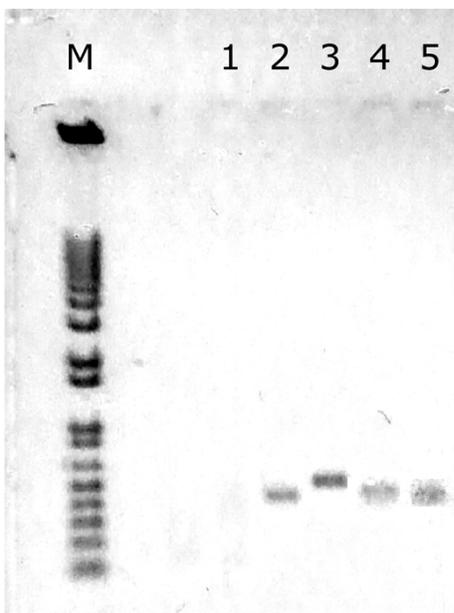


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RCP. M. marcador de peso molecular “1 kb Plus DNA Ladder” de Invitrogen, 1. Blanco, 2. SFOF1-SFOR1, 3. SFOF2-adCDS, 4. SFOF1-adCDS, 5. 5'PCR-SFOR1

VI.4. Aislamiento y clonación de los fragmentos de ADN obtenidos.

Los productos de las 4 RCPs: SFOF1-SFOR1, SFOF2-adCDS, SFOF1-adCDS y 5'PCR-SFOR1 se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se purificaron las bandas, obteniendo concentraciones de los fragmentos de ADN promedio de 10 ng/μl. Para usar una relación molar 3:1 fragmento:vector en la ligación de los fragmentos, se realizaron los cálculos descritos en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Determinación de la cantidad de ADN necesaria para la ligación de los productos de las RCPs.

Juego de cebadores	Cantidad de ADN
SFOF1-adCDS	$ADN(ng) = 3 \times \left(\frac{50ng \text{ vector} \times 0.45 (kb)}{3 kb} \right)$ $ADN = 22.5 ng$
SFOF2-adCDS	$ADN(ng) = 3 \times \left(\frac{50ng \text{ vector} \times 0.5 (kb)}{3 kb} \right)$ $ADN = 25 ng$
SFOF1-SFOR1	$ADN(ng) = 3 \times \left(\frac{50ng \text{ vector} \times 0.4 (kb)}{3 kb} \right)$ $ADN = 20 ng$
5'PCR-SFOR1	$ADN(ng) = 3 \times \left(\frac{50ng \text{ vector} \times 0.45 (kb)}{3 kb} \right)$ $ADN = 22.5 ng$

A las reacciones de ligación de los fragmentos se agregó la cantidad de ADN indicada.

Una vez realizada la ligación y la clonación del vector en las bacterias, estas se cultivaron en placas de agar LB Ampicilina-IPTG-X-Gal, en las cuales se pudo diferenciar las colonias transformadas con el inserto de aquellas no transformadas. Las colonias transformadas con el inserto crecieron con un color blanco mientras que las transformadas con vector sin inserto lo hicieron con un color azul.

VI.5. Purificación de plásmidos y verificación de los insertos.

El cultivo en medio LB líquido se realizó en un ambiente estéril asegurándose de incluir controles negativos antes y después del cultivo para garantizar que las bacterias inoculadas eran solo aquellas obtenidas de las placas.

Se purificaron los plásmidos provenientes de por lo menos 12 colonias distintas. La purificación de plásmidos de las colonias generó rendimientos de hasta 250 ng/μl siendo la concentración mínima 100 ng/μl.

Al revisar la inserción de los fragmentos de ADN en el vector mediante RCP, se amplificaron 263 pb más, correspondientes a las secuencias del vector entre los cebadores M13 y el sitio de clonación múltiple. Las RCPs realizadas mostraron bandas de 720 a 770 pb de acuerdo al fragmento de ADN clonado, lo que confirmó la presencia de los fragmentos de ADN que fueron ligados en el vector.

VI.6. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN.

Del juego de cebadores SFOF2-adCDS se purificó el plásmido de 15 colonias distintas y la secuenciación produjo 14 secuencias útiles con una identidad de 37 a 100% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP SFOF2-adCDS. Se muestran las secuencias del marco abierto de lectura, el número de residuos que contienen y el número de repeticiones obtenidas.

Nombre asignado	Secuencia de aminoácidos obtenida	Residuos	Repeticiones
Br7.1	MEKLTILLVVTVLVSTQAMIQGDIEKRRKAKINIFSKRK TTAERWWDGECRSWSNKCEWPWHCCSNDCECT LW	76	9
Br7.2	MEKLTILLVVTVLVSTQAMIQGGDIKRRKAKINIFSKRK TTAERWWDGECRSWSNKCEWPWHCCSNDCECT LW	76	1
Br7.3	MEKLTILLVVTVLVSTQAMIQGDMEKRRKAKINIFSKR KTTAERWWDGECRSWSNKCEWPWHCCSNDCECT TLW	76	1
Br7.4	MEKLTILLVVTVLVPTQAMIQGDIEKRRKAKINIFSKRK TTAERWWDGECRSWSNKCEWPWHCCSNDCECT LW	76	1
Br7.5	MKLTILLVAVLMSTQALIQQGGRENPKAKMNFLLKAR RLPGSRQIAEKCGGWICEDTWDCYYAECKDGYCVEI	75	1
Br7.6	MEKLTILLVVTVLVSTQAMIQGDIEKRRKAKINIFSKRK TTAGRWWDGECRSWSNKCEWPWHCCSNDCECT LW	76	1

Del juego de cebadores 5' PCR Primer-SFOR1 se purificó el plásmido de 12 colonias distintas, cuya secuencia tuvo una identidad de 96 a 100% (Cuadro 9).

Cuadro 9. Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP 5' PCR Primer-SFOR1. Se muestran las secuencias del marco abierto de lectura, el número de residuos que contienen y el número de repeticiones obtenidas.

Nombre asignado	Secuencia de aminoácidos obtenida	Residuos	Repeticiones
Br7.7	MKLTCVLIVAMLFLTVLQITPDDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFLENHECCSKFCDFSDI PLRYCSTP	83	9
Br7.8	MKLTCVLIVAMLFLTVLQIAPDDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFLENHECCSKFCDFSDI PLRYCSTP	83	1
Br7.9	MKLTCVLIVAMLFLTVLQIPITPDDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFLENHECCSKFCDFSDI PLRYCSTP	83	1
Br7.10	MKLTCVLIVAMLFLTVLQITADDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFLENHECCSKFCDFIDIP LRYCSTP	83	1

Del juego de cebadores SFOF1-SFOR1 se purificó el plásmido de 12 colonias distintas y la secuenciación produjo 10 secuencias útiles con una identidad de 95 a 100% (Cuadro 10).

Cuadro 10. Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP SFOF1-SFOR1. Se muestran las secuencias del marco abierto de lectura, el número de residuos que contienen y el número de repeticiones obtenidas.

Nombre asignado	Secuencia de aminoácidos obtenida	Residuos	Repeticiones
(Br7.10)	MKLTCVLIVAMLFLTVCQLITADDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFLENHECCSKFCDFIDIP LRYCSTP	83	8
Br7.11	MKLTCVLIVAMLFLTVCQLITADDSRDKQEYPAERWR TKMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFCPENHECCSKFCDFIDI PLRYCSTP	83	1
Br7.12	MKLTCVLIVAMLFLTVCQLITADDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVLCLENHECCSKFCDFIDIP LRHCSTP	83	1

Cuadro 11. Secuencias de aminoácidos obtenidas de la RCP SFOF1-adCDS. Se muestran las secuencias del marco abierto de lectura, el número de residuos que contienen y el número de repeticiones obtenidas.

Nombre asignado	Secuencia de aminoácidos obtenida	Residuos	Repeticiones
Br7.13	MKLTCVLIVALLFLTACQLITADYSRDDYRAVMGLGRR NSKDSRDCQESGQGCTGSPCCPGLSCSGTHAGGT CVG	76	1
Br7.14	MKLTCVLIVALLFLTACQLITADYSRDDYRAVMGLGRR NSKDSRDCQESGQGCTGSPCCPGLSCSGTHAGGM CVG	76	1
Br7.15	MKLTCMMIVAVLFLTAWIFVTADDSANGLENLPQTIRH EMKNPEASKLNKRDCLPDYMLCAFNMGLCCSDKCML VCLP	78	1
Br7.16	MKLTCVLIVAMLFLTVCRLITPDDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFLENHECCSKFCDFSDI PLRYCFTP	83	1
Br7.17	MKLTCMIVAVLFLTAWIFVTADDSANGYENLPQTTTRHE MKNPEASKLNKRIICIPDYKFCAFHRDPCCSGNCLYIR VP	78	1
(Br7.7)	MKLTCVLIVAMLFLTVCQLITPDDSRDKQEYPAERWRT KMQNSKRRTTSTRKCKGPLVFLENHECCSKFCDFSDI PLRYCSTP	83	1

Del juego de cebadores SFOF1-adCDS se purificó el plásmido de 12 colonias distintas y la secuenciación produjo solo 6 secuencias útiles con una identidad de 31 a 97% (Cuadro 11).

Algunas de las secuencias obtenidas se repitieron en distintos juegos de cebadores; este es el caso de las secuencias Br7.7 y Br7.10, que aparecen entre comillas (Cuadros 10 y 11) y fueron secuenciadas de colonias con distintos juegos de cebadores de la familia O1, esto fue producto de amplificar distintas partes de los precursores en la búsqueda de la mayor cantidad de precursores existentes.

En resumen, las 42 secuencias obtenidas codifican a 17 precursores distintos. 11 de estos pertenecen a la familia O1 y 6 pertenecen a la familia O2 de acuerdo a la su similitud con el péptido señal consenso (Figura 14).

Los 17 precursores distintos contienen 11 toxinas maduras diferentes, es decir, algunos precursores con secuencias distintas contienen toxinas maduras iguales, esto considerando como sitio de proteólisis consenso una secuencia de aminoácidos básicos muy cercana a la primera cisteína, que frecuentemente incluye arginina y/o lisina. Las toxinas maduras predichas varían entre 26 y 32 residuos de longitud (Figura 15).

El alineamiento de las 17 secuencias obtenidas, junto a las 288 recopiladas en línea, produjo un total de 305 secuencias. Al alinearlas entre sí, la identidad entre secuencias varió entre 3 y 98%.

El cladograma construido a partir del análisis del alineamiento reveló la pertenencia de las secuencias obtenidas a las distintas divisiones de la superfamilia-O y generó indicios del parecido de las secuencias obtenidas con las O-conotoxinas reportadas (Figura 16).

Br7.7 M-KLTCVLIVAMFLITVQCQLITPDDSRDKQEYPAERWRTKMQNSKRITSTRK--CKGPLVFCLEN-HECCS-KFCDF-SDIPLRYCSTP 83
 Br7.8 M-KLTCVLIVAMFLITVQCQLIAPDDSRDKQEYPAERWRTKMQNSKRITSTRK--CKGPLVFCLEN-HECCS-KFCDF-SDIPLRYCSTP 83
 Br7.9 M-KLTCVLIVAMFLITVQCQPIPPDDSRDKQEYPAERWRTKMQNSKRITSTRK--CKGPLVFCLEN-HECCS-KFCDF-SDIPLRYCSTP 83
 Br7.16 M-KLTCVLIVAMFLITVQCRLITPDDSRDKQEYPAERWRTKMQNSKRITSTRK--CKGPLVFCLEN-HECCS-KFCDF-SDIPLRYCFTP 83
 Br7.10 M-KLTCVLIVAMFLITVQCQLITADDSRDQKQEYPAERWRTKMQNSKRITSTRK--CKGPLVFCLEN-HECCS-KFCDF-IDIPLRYCSTP 83
 Br7.11 M-KLMCVLIVAMFLITVQCQLITADDSRDQKQEYPAERWRTKMQNSKRITSTRK--CKGPLVFCLEN-HECCS-KFCDF-IDIPLRYCSTP 83
 Br7.12 M-KLTCVLIVAMFLITVQCQLITADDSRDQKQEYPAERWRTKMQNSKRITSTRK--CKGPLVFCLEN-HECCS-KFCDF-IDIPLRHCSTP 83
 Br7.17 M-KLTC-MIVAVLFLITAMIFVTADDSANGYENLPQTTRHEMKNPEASKLNKRRIICIPDYKFCFAHRDPCCS-GNCLY-----IRVP-78
 Br7.15 M-KLTCMMIVAVLFLITAMIFVTADDSANGLNLPQTIIRHEMKNPEASKLNKRDC-LPDIYMLCAFNMGLCCS-DKCM-----VCLP-78
 Br7.13 M-KLTCVLIVALLFLITACQLITADYSRDDYRAVMGLGRNSKDRDQESGQ-CTGSPPCPGL--SCSG-THAG-----TCVG-76
 Br7.14 M-KLTCVLIVALLFLITACQLITADYSRDDYRAVMGLGRNSKDRDQESGQ-CTGSPPCPGL--SCSG-THAG-----MCVG-76
 Br7.2 MEKLTILLVVTVLVSQTQAMIQGDIEKRRKAKINIFSKRKTAAER--WWDGE--CRSWSNKCEWP--WHCCS-NDCE-----YCTLW 76
 Br7.6 MEKLTILLVVTVLVSQTQAMIQGDIEKRRKAKINIFSKRKTAAER--WWDGE--CRSWSNKCEWP--WHCCS-NDCE-----YCTLW 76
 Br7.1 MEKLTILLVVTVLVSQTQAMIQGDIEKRRKAKINIFSKRKTAAER--WWDGE--CRSWSNKCEWP--WHCCS-NDCE-----YCTLW 76
 Br7.4 MEKLTILLVVTVLVSQTQAMIQGDIEKRRKAKINIFSKRKTAAER--WWDGE--CRSWSNKCEWP--WHCCS-NDCE-----YCTLW 76
 Br7.3 MEKLTILLVVTVLVSQTQAMIQGDMEKRRKAKINIFSKRKTAAER--WWDGE--CRSWSNKCEWP--WHCCS-NDCE-----YCTLW 76
 Br7.5 M-KLTIILLVAAVLMSTQALIQGGRENPOKAKMNFLLKARRLPGSR--QIAEK--CGGWI--CEDT-WDCCYAECKDG-----YCVEI 75

Figura 14. Alineamiento de los precursores obtenidos. Se muestran las secuencias completas de los marcos de lectura, el péptido señal predicho en rojo, la secuencia pro predicha en azul y la toxina madura en negro. Se muestra también la extensión de cada precursor.

Br7.15 -----DCLPDYMLCAFNMGLCCSD-KC-----MLVC-LP 27
 Br7.17 -----IICIPDYKFCFAHRDPCCS-G-NC-----LYIRV-P 28
 Br7.7,8 y 9 -----CKGPLVFC-LENHECCSK-FCDFSDIPLRYCSTP 32
 Br7.16 -----CKGPLVFC-LENHECCSK-FCDFSDIPLRYCFTP 32
 Br7.10 -----CKGPLVFC-LENHECCSK-FCDFIDIPLRYCSTP 32
 Br7.11 -----CKGPLVFC-P-LENHECCSK-FCDFIDIPLRYCSTP 32
 Br7.12 -----CKGPLVLC-LENHECCSK-FCDFIDIPLRHCSTP 32
 Br7.13 -----DCQESGGC-TGSPPCPGLSCSGTHAGG-TCVG- 32
 Br7.14 -----DCQESGGC-TGSPPCPGLSCSGTHAGG-MCVG- 32
 Br7.1,2,3,4 y 6 --WWDGECRSWSNKC-EWPWHCCSN-DCED-----YCTLW 31
 Br7.5 -----CGGW--IC-EDTWDCCYAECKDG-----YCVEI 26

Figura 15. Alineamiento de las toxinas maduras predichas de los precursores. Se muestran las secuencias de 11 toxinas maduras alineadas mediante ClustalW y su número de residuos. Se resaltan en rojo los residuos que difieren en secuencias similares.

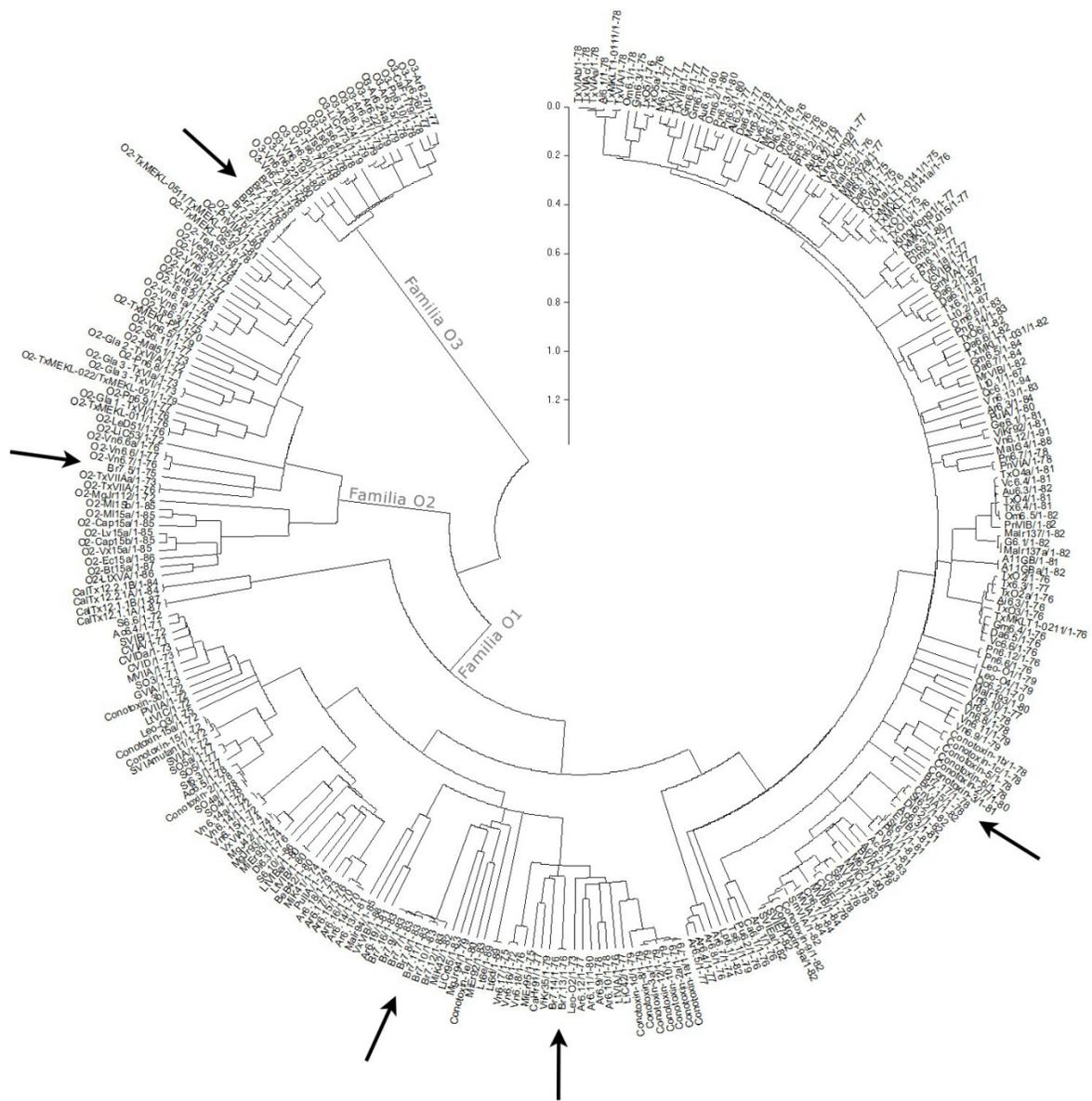


Figura 16. Cladograma consenso de las secuencias de precursores de O-conotoxinas. Se muestran las 305 secuencias de precursores conocidos y su número de residuos. Las flechas señalan la ubicación de los precursores obtenidos. La escala muestra la distancia del modelo de sustitución JTT normalizado a 1 (Jones y col., 1992).

VII. DISCUSIÓN.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas mediante clonación son usadas frecuentemente en la investigación para conocer las proteínas que una célula puede expresar. La utilización de esta estrategia para identificar conotoxinas se emplea desde los años 90 y es una herramienta importante para ayudar en la búsqueda de los efectos farmacológicos de cada conotoxina. Existen trabajos en los que se usó la clonación de ADNc y su secuenciación para conocer la composición de las conotoxinas, posteriormente se expresaron heterológamente y después se caracterizaron en ensayos electrofisiológicos (Becker y Terlau, 2008).

Un ejemplo del uso de esa estrategia son las conotoxinas It7a y It6c de *Conus litteratus*, las cuales fueron identificadas en bibliotecas de ADNc y luego expresadas en *Escherichia coli* como proteínas de fusión con tioredoxina y caracterizadas por la técnica de fijación de membrana o “whole cell patch clamp” en células de ganglio dorsal de rata. Los péptidos se expresan junto a la tioredoxina porque esta enzima cataliza la reacción de oxidación de residuos de cisteína en puentes disulfuro (Pi y col., 2007; Wang y col., 2008).

Otro ejemplo es el de la conotoxina MVIIA de *Conus magus*, que también se ha expresado en *Escherichia coli* como proteína de fusión con tioredoxina o con glutatión S-transferasa (Zhan y col., 2003; Becker y Terlau 2008).

Conocer la secuencia de los precursores completos es importante no solo para dilucidar su función, sino también para saber el proceso mediante el cual se producen en la célula. Por ejemplo, si existe ajuste alternativo en la producción de los mismos. Además, la conservación de toxinas entre especies o nichos provee de una herramienta para clasificar las conotoxinas con mayor eficiencia.

Existen desventajas en el uso de la clonación de ADNc y su expresión heteróloga, ya que las conotoxinas son bien conocidas por sus modificaciones

postraduccionales; la expresión en otros organismos no asegura que estas modificaciones se lleven a cabo.

En la obtención de los precursores con clonación de ADNc, la purificación y calidad del ARN que se utiliza es de vital importancia. Al purificar el ARN del conducto venenoso se enfatizó la conservación de un ambiente libre de nucleasas.

Los parámetros de calidad obtenidos en la purificación de ARN fueron satisfactorios. Sin embargo, al correr las muestras de ARN en una electroforesis nativa en agarosa, se encontró una gran banda en el ARN en vez de las 2 bandas mayores de ARN ribosomal (ARNr) que los mamíferos poseen. Las 2 bandas de ARN, que en eucariotas corresponden al ARN de las subunidades ribosomales mayores, 28S y 18S, son comparables en procariotas al ARN de las subunidades 23S y 16S. Las bandas de ARNr que se obtienen al extraer ARN de mamíferos y procariotas varían entre 1.7 y 1.9 kb para la subunidad 18S, y de 4.6 a 5.2 kb para la subunidad 28S. Es por eso que normalmente se usan en la electroforesis en gel para asegurar la calidad del RNA; la banda 28S con una intensidad del doble a la 18s corresponde al doble de largo del RNA y una conservación en la integridad de los mismos (Farrell, 2010).

En los organismos eucariotas del clado protostoma, que comprende a la mayoría de los filos animales, pero no a los cordados ni algunas especies marinas, el ARNr 28S está segmentado, es decir, durante el proceso de maduración de la subunidad 28S, se forma una horquilla o "hairpin loop" en el ARNr caracterizado por contener alta proporción de timinas y uracilo, además de la secuencia específica UAAU. Posteriormente, el ARNr de la subunidad es cortado en 2 fragmentos de longitud similar, siendo la longitud de los mismos equiparable a la del ARNr de la subunidad 18S. Los fragmentos de ARN 28S quedan asociados mediante los puentes de hidrogeno que formaron la horquilla pero no están unidos covalentemente (Fujiwara e Ishikawa, 1986; Ogino y col., 1990).

Este proceso de corte del ARNr que forma la subunidad 28S se lleva a cabo principalmente en los protostomados, que incluyen a los insectos y a los moluscos (Cammarano y col., 1980), aunque existen excepciones como el caso de deuterostomados del género *Ctenomys*, roedores en los que la presencia del corte es diferenciada entre órganos (Melen y col., 1999).

Esta evidencia justifica los resultados obtenidos en la electroforesis de ARN, ya que los fragmentos provenientes del corte del ARNr 28S tienen longitud similar al ARNr 18S, haciéndolos indistinguibles en una electroforesis de agarosa. La banda superior más tenue que aparece en la Figura 10 puede corresponder a las especies de ARN cuyos puentes de hidrogeno no fueron disociados.

El ADNc obtenido mediante la retrotranscripción y su amplificación mediante RCP-LD provee la posibilidad de amplificar mensajeros de escasa ocurrencia para su estudio. Los resultados de este tipo de estrategia dependen del origen del ARN obtenido; así pues, en el ADNc del conducto venenoso de *Conus brunneus*, donde se producen las conotoxinas, deben estar expresados los precursores de conotoxinas y su abundancia debe ser suficiente para amplificarse en una RCP.

Los resultados de la RCP-LD visualizados mediante electroforesis en gel mostraron que se amplificaron mensajeros con longitudes por encima de las 2 kb; este barrido (Figura 11) es el tipo de barrido y bandas de mayor abundancia considerados confiables en la síntesis de ADNc (Chenchink y col., 1996; Brambrink y col., 2002).

La desaparición del barrido más allá de las 2 kb no significa que los mensajeros más largos no hayan sido amplificados, sino que pueden ser poco abundantes. Más aun, los precursores de O conotoxinas más largos conocidos, Da6.1, Da6.2 y Tx6.1, todos de 97 residuos, no exceden en su MAL una kilobase, por lo que la calidad del ADNc usado no parece haber sido un obstáculo en la obtención de resultados.

El amplificar con la estrategia clásica de AREA 3' y 5', haciendo uso de adaptadores en los extremos del ADNc y cebadores específicos, garantiza la obtención de la mayoría de resultados. Esto se debe a que la amplificación no está restringida en uno de sus extremos por uno de los cebadores, en especial cuando se usan cebadores provenientes de secuencias consenso. Las distintas bandas obtenidas mostraron que los precursores de O-conotoxinas en *C. brunneus* provienen de genes pequeños.

Al revisar los fragmentos de ADN producidos en las RCPs, se obtuvieron con éxito solo precursores de las familias O1 y O2, no así con los cebadores diseñados para la familia O3.

VII.1. La Familia O1.

Para la familia O1, no solo se realizó AREA 5' y 3' sino también la amplificación de las secuencias con los cebadores o "primers" específicos; en esta última se lograron amplificar 2 secuencias diferentes que no se obtuvieron con la estrategia de los adaptadores. Los diferentes productos de la RCP de la familia O1 generaron la mayor variedad de secuencias.

Los precursores Br7.7, 7.8 y 7.9 contienen la misma toxina madura, los precursores Br7.10 a 7.12 y Br7.16 generarían por su lado, una conotoxina madura muy parecida a Br7.7, todas de 32 residuos de extensión. La incidencia de la sustitución del aminoácido en la posición 22, alanina por prolina, y 73, isoleucina por serina, en los mismos precursores podría corresponder a la existencia de un alelo distinto del gen en el organismo.

La ocurrencia de varios péptidos que difieren en un solo residuo puede ser fruto de errores durante la clonación o secuenciación, de la expresión de varios genes en el mismo organismo o de distintos alelos, de un proceso de ajuste o "splicing" o de la edición del ARN. Esta última posibilidad, que implicaría la modificación de una base

nitrogenada en el ARNm y el consiguiente cambio en los péptidos, permanece sin comprenderse en su totalidad. Recientemente, se comprobó que el fenómeno de edición del ARN ocurre en la expresión de péptidos venenosos y no solo en proteínas del sistema nervioso como se pensaba (Keegan y col., 2001). La edición del ARN en la proteína BmLVP1 encontrada en escorpiones, que modula la formación de 3 o más enlaces disulfuro y favorece distintas funciones de la proteína (Zhu y Gao, 2006), sugiere la pregunta de si este proceso puede llevarse a cabo en los gasterópodos del género *Conus*.

El grupo de precursores Br7.13 y 7.14 contiene una toxina madura de 32 residuos de longitud, los precursores son idénticos, sin embargo, existe una sustitución en el residuo 73, treonina por metionina, lo que generaría 2 toxinas maduras muy similares.

De todas las modificaciones postraduccionales conocidas, se considera que las que son llevadas a cabo por una sola enzima son las más fáciles de predecir, entre estas, solo la proteólisis del precursor, la formación del puente disulfuro y la amidación del extremo carboxilo terminal son suficientemente consistentes para predecir su aparición (Buczek y col., 2005). De acuerdo a este trabajo y a la predicción realizada en el Conoserver, los precursores Br7.13 y 7.14 pueden ser blancos de la amidación del extremo carboxilo, ya que cuentan con una glicina en este extremo. Esta modificación está ampliamente distribuida en el género *Conus* y se conocen muy pocas excepciones de ésta (Buczek y col., 2005).

Br7.15 y 7.17 tienen gran similitud en sus péptidos señal y propéptido, ambos cuentan con 78 residuos, pero a partir del sitio de proteólisis, divergen en gran medida. El precursor Br7.17 a diferencia de todos los demás, no tiene las 6 cisteínas que formarían 3 puentes disulfuro, sino 5. Anteriormente, se han reportado conotoxinas formadoras de dímeros que tienen solo 5 cisteínas (Ueberheide y col., 2009); la formación de dímeros ocurre en los venenos de otros

depredadores (Zhu y Gao, 2006) y puede significar un proceso evolutivo de diversificación en las funciones de una familia de péptidos.

VII.2. La Familia O2.

Para la familia O2 de conotoxinas, se lograron obtener 14 secuencias, en las que predomina el precursor Br7.1 con 9 repeticiones; se obtuvieron 4 secuencias más con una sola sustitución de aminoácidos respecto a Br7.1 y entre sí. Más allá de las variaciones en los precursores, en la familia O2 solo se encontraron 2 secuencias de toxinas maduras si tomamos en cuenta la predicción de la proteólisis como acertada. La longitud de la toxina madura de Br7.1 a 7.4 y Br7.6 es de 26 residuos, mientras que la toxina madura de Br7.5 suma 31 residuos.

VII.3. La Familia O3.

Las secuencias de los cebadores SFO3F1 y SFO3F2 corresponden a regiones conservadas encontradas en todos los precursores encontrados de O3 conotoxinas. La falta de resultados obtenidos en este respecto, puede deberse a la escasa ocurrencia de esta familia de conotoxinas dentro del género, que aún no ha sido explicada.

La familia de conotoxinas O3 es poco conocida; solo se conocen 20 precursores que pertenecen a 6 especies sin relación aparente: *C. arenatus*, *C. characteristicus*, *C. lividus*, *C. pennaceus*, *C. tessulatus* y *C. ventricosus*. (Conticello y col., 2001; Zhangsun y col., 2006). De estas especies, *C. ventricosus* pertenece al mar Mediterráneo; *C. arenatus*, *C. characteristicus*, *C. lividus* y *C. pennaceus* se encuentran únicamente en el océano Indo-Pacífico (Abbot y Dance, 2000); por último, *C. tessulatus* se encuentra comúnmente en el océano Índico pero también se ha reportado en costas americanas de México hasta Panamá (Skoglund, 2002).

La alimentación de estas especies es variada. *C. pennaceus* es molusquívoro; *C. tessulatus*, *C. arenatus* y *C. lividus* son vermívoros (Duda y col., 2001); *C. characteristicus* es vermívoro y *C. ventricosus* es piscívoro (Zhangsun y col., 2006). Aunado a ello, otros grupos de investigación lograron obtener 2 de los 20 precursores conocidos de la familia O3 en *C. lividus* y *C. characteristicus*, pero no los encontraron en *C. betulinus*, al usar la misma metodología, confirmando la rareza de la existencia de esta familia de precursores (Zhangsun y col., 2006).

VII.4. Análisis comparativo.

El cladograma (Figura 16) que ilustra los resultados refleja la similitud de los precursores obtenidos en comparación con otros miembros de la superfamilia O de conotoxinas. Esta representación gráfica de los precursores completos de conotoxinas no solo ayuda a clasificarlos sino a compararlos y a descifrar el papel que juega cada toxina en el envenenamiento de las presas.

Para medir las sustituciones múltiples que ocurren dentro de las secuencias al compararlas, se mide el parámetro de distancia. La distancia, definida como el grado de sustituciones de aminoácidos por sitio en una secuencia, es una medida de la diferencia entre secuencias y el resultado del modelo de sustitución JTT. Éste modelo mide el grado de sustitución, existente en una posición determinada del alineamiento, de una secuencia respecto a todas las secuencias analizadas y genera valores de distancia en cada posición del alineamiento para cada secuencia; Todo este proceso se basa en una matriz de mutaciones puntuales antes establecida (Jones y col., 1992).

Las 305 secuencias de la superfamilia O se dividen claramente en 3 grandes grupos. Esta división se evidencia en el cladograma pues las 3 ramas de secuencias divergen en más de una unidad en la escala de distancias. Esto se traduce en que cada posición del alineamiento contiene aminoácidos parecidos solo entre estos grupos. Si comparáramos en cada posición del alineamiento a dos

elementos de distintos grupos o familias, encontraríamos siempre una distancia de sustitución mayor a 1, es decir, el grado mínimo de parecido obtenido.

El cladograma obtenido no tiene raíz por no contener ningún grupo exterior o “outgroup” ni estar construido en base a distancias evolutivas. La representación en circunferencia y la normalización de las distancias se efectuaron para facilitar su visualización.

Cabe mencionar que la gran variabilidad de las toxinas maduras y la posible modificación de sus aminoácidos al expresarse impide construir cladogramas confiables de las mismas.

Los precursores de *Conus brunneus* se ubicaron en las familias O1 y O2 de acuerdo a la comparación previa de los arreglos de cisteína VI/VII, que contienen 6 cisteínas y también respecto a los péptidos señal que contienen. Los precursores aquí descritos se distribuyeron en 5 grupos dentro del cladograma (Figura 16).

Para proponer los posibles efectos que tienen las toxinas reportadas, se hizo un estudio comparativo enfocándose en la actividad biológica de diferentes toxinas reportadas previamente.

Debido a la alta variabilidad en las secuencias de toxinas maduras y el problema de compararlas con métodos bioinformáticos, el cladograma fue auxiliar al comparar esas secuencias entre todos los precursores conocidos. Así pues, tenemos que las toxinas maduras caracterizadas más cercanas en el cladograma, con notación en letras mayúsculas, son las más parecidas a los precursores obtenidos.

Los precursores Br7.1, 7.2, 7.3, 7.4 y 7.6 se encuentran en un grupo dentro de la familia O2 que es notablemente distinto dentro de ésta, con una distancia cercana a las 0.4 sustituciones de residuo por sitio del alineamiento en relación al precursor más cercano, Lt7b de *Conus litteratus*. En lo que concierne a las toxinas maduras

de este grupo, Lt7b, Vn6.3, BeB54 y VeG52, obtenidas de distintas especies, guardan un gran parecido. Por desgracia, no se conocen aun los efectos farmacológicos de ninguna de ellas (Figura 17).

Br7.1	----WWDG--ECRSWSNKCEWPWHCCSNDCE--YE CT LW----	31
Br7.6	---- WWDG -- ECRSWSNKCEWPWHCCSNDCE --DY CT LW----	28/31
BeB54	---- W WEG-- E CKGWSVYCSWDWECCSGECTRY Y CELW----	18/32
Vn6.3	---- W WEG-- E CRGWSNGCTTNSDCCSNNCDGTFCKLW----	19/32
VeG52	---- WWDG -- E CR L WSNGCRKHKECCSNHCKGIYCDIW----	18/32
Lt7b	---- W WEG--DCTD W LGSCSSPSECCYDNCE--TY CT LWK---	14/32
PnVIIA	-----DCT S WFGRC T VNS Y CCS N SCDQTYC Y LYAFOS	12/32
RVIIA	----- W FGH Y YCTY W LGPC Y VDDTCCSASC Y SKFCGL W ----	14/33

Figura 17. Alineamiento de la toxina madura de Br7.1 con distintas toxinas antes reportadas. El alineamiento se realizó en ClustalW. Se muestra el número de identidades respecto a Br7.1 y el número de residuos de las toxinas comparadas. Las identidades respecto a Br7.1 se remarcan en rojo. y corresponde al aminoácido modificado γ -carboxiglutamato, O corresponde a la hidroxiprolina y W a bromotriptófano de acuerdo a la nomenclatura estándar.

PnVIIA y RVIIA son las conotoxinas, cuyas actividades biológicas han sido descritas, más parecidas a este grupo de precursores obtenido. RVIIA es una conotoxina altamente modificada después de su traducción. Al ser inyectada intracranealmente en ratones de 14 días, 1 nmol de péptido produjo sueño ligero por periodos de hasta 2 horas. En un alineamiento con los precursores de este grupo, puede determinarse que la conotoxina RVIIA comparte hasta 3 posiciones de residuos triptófano y 3 posiciones de glutamato que son modificados al ser expresada. Los triptófanos se broman y los glutamatos se γ -carboxilan (Jimenez y col., 2004).

PnVIIA desencadena la despolarización y el disparo del potencial de acción en neuronas caudodorsales de caracol marino *Lymnaea*. Este efecto se describió como la potenciación de una corriente lenta entrante de cationes. Por esta razón, es posible que se trate de una corriente marcapaso (Fainzilber y col., 1998).

Por otro lado, la toxina madura de Br7.5 es similar a conotoxinas producidas por *Conus vexillum* y en especial a la conotoxina TxVIIA, anteriormente conocida como TxIIA, la cual ha sido estudiada a fondo (Figura 18).

```

Br7.5          -----CGGWI--CEDTWDCCYAAECKDGYCVEI-      28
Vn6.2         KSIPESWWEGECSGWSVHCTQHSDCCSG-ECTGSYCELY- 11/27
TxVIIA        -----CGGYSTYCYVDSYCCSDN-CVRSYCTLFG 10/28
  
```

Figura 18. Alineamiento de la toxina madura de Br7.5 con distintas toxinas antes reportadas. El alineamiento se realizó en ClustalW. Se muestra el número de identidades respecto a Br7.5 y el número de residuos de las toxinas comparadas. Las identidades respecto a Br7.5 se remarcan en rojo, y corresponde al aminoácido modificado γ -carboxiglutamato.

TxVIIA es una O-conotoxina de *Conus textile* que al expresarse sufre la γ -carboxilación de sus glutamatos y la amidación de su extremo carboxilo. TxVIIA tuvo actividad biológica al inyectarse en la lapa *Patella caerulea in vivo*. La concentración paralizante media obtenida fue de 8.6 pmol/100 mg de peso corporal. Además, la actividad reportada de esta toxina sobre neuronas de ganglio pedal del gasterópodo *Aplysia oculifera* incluyó despolarización y el disparo repetitivo parcial de la despolarización (Fainzilber y col., 1991).

Cabe mencionar que al ser alineados, se observa que TxVIIA y Br7.5 comparten un glutamato en la posición adyacente a la segunda cisteína, que en el caso de la toxina TxVIIA es procesado al aminoácido γ -carboxiglutamato.

Los demás precursores, Br7.7 a 7.16, se distribuyeron a lo largo de toda la familia O1 de conotoxinas y formaron 4 grupos de precursores muy parecidos. Es notable la división que presenta la familia O1 al distribuirse en 3 subgrupos, 1 muy aislado que corresponde a O-conotoxinas con 8 cisteínas, que provienen del caracol *Conus californicus*. Las otras 2 ramas del cladograma difieren hasta en poco más de 0.6 sustituciones de residuo por sitio del alineamiento, que se debe al parecer a la longitud de los precursores.

El primer grupo de conotoxinas O1, Br7.7 a 7.12 y Br7.16, son parecidas a los precursores LiCr95 y MgJr94 MiK42 de otros conos, pero no se han elucidado sus efectos biológicos ni hay sospechas acerca de su modo de acción (Figura 19).

```

Br7.7          -----CKGPLVFCL-ENHECCSKFCDFSDIPLRYCSTP      32
Br7.10        -----CKGPLVFCL-ENHECCSKFCDFIDIPLRYCSTP  31/32
LiCr95        NPKLSKLTKTCDPFGDSCSRWYNHCCSKLCT-SRNSGPTCSR  12/42
MgJr94        -----CKGKGAGCD-YSHECCSRQC--TGRIFQTCN--  11/28
MiK42         -----CDAPNAPCEKFDNDCC-DACMLREKQQPICA  7/31

```

Figura 19. Alineamiento de la toxina madura de Br7.7 con distintas toxinas antes reportadas. El alineamiento se realizó en ClustalW. Se muestra el número de identidades respecto a Br7.7 y el número de residuos de las toxinas comparadas. Las identidades respecto a Br7.7 se remarcan en rojo.

Los probables productos de Br7.13 y 7.14 son similares a distintas conotoxinas. De las siguientes secuencias, únicamente VxVIA y VxVIB han sido parcialmente caracterizadas en ensayos electrofisiológicos (Figura 20).

```

Br7.13        DCQESGQGCTGSP-PCCPGLSCSGTHAGGTCVG-----      32
Br7.14        DCQESGQGCTGSP-PCCPGLSCSGTHAGG-CVG-----  31/31
LiC42         SCGHSGAGCY-TR-PCCPGLHCSGGHAGGLCV-----  20/30
ViKr35P       ECRRRGQGCTQST-PCCDGLRCDGQRQGGMCVDS----  18/33
VxVIA         -CNNRGGGCSQHP-HCCSG-TCN--KTFGVCL-----  11/27
VxVIB         -CTDDSQFCDPNDHDCCSG-ECIDEGGRGVCAIVPEHV  9/36

```

Figura 20. Alineamiento de la toxina madura de Br7.13 con distintas toxinas antes reportadas. El alineamiento se realizó en ClustalW. Se muestra el número de identidades respecto a Br7.13 y el número de residuos de las toxinas comparadas. Las identidades respecto a Br7.13 se remarcan en rojo.

VxVIA demostró poseer actividad biológica al administrarse intracranalmente en ratones Kunming de 4 semanas. La administración de 20 µg del péptido resultó en agazapamiento y estremecimiento, 40 µg en escalamiento, rascamiento y rodamiento y 100 µg paralizaron sus miembros por 40 minutos y produjeron estremecimiento por 30 minutos más. Al ser evaluados sus efectos electrofisiológicos utilizando la técnica de “whole cell patch clamp” en neuronas mediales desapareadas de la langosta *Locusta migratoria*, VxVIA no mostró tener efecto sobre las mismas a la concentración de 5 µM. La razón de usar estas

neuronas fue la existencia de corrientes de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ nativas. VxVIB se evaluó igualmente sobre neuronas del ganglio de la raíz dorsal de ratones utilizando “whole cell patch clamp”. Ningún efecto obvio fue observado sobre las corrientes entrantes ni salientes a la concentración de 1 μM (Jiang y col., 2006).

Por último, Br7.15 y 7.17 se alinearon con 5 conotoxinas, de las cuales, solo SVIE, PnVIA y PnVIB han sido purificadas y caracterizadas (Figura 21).

Br7.15	--DCLPDYMLCAF---NM-GLCCSDKCMLVCLP---	27
Br7.17	-IIICIPDYKFC ^{CAF} HR----DPCCSGNCLYIRV ^P ---	12/28
PnVIA	--G ^C LEV ^D YFC ^G IPFANN-GLCCSGN ^C VFV ^C TPQ-	13/31
Conotoxin-3imp	--G ^C LP ^D EYFC ^G FSMIGA-LLCCSGW ^C LGIC ^M T---	11/30
SVIE	-DG ^C SSGGTFC ^G IH ^O ----GLCCSEFC ^F LWCIT ^F ID	11/31
PnVIB	DD ^D CE ^P PGNFC ^G MIKIG--PPCCSGW ^C FFA ^{CA} ----	9/30
S11.3	---CV ^P PSRY ^C TRHRPCCR ^G TCCSGL ^C RP ^M CNLWY-	9/32

Figura 21. Alineamiento de la toxina madura de Br7.15 con distintas toxinas antes reportadas. El alineamiento se realizó en ClustalW. Se muestra el número de identidades respecto a Br7.15 y el número de residuos de las toxinas comparadas. Las identidades respecto a Br7.15 se remarcan en rojo. O corresponde al aminoácido modificado hidroxiprolina de acuerdo a la nomenclatura estándar.

PnVIA y PnVIB son capaces de bloquear la corriente transitoria de calcio activada por alto voltaje, insensible a dihidropiridinas, en células caudodorsales del caracol marino *Lymnea stagnalis*. Además de esto, PnVIA es capaz de reducir una corriente, simultánea al estímulo, que es sensible a dihidropiridinas. Estos estudios se llevaron a cabo mediante “whole cell patch clamp” (Kits y col., 1996).

SVIE es un modulador de la activación de canales de sodio Nav1.4. Utilizando la técnica de “whole cell patch clamp” se determinó que esta conotoxina impide la inactivación rápida del canal cuando éste se expresó en células HEK293 de riñón embrionario (Leipold y col., 2005).

La similitud de las secuencias de conotoxinas determinadas en este trabajo con las caracterizadas de otras especies es limitada, llegando solo a rebasar el 50% de

identidad en cuanto a los residuos que contienen. Los precursores encontrados no son significativamente idénticos a conotoxinas con actividad biológica caracterizada, como para asegurar la función de los precursores de *Conus brunneus*.

Por otro lado, las modificaciones postraduccionales predichas incluyen la amidación del extremo carboxilo en los precursores Br7.13 y 7.14, la posible γ -carboxilación de un residuo glutamato en el precursor Br7.5 y una combinación de hasta 3 bromaciones de triptófanos y 3 γ -carboxilaciones de glutamatos en los precursores Br7.1, 7.2, 7.3, 7.4 y 7.6.

Este análisis sin embargo, permite orientar la futura búsqueda de actividad biológica, además de ubicar la localización de posibles modificaciones postraduccionales en las toxinas de *C. brunneus*.

VIII. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar ADNc a partir de ARN extraído de un conducto venenoso de *C. brunneus* con la calidad necesaria para contener los precursores de O-conotoxinas.

Se amplificaron exitosamente 4 productos de las RCPs de las familias O1 y O2 del ADNc obtenido utilizando distintos cebadores mediante la estrategia AREA.

Las bandas extraídas de las 4 RCPs se clonaron efectivamente y se extrajeron los plásmidos de las colonias transformadas que contenían los fragmentos de ADN objetivo.

Los 42 clones secuenciados satisfactoriamente codifican a 17 precursores distintos de la superfamilia O de conotoxinas. El producto probable de los 17 precursores, son 11 toxinas maduras sin reportar previamente.

De las 11 toxinas maduras obtenidas, 9 corresponden a la familia O1 y 2 a la familia O2 de conotoxinas.

De acuerdo al análisis bioinformático realizado, se predijeron las posibles modificaciones postraduccionales en 8 de los nuevos precursores y se construyeron perspectivas de los posibles blancos moleculares de las nuevas toxinas maduras, blancos que deberán ser confirmados en trabajos posteriores.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abbot, R.T., Dance, S.P. 2000. Compendium of Seashells. Cuarta edición. Odyssey Publications, El Cajon, EE.UU.: 272.

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

Bendtsen, J.D., Gunnar con Heijne, H.N., Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of Molecular Biology. Vol. 340:783-795.

Bowersox, S.S., Luther, R. 1998. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. Toxicon. Vol. 36:1651-1658.

Brambrink, T., Wabnitz, P., Halter, R., Klocke, R., Carnwath, J., Kues, W., Wrenzycki, C., Paul, D., Niemann, H. 2002. Application of cDNA arrays to monitor mRNA profiles in single preimplantation mouse embryos. Biotechniques. Vol. 33:376-385.

Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H., Marky, L.A. 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 83:3746-3750.

Buczek, O., Bulaj, G., Olivera, B.M. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 62:3067–3079.

Bulaj, G., Olivera, B.M. 2008. Folding of conotoxins: formation of the native disulfide bridges during chemical synthesis and biosynthesis of *Conus* peptides. Antioxidants & Redox Signaling. Vol. 10:141-156.

Cammarano, P., Londet, P., Mazzei, F. 1980. Physicochemical characterization of the ribosomal RNA species of the mollusca. Molecular weight, integrity and

secondary-structure features of the RNA of the large and small ribosomal subunits. *Biochemical Journal*. Vol. 189: 313-335.

Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S., Siebert, P.D. **1996**. Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques*. Vol. 21:526-534.

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M., Higuchi, R. **1994**. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 91:5695-5699.

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T., Higgins, D.G., Thompson, J.D. **2003**. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. Vol. 31:3497-3500.

Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M. **1976**. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 127:1550-1557.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, R.B. **1973**. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 70:3240-3244.

Conticello, S.G., Gilad, Y., Avidan, N., Ben-Asher, E., Levy, Z., Fainzilber, M. **2001**. Mechanisms for evolving hypervariability: The Case of Conopeptides. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 18:120–131.

Duda, T.F., Palumbi, S.R. **1999**. Molecular genetics of ecological diversification: Duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 96:6820–6823.

Duda, T.F., Kohn, A.J., Palumbi, S.R. **2001**. Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological Journal of the Linnean Society*. Vol. 73:391-409.

Fainzilber, M., Gordon, D., Hasson, A., Spiraz, M.E., Zlotkin, E. **1991**. Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *FEBS Journal*. Vol. 202:589-595.

Fainzilber, M., Nakamura, T., Lodder, J.C., Zlotkin, E., Kits, K.S., Burlingame, A.L. **1998**. γ -Conotoxin-PnVIIA, a γ -carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry*. Vol. 37:1470-1477.

Farrell, R.E. **2010**. *RNA Methodologies A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. Cuarta edición. Academic Press. EE.UU.:147.

Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. **1988**. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 85:8998-9002.

Fujiwara, H., Ishikawa, H. **1986**. Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. *Nucleic Acids Research*. Vol. 14:6393-6401.

Gray, W.R., Luque, A., Olivera, B.M., Barrett, J., Cruz, L. **1981**. Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 256:4734-4740.

Halai, R., Craik, D.J. **2009**. Conotoxins: natural product drug leads. *Natural Product Reports*. Vol. 26:526-536.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. **1990**. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. Vol. 96: 23-28.

Jiang, H., Xu, C., Wang, C., Fan, C., Zhao, T., Chen, J., Chi, C. **2006**. Two novel O-superfamily conotoxins from *Conus vexillum*. *Toxicon*. Vol 47:425–436.

Jimenez, E.C., Watkins, M., Olivera, B.M. **2004**. Multiple 6-Bromotryptophan residues in a sleep-inducing peptide. *Biochemistry*. Vol. 43:12343-12348.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. **1992**. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* Vol. 8:275-282.

Kaas, Q., Westermann, J.C., Halai, R., Wang, C.K., Craik, D.J. **2008**. ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics*. Vol. 24:445-446. www.conoserver.org.

Kaas, Q., Westermann, J.C., Craik, D.J. **2010**. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using Conoserver. *Toxicon*. Vol. 55:1491-1509.

Keegan, L.P., Gallo, A., O'Connell, M.A. **2001**. The many roles of an RNA editor. *Nature Reviews Genetics*. Vol. 2: 869-878.

Kits, K.S., Lodder, J.C., Van der Schors, R.C., Li, K.W., Geraerts, W.P.M., Fainzilber, M. **1996**. Novel w-conotoxins block dihydropyridine-insensitive high voltage-activated calcium channels in molluscan neurons. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 67:2155-2163.

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

Leipold, E., Hansel, A., Olivera, B.M., Terlau, H., Heinemann, S.H. **2005**. Molecular interaction of δ -conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Letters*. Vol. 579: 3881–3884.

Linnaeus, C. **1758**. *Systema Naturae*. Décima edición. Estocolmo:713.

Livett, B.G., Sandall, D.W., Keays, D., Down, J., Gayler, K.R., Satkunanathan, N., Khalil, Z. **2006**. Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon*. Vol. 48:810-829.

Lodish, H.F., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., Darnell, J. **2003**. *Molecular Cell Biology*. Quinta edición. W.H. Freeman & Co, Nueva York, EE.UE.:108-131.

Marshall, J., Kelley, W.P., Rubakhin, S.S., Bingham, J.P., Sweedler, J.V., Gilly, W.F. **2002**. Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. *The Biological Bulletin*. Vol. 203:27–41.

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

Melen, G.J., Pesce, C.G., Rossi, M.S., Kornblihtt, A.R. **1999**. Novel processing in a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: tissue-specific elimination of an 'intron' bearing a hidden break site. *The EMBO Journal*. Vol.18:3107–3118.

Milne, T.J., Abbenante, G., Tyndall, J.D.A., Halliday, J., Lewis, R.J. **2003**. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the Pathogenesis-related Protein Superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278:31105–31110.

Milne T.J. **2008**. Purification and characterization of Tex31, a conotoxin precursor processing protease, isolated from the venom duct of *Conus textile*. Brisbane, Australia. School of life sciences, Queensland University of Technology. Tesis para obtener el título de doctorado en filosofía. Capítulos 2 y 3.

Norton, R.S., Olivera, B.M. **2006**. Conotoxins down under. *Toxicon*. Vol. 48:780–798.

Ogino, K., Eda-Fujiwara, H., Fujiwara, H., Ishikawa, H. **1990.** What causes the aphid 28S rRNA to lack the hidden break? *Journal of Molecular Evolution.* Vol. 30:509-513.

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., Cruz, L.J. **1990.** Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science.* Vol. 249:257-263.

Olivera, B.M. 1997. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell.* Vol. 8:2101-2109.

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

Olivera, B.M. 2006. *Conus* Peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 281: 31173–31177.

Paganelli, G. 1998. <http://www.coneshell.net/>.

Pellicer, J. 2006. Isolation and Characterization of novel conopeptides from *Conus brunneus*. Boca Raton, Florida. Faculty of the Charles E. Schmidt College of Science Florida Atlantic University. Tesis para obtener el titulo de “Master of Science”. Páginas 14 y 47.

Pi, C., Liu, J., Wang, L., Jiang, X., Liu, Y., Peng, C., Chen, S., Xu, A. **2007.** Soluble expression, purification and functional identification of a disulfide-rich conotoxin derived from *Conus litteratus*. *Journal of Biotechnology.* Vol. 128:184–193.

Ross, J., Aviv, H., Scolnick, E., Leder, P. **1972.** *In vitro* synthesis of DNA complementary to purified rabbit globin mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 69:264-268.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim N. **1985**. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. Vol. 230:1350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. **1987**. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. Vol. 239:487-491.

Saitou, N., Nei, M. **1987**. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 4:406-425.

Sambrook, J., Russell, D.W. **2001**. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York: 141.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. **1977**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 74:5463-5467.

Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L.Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D.J., Madden, T.L., Maglott, D.R., Miller, V., Mizrahi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Sequeira, E., Sherry, S.T., Shumway, M., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Wagner, L., Yaschenko, E., Ye, J. **2009**. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. Vol. 37:D5-D15. www.ncbi.nlm.nih.gov.

Schulz, J.R., Norton, A.G., Gilly, W.F. **2004**. The projectile tooth of a fish-hunting cone snail: *Conus catus* injects venom into fish prey using a high-speed ballistic mechanism. *Biological Bulletin*. Vol. 207: 77–79.

Sharpe, I.A., Gehrmann, J., Loughnan, M.L., Thomas, L., Adams, D.A., Atkins, A., Palant, E., Craik, D.J., Adams, D.J., Alewood, P.F., Lewis, R.J. **2001**. Two new

classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neuroscience*. Vol. 4:902-907.

Skoglund, C. 2002. Panamic province molluscan literature: Additions and changes from 1971 through 2001. *The Festivus*. III Gastropoda:164.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 24:1596-1599.

Tatusov, T., Tatusov, R. 2010. ORF finder (open reading frame finder). www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html

Ueberheide, B.M., Fenyó, D., Alewood, P.F., Chait, B.T. 2009. Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 106:6910–6915.

Wang, L., Pi, C., Liu, J., Chen, S., Peng, C., Sun, D., Shou, M., Xiang, H., Ren, Z., Xu, A. 2008. Identification and characterization of a novel O-superfamily conotoxin from *Conus litteratus*. *Journal of Peptide Science*. Vol. 14:1077–1083.

Wood, W. 1828. *Index testaceologicus, or, a catalogue of shells, British and foreign. Suplemento de la Segunda Edición.* Londres: 8, 65.

Woodward, S.R., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Hillyard, D.R. 1990. Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *The EMBO Journal*. Vol.9: 1015 – 1020.

Yuan, D.D., Han, Y.H., Wang, C.G., Chi, C.W. 2007. From the identification of gene organization of α conotoxins to the cloning of novel toxins. *Toxicon*. Vol. 49:1135–1149.

Zhan, J., Chen, X., Wang, C., Qiu, J., Ma, F., Wang, K., Zheng, S. 2003. A fusion protein of conotoxin MVIIA and thioredoxin expressed in *Escherichia coli* has

significant analgesic activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 311:495–500.

Zhangsun, D., Luo, S., Wu, Y., Zhu, X., Hu, Y., Xie, L. 2006. Novel o-superfamily conotoxins identified by cDNA cloning from three vermivorous *Conus* species. *Chemical Biology & Drug Design*. Vol. 68:256–265.

Zhu, S., Gao, B. 2006. Molecular characterization of a new scorpion venom lipolysis activating peptide: Evidence for disulfide bridge-mediated functional switch of peptides. *FEBS Letters*. Vol. 580:6825-6836.