

TESIS DEFENDIDA POR  
**Andrea Figueroa Montiel**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



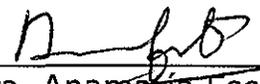
---

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro  
*Director del Comité*



---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas  
*Miembro del Comité*



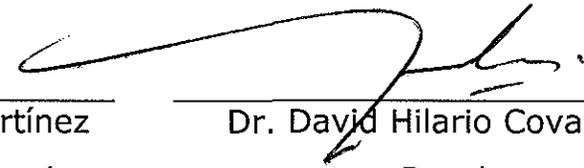
---

Dra. Anamaria Escofet Giansone  
*Miembro del Comité*



---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
*Coordinador del programa de  
posgrado en Ciencias de la Vida*



---

Dr. David Hilario Covarrubias  
Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

28 de Octubre del 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA**

---

**CARACTERIZACIÓN DEL VENENO DEL CARACOL MARINO *Conus regularis*:  
ESTUDIO DE SU TRANSCRIPTOMA**

**TESIS**

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

**ANDREA FIGUEROA MONTIEL**

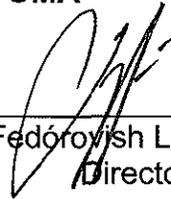
Ensenada, Baja California, México, Octubre del 2011.

---

**RESUMEN** de la tesis de **Andrea Figueroa Montiel**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Octubre del 2011.

**CARACTERIZACIÓN DEL VENENO DEL CARACOL MARINO *Conus regularis*:  
ESTUDIO DE SU TRANSCRIPTOMA**

Resumen aprobado por:

  
Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
Director de Tesis

Los caracoles marinos del género *Conus* se caracterizan por utilizar veneno para capturar a su presa, defenderse de depredadores y marcar su territorio ante competidores. El veneno presenta, dentro de otros componentes, péptidos pequeños y estables conocidos como conotoxinas. Se ha descubierto que estas conotoxinas tienen una gran importancia dentro de la industria farmacológica ya que se unen de forma específica a blancos moleculares cuya deficiencia se ha visto asociada a enfermedades que tienen gran relevancia dentro de la sociedad moderna. *Conus regularis* es una especie perteneciente a la región de Baja California y ha sido poco estudiada con respecto a su veneno y a su biología en general. El transcriptoma de este caracol es prácticamente desconocido, por lo que se ignora qué tipos de conotoxinas conforman su veneno, y si existe un posible potencial farmacológico en éste. En este trabajo se realizaron una serie de bibliotecas de ADN complementario de las toxinas presentes en el ducto venenoso de *Conus regularis*. Se extrajo el ARN de los ductos venenosos, el cual fue utilizado como templado en la síntesis de ADN de cadena sencilla para posteriormente amplificarlo como ADN de cadena doble. Cada secuencia de ADN fue ligada a un vector que fue insertado dentro de una bacteria. Se seleccionaron aquellas bacterias que presentaban vectores con insertos de ADN que pudieran corresponder al tamaño esperado para conotoxinas. La secuenciación de los insertos y posterior análisis permitió identificar una toxina completa de 37 aminoácidos, la cual presenta 8 residuos de cisteína y que no ha sido descrita anteriormente. El patrón de cisteínas que presenta (C-C-CC-C-C-C-C) es idéntico al de las toxinas que comprenden a la superfamilia conocida como V, no obstante la región del precursor no coincide con el de esta superfamilia sino con el de una toxina del cónido *C. rosearapum*. Además se encontró una secuencia de ARN mensajero que codifica para una conotoxina similar a las conotoxinas de la superfamilia T, presentes en el vermívoro *Conus litteratus*, lo cual sugiere que *Conus regularis* tiene una dieta vermívora.

**Palabras Clave:** *Conus regularis*, biblioteca de ADNc, vermívoro, superfamilias V y T.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Andrea Figueroa Montiel** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in LIFE SCIENCES with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México. October 2011.

**CHARACTERIZATION OF MARINE SNAIL *Conus regularis* VENOM: STUDY OF THE TRANSCRIPTOME**

Marine snails from the *Conus* genus characterize themselves because they use complex venoms to capture their prey, defend against predators and determine their territories to competitors. The venom has, among other components, small and stable peptides known as conotoxins. It has been found that these conotoxins are of great importance in the pharmaceutical industry because they bind specifically to their molecular targets whose deficiency has been associated with diseases that have great relevance in modern society. *Conus regularis* is a species that belongs to the Baja California region and has been hardly studied respectively to their venom and general biology. The transcriptome of this snail is barely known so it is unclear which types of conotoxins exist in their venom, and if there is a pharmacological potential in it. In the present study we constructed a series of complementary DNA libraries of the toxins that exist in the venom duct of *Conus regularis*. RNA was extracted from the venom ducts, and was used as a template in the synthesis of single-stranded DNA to subsequently amplify it, as double-stranded DNA. Each DNA sequence was linked to a vector and inserted in a bacterium. We selected those bacteria that had inserts of DNA that could correspond to the expected size for conotoxins. The sequencing of the insert and subsequent analysis let us identify a complete toxin of 37 amino acids. This toxin has 8 cysteine residues and has not been described previously. The cysteine pattern, C-C-CC-C-C-C-C, is identical to the toxin region of the V superfamily, nevertheless the region of the precursor does not correspond to this superfamily but is pretty similar to the precursor of a *C. rosearapum* toxin. It was also found a sequence of RNA messenger that translates to a conotoxin similar to the conotoxins in the T superfamily of the vermivorous specie *Conus litteratus*. This fact suggests that *Conus regularis* has a diet base in polychaetes.

**Keywords:** *Conus regularis*, cDNA library, vermivorous, V and T superfamilies.

---

## DEDICATORIA

Para "la mama" porque sus palabras siempre me curan. Para "el pachus" por regalarme la Luna. Porque mi amor por ustedes es infinito.

Para mi Shofis-pofis, "la trisquistrisquis". Eres mi media naranja chaparrita, sin ti mi vida no estaría completa.

Para ti.

El sol sale cada día,  
va tocando en cada casa,  
da un golpe con su bastón,  
y suelta una carcajada...

¡Que salga la vida al sol,  
de donde tantos la aguardan,  
y veréis cómo la vida  
corre de sol empapada!

Nicolás Guillén

---

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por las dos becas otorgadas para la realización de este proyecto. Por impulsar la ciencia en México.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, CICESE, por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Alexei F. Licea Navarro, por brindarme la oportunidad de trabajar con él. Por permitirme abrir mis horizontes en el extranjero y por siempre haberme apoyado. Por la beca recibida para mi estancia en el extranjero y por la beca otorgada para la culminación de la tesis.

A los miembros de mi comité de tesis: a la Dra. Anamaría Escofet por los talleres de redacción en su oficina y a la Dra. Elizabeth Ponce por los consejos de biología molecular. Gracias por la buena disposición que siempre tuvieron y por haber enriquecido tanto mi tesis.

Al Dr. Baldomero Olivera, Toto, por permitirme trabajar en su laboratorio. Por todas las atenciones que siempre tuvo conmigo.

Al Dr. Pradip Bandyopadhyay, porque fue un elemento clave en la realización de este proyecto. Por ser un profesor formidable.

A Maren Watkins por ayudarme a analizar mis secuencias y por permitirme trabajar en su laboratorio. ¡El laboratorio soñado de tantos!

A la M. C. Karla Cervantes por darme el primer empujón y el último aliento para llevar a cabo la tesis.

---

A la Dra. Edna Sánchez por ser siempre tan amable y ayudarme cuando lo necesitaba.

A la M.C. April Cabang, el M.C. Sam Espino y el M.C. Shrinivasan Raghuraman por resolver mis dudas en el laboratorio.

A Adriana Mejía, Lupita Martínez, Viviana Oloño, Terry Merritt, Norma Fuentes, Dolores Sarracino, Citlali Romero e Ivonne Best por haber tenido conmigo siempre la mejor disposición.

---

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Tengo la fortuna de tener en mi vida a tanta gente con la cual estar agradecida. Que me han demostrado su cariño y sin los cuales yo no sería la persona que soy ahora. Gracias a todos aquellos que me han ayudado de una u otra manera a lograr una meta más en mi vida, en especial:

A mis tres pilares: **mamá, papá y Ana**. ¡Qué felices somos los 4!

A mi **Yayis** por sus palabras de amor. A mi **Papú** por juntar a esta familia. A **Cholita** y a **Telo** porque tuvieron mucho que ver en este proyecto.

A la Familia **Figueroa-Rodríguez**, en especial a mi tío **Felipe** y a mi tía **Socorro** que se preocuparon de mi bienestar en todo momento. A la **Familia Montiel**, sobre todo a mis primates que adoro **Remi, Ditrish, Fer, Juli, Cons, Juancho, Evita, Yul y Sofía**. A mi familia adoptiva: **Coll-Presa, Palma-Gibert y Soler-Ortega**.

A mis amigochas que tanto quiero y sin las cuales yo no podría haber terminado esta tesis. Por las pláticas largas de todos los temas habidos y por haber, por las palabras de aliento cuando estaba lejos, por los cafés, por las noches de fiesta, las risas y las lágrimas, ¡por tantas cosas! A **Joann, Doménica, Edna, Anette, Bárbara, Bonnie y Ana Paula**. ¡Las quiero muchísimo!

A **Ana Elena** que me ayudó mucho en los últimos meses de esta tesis y porque sé que encontré una buena amiga.

A les meves amigues catalanes: **Cris i Tali**, perquè la distància no ha estat mai un impediment per aquesta amistat. Les trovo a faltar!!! Les estimo moltíssim!

---

A **Sofi**. ¡Qué contenta estoy de haberte conocido, eres imparable! Ya sé que te debo muchas visitas, ¡tqm!

A mi amigo **Andrés**, que me sacaba al Hussong's de vez en cuando y con el que sé que puedo contar siempre.

A **Lulu Olivera** porque hizo que el invierno de Utah fuera menos crudo, por acogerme como un miembro de su familia. Salamat sa iyo para sa lahat.

A **Alexei** por ser un jefe del que siempre puedes aprender. Porque siempre supe que podía contar con él. ¡Muchísimas gracias!

To all lab members of the Olivera lab. Especially to: **Pradip, April, Carla, Sabah, Sean, Vernon, Sam, Maren, Albert** and **Johanna**. I miss you! To **Terry**, the sweetest person I have ever met

A **Cheenu**, sin el cual hubiera sido imposible sobrevivir en Salt Lake City. We had fun at those tea parties!

To **Scot**, for all the help that you gave me.

A **Samanta** y **Sofía**, porque son mi dúo favorito. Muchas gracias por todas las tardes en su casa, por las pláticas y las risas. Las quiero mucho y valoro aún más nuestra amistad. A **Leonora**, mi changuilla adorada. A mis compañeros, pero sobre todo amigos, que siempre me echaron la mano resolviendo todas mis dudas y con los que sabía que podía hablar de mi tesis pasando un momento agradable: **Félix, Jairo, Hannah, Karla, Irasema, Flor y la agente T**.

A **Sole, Angie** y **Gaby** porque aunque nos veamos poco siempre es con gusto y podemos retomar la plática donde la dejamos.

---

A **Panchita, Karinita, Nieves y Luis** que estuvieron siempre al pendiente de mi. Que me hicieron sentir como en casa y con los que he pasado buenos momentos.

A **Mariselle, Vane Legeren y Karla Daniela** porque a pesar de que nos contactamos poco, valoro mucho su amistad.

A **Humberto, Lalo D. y Ubaldo.**

---

# CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN .....	I
ABSTRACT.....	II
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS .....	IV
AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	VI
CONTENIDO .....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABLAS.....	XIV
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
II.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>Conus</i> .....	3
II.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Conus</i> .....	4
II.3 APARATO VENENOSO DE LOS <i>Conus</i> .....	6
II.4 PERSPECTIVA GENERAL DE LA EVOLUCIÓN DEL GÉNERO <i>Conus</i> .....	8
II.5 VENENO DE <i>Conus</i> .....	9
II.6 CLASIFICACIÓN DE LAS CONOTOXINAS .....	11
II.7 LOS CABALES: UN COCTEL DE FÁRMACOS.....	13
II.8 LAS CONOTOXINAS COMO FÁRMACOS. ....	17
II.9 <i>Conus regularis</i> .....	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>25</b>
V.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
VI.1 OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES. ....	26
VI.2 OBTENCIÓN DE DUCTOS PARA EXTRACCIÓN DE ARN DE <i>Conus regularis</i> .....	27
VI.3 EXTRACCIÓN DEL ARN DEL VENENO. ....	28
VI.3.1 SEPARACIÓN DE FASES .....	29
VI.3.2 UNIÓN, LAVADO Y ELUCIÓN .....	29
VI. 4 CREACIÓN DE LA 1ER BIBLIOTECA DE ADN DE <i>Conus regularis</i> .....	31
VI.4.1 CREACIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA. ....	31

## CONTENIDO (continuación)

	PÁGINA
VI.4.2 CREACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN DE CADENA DOBLE MEDIANTE PCR. ....	33
VI.4.3 FRACCIONAMIENTO DEL ADNc. ....	34
VI.4.4 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE LA 1er BIBLIOTECA DE ADNc. ....	36
VI.4.5 VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INSERTO EN LAS COLONIAS. ....	39
VI.4.6 CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS Y EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO. ....	40
VI.4.7 SECUENCIACIÓN. ....	41
VI. 5 CREACIÓN DE LA 2NDA BIBLIOTECA DE ADNc. ....	42
VI. 6 CREACIÓN DE LA 3ERA BIBLIOTECA DE ADNc. ....	42
VI. 7 CREACIÓN DE LA 4TA BIBLIOTECA DE ADNc. ....	44
VI. 8 CREACIÓN DE LA 5TA BIBLIOTECA DE ADNc (UTILIZANDO ARNm) ....	45
VI.8.1 CREACIÓN DE ARN MENSAJERO A PARTIR DE ARN TOTAL. ....	45
VI.8.2 CREACIÓN DE LA 5ta BIBLIOTECA. ....	45
VI.9 CREACIÓN DE LA 6TA BIBLIOTECA DE ADNc (UTILIZANDO ARNm) ....	46
VI.10 UTILIZACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA DETERMINADAS SUPERFAMILIAS DE TOXINAS. ....	46
VI.10.1 PRUEBA PREMILINAR. ....	46
VI.10.2 PRUEBA ESPECÍFICA. ....	48
VI.10.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN Y EXTRACCIÓN DEL GEL. ....	48
VI.10.4 CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN. ....	49
VI.10.5 VERIFICACIÓN DEL INSERTO. ....	49
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
VII.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DEL VENENO DEL CÓNIDO. ....	51
VII.1.1 1era EXTRACCIÓN. ....	51
VII.1.2 2nda EXTRACCIÓN. ....	52
VII.2 RESULTADOS DE LA 1ER BIBLIOTECA DE ADNc. ....	52
VII.2.1 ADN DE CADENA SENCILLA. ....	52
VII.2.2 ADN DE CADENA DOBLE Y FRACCIONAMIENTO DEL PRODUCTO. ....	53
VII.2.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO. ....	54
VII.2.4 EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO. ....	55
VII.3 RESULTADOS DE LA 2NDA BIBLIOTECA DE ADNc. ....	56
VII.3.1 SÍNTESIS DE ADN. ....	56

## CONTENIDO (continuación)

	PÁGINA
VII.3.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN.....	56
VII.3.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO. ....	56
VII.3.4 EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO .....	57
VII.4 RESULTADOS DE LA 3ERA BIBLIOTECA DE ADNC.....	57
VII.4.1 SÍNTESIS DE ADN DE <i>Conus regularis</i> Y ADN DE HÍGADO DE RATÓN.....	57
VII.4.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN DE LA 3era BIBLIOTECA DE <i>Conus regularis</i> Y DEL CONTROL. ....	58
VII.4.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO. ....	58
VII.4.4 EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO .....	60
VII.4.5 RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN .....	61
VII.5 RESULTADOS DE LA 4TA BIBLIOTECA DE ADNC.....	69
VII.5.1 SÍNTESIS DE ADN.....	69
VII.5.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN DE LA 4ta BIBLIOTECA. ....	69
VII.5.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO.....	69
VII.6 RESULTADOS DE LA 5TA BIBLIOTECA DE ADNC.....	70
VII.6.1 CREACIÓN DEL ARN MENSAJERO A PARTIR DEL ARN TOTAL.....	70
VII.6.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN DE LA 5ta BIBLIOTECA. ....	70
VII.6.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO. ....	71
VII.7 RESULTADOS DE LA 6TA BIBLIOTECA DE ADNC.....	71
VII.8 RESULTADOS DE LA UTILIZACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS.....	72
VII.8.1 PRUEBA PREMILINAR.....	72
VII.8.2 PRUEBA ESPECÍFICA.....	73
VII.8.3 VERIFICACIÓN DEL INSERTO .....	73
VII.8.4 SECUENCIACIÓN.....	74
VII.8.5 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	77
VIII. DISCUSIÓN .....	78
IX. CONCLUSIONES.....	84
X. PERSPECTIVAS .....	85
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	86
XII. ANEXO.....	91

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1. MIEMBROS DE LA FAMILIA CONIDAE. ....	4
FIGURA 2. <i>C. quercinus</i> , UN CÓNIDO VERMÍVORO, ATACANDO UN GUSANO POLIQUETO .....	5
FIGURA 3. ESQUEMA GENERAL DE LA DISPOSICIÓN DEL APARATO VENENOSO DE LOS CARACOL DEL GÉNERO <i>Conus</i> .....	6
FIGURA 4. RÁDULA MODIFICADA DE <i>Conus striatus</i> .....	7
FIGURA 5. DIFERENTES ETAPAS POR LOS QUE PASA EL CONOPÉPTIDO ANTES DE LLEGAR A SER UNA TOXINA MADURA .....	11
FIGURA 6. CLASIFICACIÓN DE LOS CONOPÉPTIDOS QUE SON POBRES EN ENLACES DISULFURO. ....	12
FIGURA 7. DIAGRAMA QUE NOS PERMITE ENTENDER LA MANERA EN QUE SE CLASIFICAN LAS CONOTOXINAS. ....	13
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN DE LAS DOS DISTINTAS MANERAS DE CAZAR QUE PUEDEN TENER LOS <i>Conus</i> . ....	16
FIGURA 9. MUESTRA LA MANERA EN QUE PRIALT® BLOQUEA LA SEÑALIZACIÓN .....	18
FIGURA 10. FOTOGRAFÍA DE <i>Conus catus</i> , CARACOL DEL CUAL SE EXTRAE LA $\Omega$ -CONOTOXINA CVID .....	19
FIGURA 11. FOTOGRAFÍA DE UNA CONCHA PERTENECIENTE A <i>Conus regularis</i> .....	21
FIGURA 12. IMAGEN SATELITAL DE LA ZONA DE COLECTA, BAHÍA DE LOS ÁNGELES.....	27
FIGURA 13. DISECCIÓN DE <i>Conus regularis</i> . ....	28
FIGURA 14. ESQUEMA DE CÓMO QUEDA EL TUBO DESPUÉS DE AÑADIR EL CLOROFORMO Y SER CENTRIFUGADO. ....	29
FIGURA 15. TUBO DE COLECTA, CARTUCHO DE CENTRIFUGADO CON MEMBRANA DE SÍLICE Y CARTUCHO DENTRO DE SU TUBO DE COLECTA.....	30
FIGURA 16. ESQUEMA DE CÓMO SE REALIZA LA SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO.....	32
FIGURA 17. MAPA DEL VECTOR LINEARIZADO PSMART2IF .....	36
FIGURA 18. GEL DE ELECTROFORESIS PARA OBSERVAR LA CALIDAD DEL ARN DE <i>Conus regularis</i> EN LA PRIMERA EXTRACCIÓN. ....	51
FIGURA 19. ADNC DE <i>Conus regularis</i> .....	53
FIGURA 20. ANÁLISIS DEL ADNC FRACCIONADO. ....	54
FIGURA 21. PRODUCTOS DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR UTILIZANDO LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS. ....	55
FIGURA 22. PRODUCTOS DE PCR DE LAS COLONIAS DE LA CAJA 1 DE LA 3ERA BIBLIOTECA DE <i>Conus regularis</i> . ....	60
FIGURA 23. SECUENCIAS DE LA REGIÓN DEL PRECURSOR DE LA TOXINA DE <i>C. regularis</i> Y DE LA TOXINA DE LA FAMILIA MU.....	65
FIGURA 24. SECUENCIA DE <i>C. regularis</i> QUE CORRESPONDE A LA REGIÓN DEL PRECURSOR DE LA TOXINA Y SECUENCIA DE LA REGIÓN DEL PRECURSOR DE LA FAMILIA GAMMA.....	65
FIGURA 25. LA PRIMERA SECUENCIA CORRESPONDE A LA REGIÓN DEL PRECURSOR DE LA TOXINA DE <i>C. regularis</i> . LA SEGUNDA SECUENCIA CORRESPONDE A LA REGIÓN DEL PRECURSOR DE LA TOXINA DE LA FAMILIA I DEL CÓNIDO <i>C. arenatus</i> . ....	66
FIGURA 26. DOS COMPARACIONES DE LA REGIÓN DE LA TOXINA DE <i>C. regularis</i> CON LA REGIÓN DE LA TOXINA DE LA FAMILIA GAMMA Y CON LA REGIÓN DE LA TOXINA I DE <i>C. arenatus</i> .....	67

	<b>PÁGINA</b>
FIGURA 27.- LA SECUENCIA DENOMINADA <i>regularis</i> CORRESPONDE A NUESTRA TOXINA DE 56 AMINOÁCIDOS COMPLETA. LA SEGUNDA SECUENCIA ( <i>ROSEA</i> ), QUE TIENE 60 AMINOÁCIDOS, CORRESPONDE A LA TOXINA COMPLETA DEL CÓNIDO C. <i>rosearapum</i> .....	68
FIGURA 28. PRODUCTOS DE PCR UTILIZANDO CEBADORES ESPECÍFICOS PARA <i>Conus</i> . .....	72
FIGURA 29. PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUÉS DE LLEVAR A CABO LA LIGACIÓN DEL ADNc, OBTENIDO CON UN CEBADOR ESPECÍFICO PARA UN DETERMINADA SUPERFAMILIA, Y EL VECTOR PSMART2IF.....	74

## LISTA DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
TABLA I. GUÍA DE CÓMO PREPARAR LAS REACCIONES PARA LLEVAR A CABO LA CLONACIÓN .....	37
TABLA II. COMPONENTES A AÑADIR PARA LLEVAR A CABO LA CLONACIÓN. ....	43
TABLA III. MUESTRA LA MANERA EN QUE FUERON AÑADIDOS EL ADN Y LOS CEBADORES. ....	48
TABLA IV. RESULTADOS OBTENIDOS DESPUÉS DE HABER LLEVADO A CABO LA TRANSFORMACIÓN PARA LA 2 <sup>DA</sup> BIBLIOTECA DE <i>Conus regularis</i> .....	56
TABLA V. TOTAL DE CLONAS ANALIZADAS PARA CADA UNO DE LOS CEBADORES .....	74

---

---

## I. INTRODUCCIÓN

---

Podemos encontrar animales venenosos en casi cualquier parte de la naturaleza: existen animales venenosos terrestres como las víboras de cascabel, animales venenosos aéreos como las abejas o animales venenosos acuáticos como las medusas. El veneno de estos organismos son biofluidos que contienen toxinas, conformadas principalmente de péptidos y proteínas, las cuales son generalmente inyectadas en la víctima (Favreau y Stocklin, 2009).

Estos venenos, que actúan sobre blancos moleculares externos, se han perfeccionado a través de millones de años de evolución para poder realizar un resultado en específico. Cada veneno tiene distintos efectos porque cada uno está diseñado para distintos propósitos biológicos: puede ser utilizado para defenderse de sus depredadores como es el caso de ciertas ranas que contienen veneno en su piel; puede ser utilizado como un arma para competir por su territorio como es el caso de los ornitorrincos, aunque en la mayoría de las veces el veneno sirve como instrumento para capturar a una presa (Olivera, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que estos biofluidos son una fuente de compuestos bioactivos potentes y selectivos, que al purificarse dan lugar a ingredientes que pueden ser utilizados como fármacos, como herramientas farmacológicas en la investigación o dentro de la propia industria de la biotecnología (Favreau y Stocklin, 2009).

Dentro de los animales venenosos, los caracoles marinos del género *Conus* ocupan un lugar especial. Su veneno no sólo está comprendido por una gran

---

variedad de péptidos sumamente pequeños sino que además cada uno de estos componentes es capaz de unirse de manera específica a un blanco molecular en particular. Esta última cualidad les permite discriminar entre subtipos de canales iónicos sumamente relacionados entre sí, por lo que además de presentar potencial terapéutico y de diagnóstico, pueden ser utilizados como agentes farmacológicos en la investigación de canales iónicos (Terlau y Olivera, 2004).

En este trabajo se realizó un estudio del transcriptoma del veneno de *C. regularis*, un cónido del Golfo de California que ha sido poco estudiado con respecto a su veneno y a su biología en general, considerando que la construcción de bibliotecas de ADNc son herramientas indispensables para futuras etapas de síntesis de las conotoxinas.

---

## II. ANTECEDENTES

---

### II.1 Características generales del género *Conus*

Los gasterópodos marinos venenosos pertenecientes al género *Conus*, que se encuentran dentro del grupo Toxoglosa (Superfamilia Conoidea), se dividen dentro de tres familias: Conidae (~1000 especies), Turridae (~15-20 000 especies) y Terebridae (~300 especies) (Favreau y Stocklin, 2009).

Todos los caracoles pertenecientes al grupo Toxoglosa se caracterizan por la presencia de un aparato venenoso, en donde la rádula característica del resto de los gasterópodos ha sido modificada para poder lanzar sus dientes en forma de arpón, inyectar el veneno y poder así paralizar a su víctima.

Los cónidos han desarrollado su veneno de tal manera que no sólo cumple con una función en específico, como sería el cazar a su presa, sino que también les permite defenderse de depredadores y marcar su territorio ante posibles competidores. Esto nos permite explicarnos por qué existen de 100 a 200 componentes distintos en el veneno de cada una de las alrededor de 1000 especies de cónidos. Si a esto sumamos que tan sólo el 10% de la familia Conidae (Figura 1) ha sido estudiada con respecto a su veneno y que ésta únicamente representa alrededor del 10% del total de la Superfamilia Conoidea, entonces podemos asegurar que aún existe mucho trabajo por realizar (Norton y Olivera, 2006), no solamente en la identificación de especies aún no conocidas, sino también en el análisis del repertorio de componentes del veneno y a la especificidad de cada uno de ellos.

---

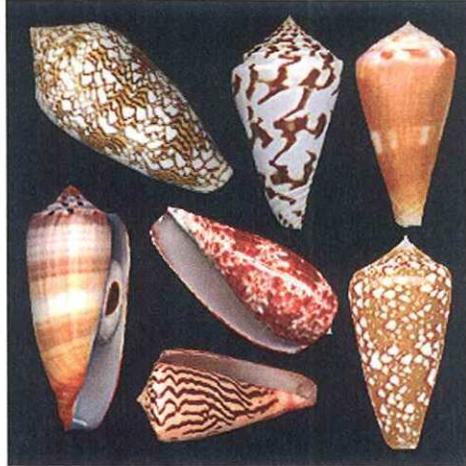


Figura 1. Miembros de la familia Conidae.

<http://www.seashell-collector.com/beginners/CONIDAE.jpg>

## II.2 Biología del Género *Conus*

El hábitat preferente de los *Conus* son las comunidades arrecifales y el marino tropical a profundidades no mayores de los 100 m, y a pesar de que existen algunas especies de cónidos, como el caso de *Conus californicus*, que se han adaptado a aguas frías como las del Pacífico, es en las aguas someras del trópico donde la diversidad de los cónidos crece drásticamente. Un ejemplo de ello es que se pueden llegar a encontrar más de 30 especies distintas de éste género en un solo arrecife de coral del Indo-Pacífico (Kohn AJ *et al*, 2001; citado en Terlau y Olivera, 2004).

Los hábitos alimenticios de los *Conus* suelen ser nocturnos, mientras que durante el día se localizan entre la arena, cerca de corales y rocas o sobre pastos marinos (Olivera *et al*, 1990). A pesar de contar con un par de ojos, su visión es sumamente pobre y por lo tanto tienen que hacer uso de sus habilidades quimiosensoras para atrapar a su presa.

Una de las maneras en que podemos clasificar a los *Conus* es dependiendo de su tipo de dieta, lo que nos permite distinguir en tres grupos. El grupo mayoritario son los vermívoros (Figura 2), es decir su dieta principal son los gusanos, en especial los poliquetos (gusanos marinos segmentados pertenecientes al phylum Annelida), aunque también pueden alimentarse de gusanos hemicordados y equiúridos. Los otros dos grupos están comprendidos por los moluscívoros, que se alimentan de otros gasterópodos, y los piscívoros, que depredan peces (Olivera, 1997).



Figura 2. *C. quercinus*, un cónido vermívoro, atacando un gusano poliqueto (Modificado de Olivera, 2002).

Una diferencia que existe entre los cónidos piscívoros y los moluscívoros es que mientras que los primeros utilizan un solo arpón para capturar a sus presas, los segundos requieren de inyectar su veneno repetitivamente por lo que pueden llegar a utilizar una docena de arpones para capturar a un solo caracol (Terlau y Olivera, 2004). Por otro lado, algunas especies de cónidos que han colonizado aguas frías y no tienen congéneres con los cuales competir, son generalistas (Kohn, 1966). Tal es el caso de *C. californicus* el cual puede alimentarse de peces, gusanos, moluscos e inclusive artrópodos (Biggs *et al*, 2010).

El tipo de dieta de los *Conus* es sumamente importante, ya que se ha demostrado que los síntomas ocasionados por envenenamiento de este género difieren de acuerdo a la especie y que aquellos que se alimentan de peces son los que presentan el veneno más potente en mamíferos (Olivera *et al*, 1990). No debemos de subestimar el veneno de estos organismos, ya que en algunos casos puede

llegar a ser letal para los humanos, tal es el caso de *Conus geographus* en donde el 70% de las personas que han sido picadas por este caracol, y que no reciben atención médica, mueren.

### II.3 Aparato venenoso de los *Conus*

El aparato venenoso de estos gasterópodos se compone principalmente, citando de la parte posterior a la anterior, por: un bulbo venenoso, un ducto venenoso, el esófago, un saco radular, la faringe, la probóscide y el diente radular (Figura 3).

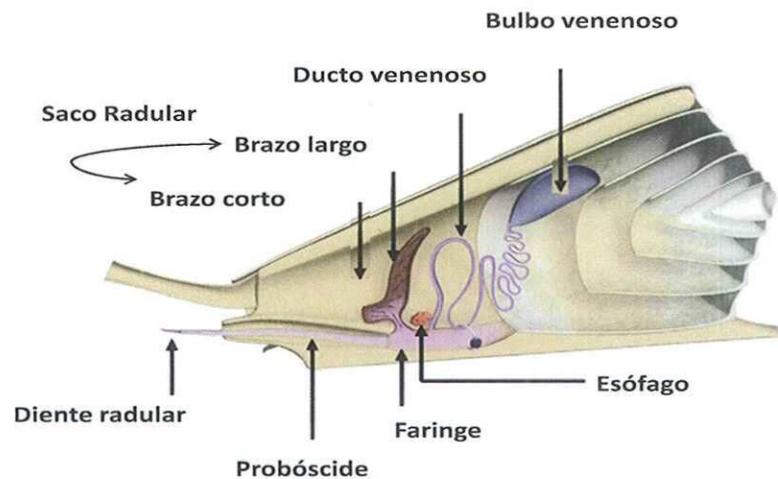


Figura 3. Esquema general de la disposición del aparato venenoso de los caracoles del género *Conus* (Modificado de Favreau y Stocklin, 2009).

Los componentes activos del veneno del género *Conus* son sintetizados en las células epiteliales que se encuentran a lo largo del ducto venenoso tubular, el cual desemboca en la faringe del organismo que está situada entre la probóscide y el esófago (Olivera, 2002). En el extremo opuesto de la faringe se encuentra el bulbo venenoso, el cual es una estructura de tejido muscular desarrollado que es utilizado para expulsar al veneno a través del ducto venenoso (Norton y Olivera, 2006), no obstante se piensa que la fuerza final para lograr la expulsión del diente

es provista por la probóscide (Kohn y Hunter, 2001). Tanto el bulbo como el ducto venenoso son utilizados como reservorios del veneno que está siendo producido.

El saco radular localizado en la parte anterior de la faringe, está compuesto de un tejido ciliado en forma lineal, que posiblemente facilita la salida de las rádulas del saco radular hacia la faringe. En el saco radular se observan dos protuberancias, una larga, o de brazo largo, que es donde se manufacturan y almacenan los dientes por lo que contiene aproximadamente 60 rádulas; y otra corta, o brazo corto, que contiene sólo los dientes maduros listos para ser usados, que serían dentro de 10 a 12 rádulas.

Las rádulas, constituidas por quitina, tienen la forma de un arpón hueco y tienen la función de inyectar el veneno (Figura 4). Esta rádula es similar a una aguja hipodérmica, y tienen la misma función que el diente hueco de las víboras, sólo que en este caso son desechadas en cada ataque. Estudios realizados por microscopía electrónica, muestran que en el aparato venenoso de la mayoría de las especies de *Conus* las rádulas se cargan con el veneno cuando llegan a la faringe (Marshall *et al*, 2002). Además cada organismo presenta un arpón distinto, por lo que se dice que es característico de cada especie.

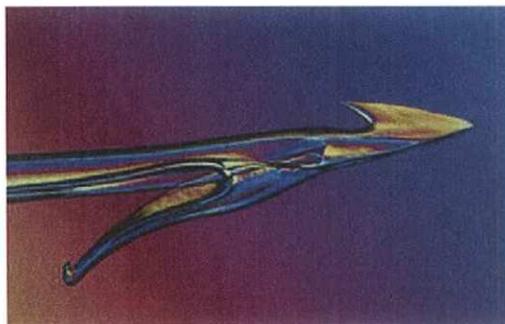


Figura 4. Muestra la rádula modificada del *Conus striatus* la cual se asemeja a un arpón y es utilizado para inyectar el veneno a sus presas, que en este caso son peces (Favreau y Stocklin, 2009).

## **II.4 Perspectiva general de la evolución del género *Conus***

El registro fósil de los toxoglados sugiere que estos tuvieron origen en el periodo Cretácico, no obstante los verdaderos *Conus* únicamente se conocen después de la extinción masiva de este periodo (Kohn AJ, 1985; citado en Terlau y Olivera, 2004). Los primeros fósiles que definitivamente pertenecen al género *Conus* corresponden al Eoceno temprano; esto nos permite asumir que, al igual que otros caracoles carnívoros, éste es un grupo que tuvo la oportunidad ecológica en la extinción marina que se dio en la frontera entre el Cretácico y el Terciario. Los moluscos predadores marinos del Mesozoico, en particular las amonitas, desaparecieron al mismo tiempo que los dinosaurios desaparecieron en la tierra y probablemente fue esta extinción la que permitió que tuviera lugar la primera radiación de los cónidos. La segunda radiación inició en el Mioceno y con excepción de un revés que tuvo en el Plioceno inferior, donde hubo una extinción significativa, la expansión del género prácticamente continúa hasta el día de hoy, hecho que explica que sea ahora cuando exista la mayor cantidad de especies de este grupo (Olivera, 2002).

La radiación del género *Conus* en particular, de los moluscos toxoglados en general, presuntamente requiere de la evolución de nuevos venenos así como de sistemas eficientes que permitan liberarlo (Terlau y Olivera, 2004). Tenemos que tomar en cuenta que estos caracoles son sumamente lentos y a pesar de esto se alimentan de presas que pueden considerarse rápidas; por lo tanto sufren de una fuerte presión selectiva que les permite desarrollar venenos que actúen muy rápidamente. Para poder llegar a tener esta especialización bioquímica tan sorprendente, seguramente fue necesario sobrepasar un sin número de barreras como puede ser un empaquetamiento adecuado de los péptidos. Estas barreras sólo han sido superadas por este taxa lo que nos permite afirmar que en 50 millones de años, la estrategia evolutiva de estos animales ha sido exitosa (Olivera, 2002).

A partir de datos moleculares se han definidos 17 clados de especies que fueron originados a partir de la segunda radiación post-Eoceno (Espíritu *et al*, 2001). Cuatro de estos clados (I a IV) contienen a especies que cazan peces y dos clados (V, VI) están conformados por especies que se alimentan de otros moluscos. La mayor parte de los clados (VII-XVII) se componen por especies que se alimentan de gusanos, siendo éste último grupo el que presenta los especímenes más especializados; un ejemplo es el caso del clado XVII en donde aparentemente todas las especies se alimentan de amfinómidos, también conocidos como gusano de fuego, los cuales se caracterizan por ser un grupo de poliquetos errantes que se defienden con espículas sumamente puntiagudas (Olivera, 2002).

## **II.5 Veneno de *Conus***

Los venenos de los *Conus* están conformados por conopéptidos, término que muchas veces se utiliza de manera intercambiable por el de conotoxinas, aunque como veremos más adelante este intercambio de palabras no es del todo correcto. Cada conopéptido es el producto funcional final de un determinado gen y al igual que las proteínas, presentan conformaciones específicas esenciales que les confieren las características que los hacen funcionales. La innovación bioquímica que estos conopéptidos aportan es el hecho de ser sumamente pequeños y estables; es verdad que existen péptidos más pequeños, como es el caso de los neuropéptidos del sistema nervioso central, pero estos funcionan por lo general como moléculas señal cuyo tiempo de vida es relativamente corto y que por lo tanto son degradadas fácilmente por las proteasas. Como veremos más adelante, las conotoxinas contiene una alta cantidad de enlaces disulfuro que las convierte en los productos polipeptídicos más altamente estructurados y pequeños conocidos hasta la fecha (Olivera, 2002).

---

En el veneno de los cónidos también se han encontrado una variedad de moléculas pequeñas. Sólo dos han sido identificadas: la serotonina en el veneno de *C. imperialis* (England *et al*, 1998) y el ácido araquidónico que se encuentra presente en altos niveles en el veneno de *Conus textile* (Nakamura *et al*, 1995). Además se han encontrado enzimas que posiblemente juegan un papel muy importante en el envenenamiento, siendo la fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub> la mejor caracterizada (McIntosh *et al*, 1995).

La traducción del ARN<sub>m</sub> que codifica a una conotoxina tiene como resultado un precursor pre-propeptídico (Figura 5) el cual tiene una longitud entre 80 y 120 aminoácidos. Esto quiere decir que a nivel transcripcional los conopéptidos están integrados por una secuencia precursora que consiste de una secuencia señal o región pre (sumamente conservada), que al ser hidrolizada da lugar a una región pro, para finalmente obtener una toxina madura. Esta toxina final madura es sumamente variable, siendo lo único que permanece constante el arreglo de los residuos de cisteína y los enlaces disulfuro que se forman entre ellas, por lo que la gran diversidad de los venenos de *Conus* es debido a la hipermutación de esta región. Los conopéptidos finales, al ser muy pequeños y encontrarse sumamente plegados, son muy estables y pueden resistir la degradación enzimática de las proteasas que se encuentran en la presa o en el mismo ducto venenoso (Buczek *et al*, 2005).

Además, los conopéptidos pueden sufrir modificaciones postraduccionales, siendo la más estudiada la  $\gamma$ -carboxilación de un glutamato en el aminoácido menos usual  $\gamma$ -carboxiglutamato. Los cónidos expresan la enzima que lleva a cabo estas modificaciones postraduccionales en su ducto venenoso y ésta tiene su secuencia de reconocimiento en la región pro del precursor (Bandyopadhyay PK *et al*, 2002). Esto quiere decir que la secuencia señal que se encuentra en la región pro sirve como sitio de unión para la enzima desde donde le permite modificar

---

determinados residuos de aminoácidos en la región madura de la toxina (Hoope *et al*, 2000).

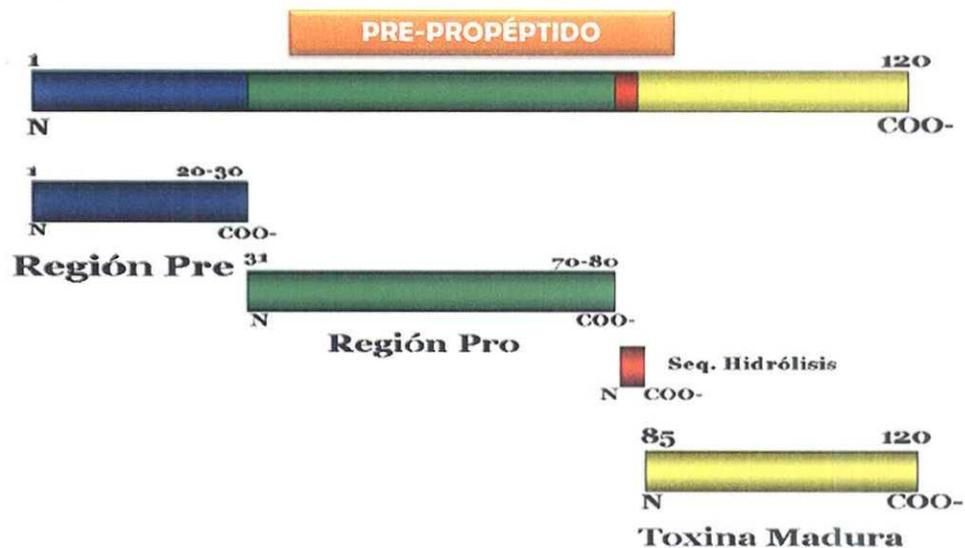


Figura 5. Muestra las diferentes etapas por las que pasa el conopéptido antes de llegar a ser una toxina madura (Modificado de Juárez, 2005).

## II.6 Clasificación de las conotoxinas

Como se ha mencionado, los conopéptidos son secuencias cortas de 10 a 30 aminoácidos, aunque se han llegado a reportar de hasta 60 residuos (Becker y Terlau, 2008). De acuerdo a su secuencia de aminoácidos, los conopéptidos pueden ser clasificados de dos maneras: péptidos ricos en enlaces disulfuros (conocidos como conotoxinas) y péptidos que no son ricos en enlaces disulfuros. Estos péptidos pobres en residuos de cisteína (Figura 6) se dividen a su vez en aquellos que carecen totalmente de estos y en aquellos que llegan a presentar un enlace disulfuro; además se subclasifican dependiendo del blanco molecular sobre el que actúan (Terlau y Olivera, 2004).

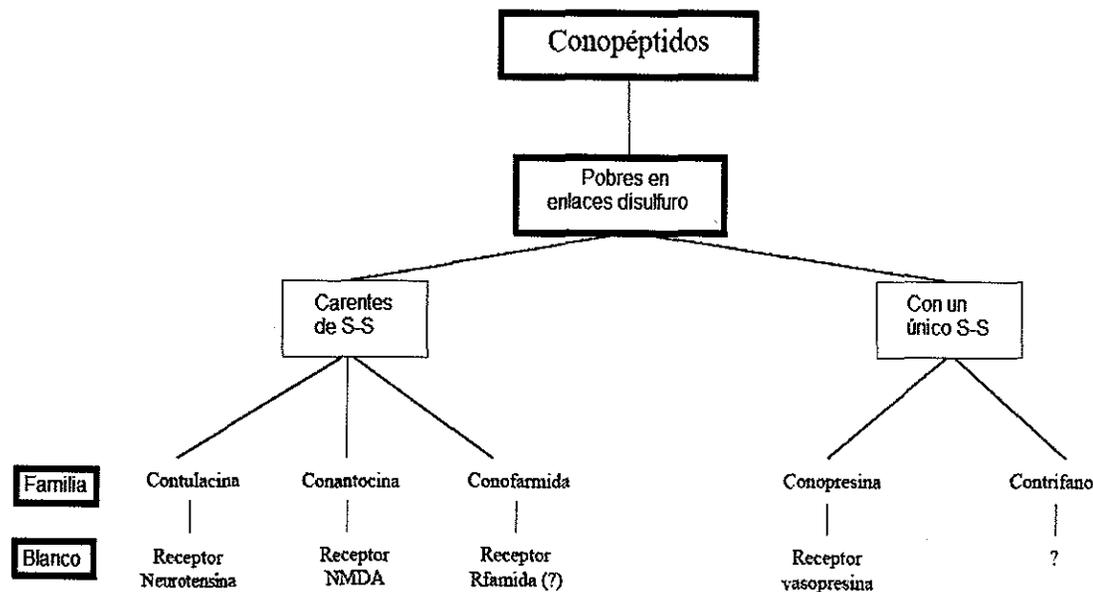


Figura 6. Clasificación de los conopéptidos que son pobres en enlaces disulfuro, dependiendo de si sólo presentan un enlace o ninguno. A su vez se clasifican en familias dependiendo del blanco molecular sobre el que actúan (Modificado de Terlau y Olivera, 2004).

Por otro lado, en las conotoxinas, que son ricas en enlaces disulfuro, los residuos de cisteínas se encuentran en una frecuencia sumamente alta y pueden estar separados por 0 a 6 aminoácidos. El patrón de los enlaces de cisteína es una determinante decisiva en la estructura del péptido y por lo tanto ha servido como base a la hora de escoger una nomenclatura. Las conotoxinas se clasifican en superfamilias de acuerdo al patrón de los enlaces de cisteína que presenten, de esta manera tenemos a la superfamilia A si el patrón de cisteínas es CC-C-C-C-C o a la familia O si el patrón de cisteínas es C-C-CC-C-C. Las superfamilias no sólo tienen en común que presentan el mismo patrón de cisteínas sino que además presentan la misma región pre; existen alrededor de 10 superfamilias siendo las más conocidas las superfamilias O, M, A, S, T, P e I, aunque el número sigue aumentando conforme se avanza en el estudio de los conopéptidos. Dentro de estas superfamilias podemos realizar una subclasificación de los conopéptidos en familias, dependiendo del blanco molecular al que afecten, por ejemplo se

denomina familia  $\kappa$  a aquellos conopéptidos que inhiben canales de potasio o superfamilia  $\mu$  si inhiben a canales de sodio. En la Figura 7 podemos ver un diagrama que nos permite entender la manera en que se clasifican las conotoxinas.

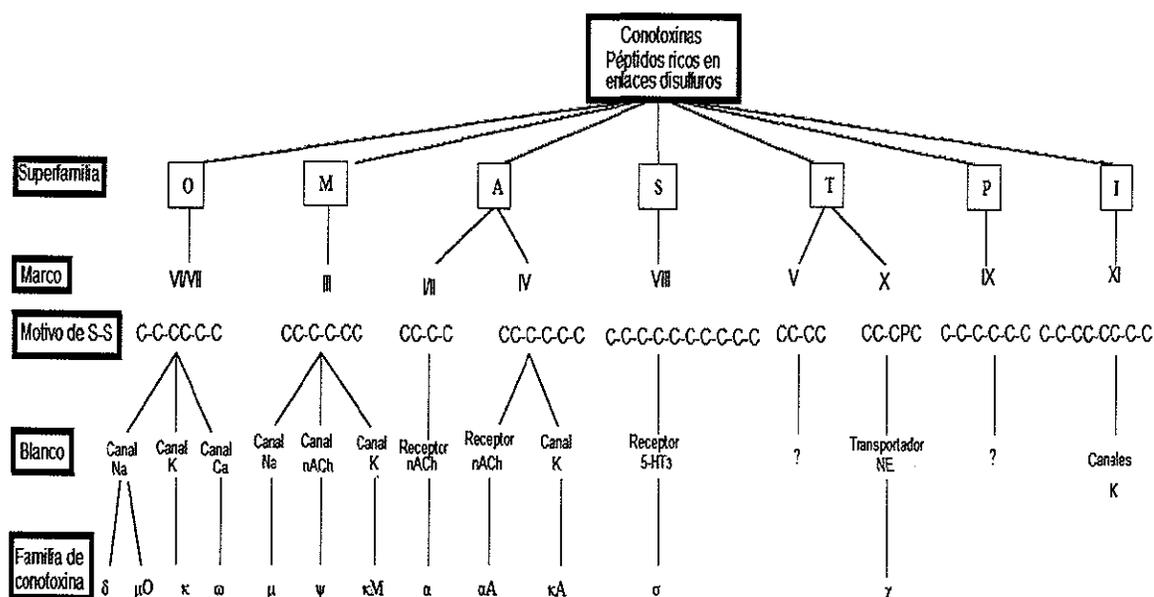


Figura 7. Diagrama que nos permite entender la manera en que se clasifican las conotoxinas. Podemos observar las diferentes superfamilias, su respectivo patrón de cisteínas, el blanco molecular al que atacan y por la tanto la familia a la que pertenecen (Modificado de Terlau y Olivera, 2004)

## II.7 Los cabales: un coctel de fármacos

La forma en que los *Conus* utilizan su veneno en el momento de atrapar a su presa, consiste en inyectar una determinada combinación de las toxinas, para de esta manera lograr una inmovilización rápida y contundente de ella. Esto quiere decir que el veneno de los caracoles está compuesto por péptidos distintos que actúan sobre distintos blancos moleculares. El cazar presas implica un gasto de energía sumamente significativo para el caracol y por lo tanto tiene que

asegurarse que sea lo más exitoso posible, esto lo logra certificándose de que la cascada de señalización que se encarga de que el pez se mueva sea detenida no sólo en un paso sino en varios.

Por esta razón el veneno de los caracoles funciona utilizando grupos de péptidos que actúan de manera conjunta y sinérgica para lograr el mismo efecto fisiológico final: paralizar a la presa (Olivera y Cruz, 2001). A este grupo de péptidos se les conoce como cabales, palabra que proviene del hebreo y que significa sociedad secreta con un fin en común. Los tres cabales que se conocen son el "motor cabal", el "lightning-strike cabal" (algo que sería traducido como el golpe de un relámpago) y el "nirvana cabal".

Para poder entender cómo funcionan los cabales debemos de conocer en qué consiste la cascada de señalización necesaria para que un pez pueda moverse. Todo comienza con una señal eléctrica que viaja a través de una neurona y que al llegar al final del nervio provoca la despolarización de la membrana y por lo tanto la apertura de los canales de calcio que se encuentran al final de éste. La entrada de calcio ocasiona que se liberen vesículas de acetilcolina, la cual a su vez se unirá a sus respectivos receptores que se encuentran en el músculo. Esto provocará la apertura de los canales de sodio que continuarán la cascada de señalización hacia el músculo, teniendo como resultado final el movimiento del pez.

El "motor cabal" tiene la finalidad de provocar una inhibición total de las transmisiones neuromusculares. Está compuesto de  $\omega$ -conotoxinas (bloqueadoras de canales de calcio que se encuentran en las uniones presinápticas y que controlan la liberación de neurotransmisores), de  $\alpha$ -conotoxinas y  $\psi$ -conotoxinas (impiden la unión de la acetilcolina a sus receptores que se encuentran en las uniones postsinápticas) y de  $\mu$ -conotoxinas (bloqueadoras de canales de sodio que se encargan de la activación del potencial del músculo). En conjunto estas

conotoxinas interrumpen en distintos niveles la señal eléctrica que debe culminar en el movimiento del pez.

Esto puede ser visto como un coctel de fármacos que muchas veces es utilizado en el campo de la medicina para atacar a una enfermedad desde diferentes flancos. Ahora bien, si el caracol utilizara sólo este tipo de cabal, que provoca flacidez en el pez, le tomaría más de 30 segundos inmovilizar a su presa y sería sumamente probable que la perdiera en el intento. Esto es debido a que los péptidos que conforman al "motor cabal" actúan lejos del sitio de inyección (en uniones neuromusculares) y por lo tanto tardan en llegar a su blanco molecular.

Es por esta razón, que el caracol requiere de lo que se conoce como el "lightning-strike cabal", el cual actúa en cuestión de 1-2 segundos y provoca rigidez en su víctima de la siguiente manera: cuando la señal eléctrica se propaga a través del músculo lo hace abriendo canales que permiten la entrada de sodio y termina la señal mediante canales de potasio que provocan la salida de este ion. Cuando un pez es atacado por un caracol, la  $\delta$ -conotoxina se une a los canales de sodio y provoca su inactivación, mientras que al mismo tiempo la  $\kappa$ -conotoxina bloquea los canales de potasio. Esta combinación tiene como resultado una señalización interminable que provoca la despolarización de cualquier axón que se encuentre en la región inmediata del sitio de inyección provocando un efecto similar a lo que pasaría si el pez fuera electrocutado: una rigidez total del cuerpo (Terlau y Olivera, 2004). De esta manera el caracol utiliza el "lightning-strike cabal" para producir un estado tetánico (inmovilizar a su presa) y engullirla, mientras que el "motor cabal" actúa en dado caso de que el primer grupo de toxinas deje de tener efecto y el pez vuelva a moverse de nuevo.

Puede que hasta este punto exista lo que podría ser una contradicción: diferentes cabales de toxinas contienen péptidos que actúan en el mismo tipo de blanco pero a través de mecanismos que son diferentes y que podrían parecer en algunos

casos incompatibles. No obstante la solución evolutiva que permite que se pueda llevar a cabo esto es sorprendente: cada péptido está destinado a atacar un blanco molecular de manera sumamente selectiva, siendo capaz de diferenciar entre distintos subtipos de un mismo blanco molecular. Hablaremos más a detalle de esto en la sección II.8

Estos tipos de cabaes que hemos mencionado son utilizados por aquéllos *Conus* que se alimentan de peces y utilizan lo que se denomina como “hook and line hunting” (Figura 8), los cuales son los que han sido estudiados con mayor detenimiento. No obstante existen otro tipo de *Conus* que también se alimentan de peces (como es el caso de *Conus geographus*) que utilizan su boca como si fuera una red (“net hunting”) y no es hasta que tienen a su presa en la boca cuando inyectan el veneno. Para este último tipo de caracoles es necesario el “nirvana cabal” el cual actúa como un sedante para los peces y los deja en un estado de completa relajación, permitiéndole al caracol engullirlos con facilidad para finalmente utilizar el “motor cabal”. Los componentes del “nirvana cabal” son bloqueadores de los receptores de serotonina ( $\sigma$ -conotoxina), péptidos que provocan aletargamiento (Contulacina-G) y péptidos que funcionan como somníferos (Conantocina).

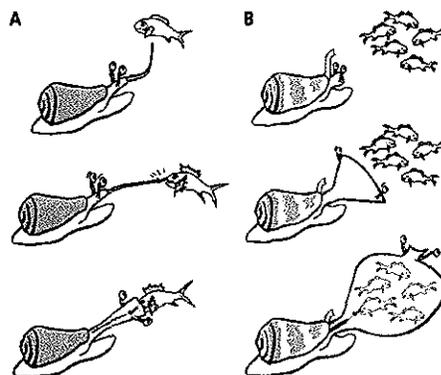


Figura 8. Caricatura que representa las dos distintas maneras de cazar que pueden tener los *Conus* que se alimentan de peces, el “hook and lining” (A) y el “net hunting” (B) (Olivera, 2002).

La presencia de los cabales nos demuestra que en cierta manera los cónidos son especialistas en neurofarmacología; sus venenos son, en esencia, mezclas de fármacos sumamente potentes y selectivos que se han ido perfeccionando gracias a la selección natural para obtener un efecto sumamente poderoso (Olivera, 2002). En la introducción mencionamos que esto los convierte en una herramienta sumamente útil en la industria biotecnológica ya que pueden ser utilizados en aplicaciones médicas y de investigación. Esto es debido a que muchas enfermedades que tienen gran importancia dentro de la sociedad moderna, como lo son el cáncer o el Alzheimer, están asociadas a la deficiencia de blancos moleculares que podrían estar regulados o mejor estudiados si utilizamos conotoxinas.

## **II.8 Las conotoxinas como fármacos.**

Como se ha venido mencionando, las conotoxinas han sido estudiadas como posibles fármacos debido a que tienen un tamaño pequeño, tienen una síntesis relativamente sencilla, son sumamente estables y se unen de manera específica a sus blancos moleculares (Lewis y García, 2003). El interés del estudio del veneno de los caracoles del género *Conus* surgió después de realizar un perfil cromatográfico del veneno de *Conus geographus* en donde se descubrió que éste no sólo es una mezcla de toxinas paralizantes sino que está conformado por péptidos muchísimo más complejos.

Un ejemplo que demuestra el uso potencial de conotoxinas como medicinas es el hecho de que actualmente existe en el mercado, con la aprobación de la FDA (United States Food and Drug Administration) el fármaco Prialt® (o de nombre genérico Ziconitide) desarrollado por la Farmacéutica Elan. Éste fármaco es idéntico a una  $\omega$ -conotoxina del caracol *Conus magus* y sirve para combatir el dolor que ya no puede ser mitigado con morfina (Terlau y Olivera, 2004).

---

Para poder entender cómo funciona éste fármaco, debemos de explicar primero cuál es su papel dentro del veneno de este caracol. Como se mencionó anteriormente, para que un pez pueda moverse requiere de una cascada de señalización que comienza con una señal eléctrica que provocará la apertura de determinados canales de calcio y culminará con el movimiento del pez. Cuando el caracol inyecta su veneno, la  $\omega$ -conotoxina (Prialt®) bloquea estos canales de calcio (subtipo 2.2) que se encuentran al final del nervio y por lo tanto interrumpe la señal eléctrica desde un principio, ocasionando que el pez se paralice.

No obstante Prialt® puede ser inyectado en un humano sin ocasionar el mismo resultado. Esto es debido a que en los humanos los canales de calcio que se encuentran en la sinapsis neuromuscular son los del subtipo 2.1 y no 2.2, como en los peces; el canal de calcio 2.1 es resistente a éste fármaco incluso a muy altas concentraciones. Ahora bien, los canales de calcio 2.2 sí están presentes en los humanos, sólo que se encuentran en la ruta del dolor, en específico en la médula espinal. Cuando Prialt® es suministrado en el paciente ocasiona que se interrumpa la señal eléctrica que tiene que pasar de la fibra del dolor a la célula nerviosa que a su vez manda la señal al cerebro; por lo que a pesar de que la señal para sentir dolor está presente, es incapaz de sentirse porque es bloqueada antes de llegar a su destino (Figura 9).

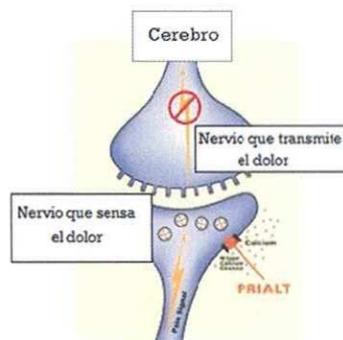


Figura 9. Muestra la manera en que Prialt® bloquea la señalización <http://www.spacecoasTfedicine.com/2009/11/cone-snail-venom-effective-remedy-for-pain.html>

La razón por la que este conopéptido produce parálisis en peces y alivia el dolor en mamíferos es debido a que es sumamente específico para un determinado canal de calcio y por lo tanto puede ser suministrado sin provocar el mismo efecto.

Prialt® no es el único caso en el que una  $\omega$ -conotoxina ha tenido un efecto terapéutico. La  $\omega$ -conotoxina CVID perteneciente al *Conus catus* (Figura 10) está siendo investigada como un agente analgésico. Tiene la designación farmacéutica AM336 y está siendo desarrollado clínicamente por Amrad, una compañía farmacéutica Australiana.

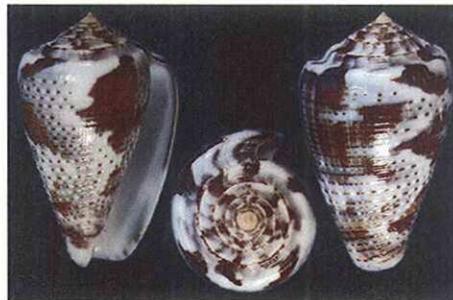


Figura 10. Fotografía de *Conus catus*, caracol del cual se extrae la  $\omega$ -conotoxina CVID. [http://www.coneshell.net/pages/c\\_catus.hTf](http://www.coneshell.net/pages/c_catus.hTf)

Debemos de tomar en cuenta que el potencial analgésico de las  $\omega$ -conotoxinas presenta dos aspectos científicos importantes. La primera, que se ha mencionado anteriormente, es que en la médula espinal de mamíferos las sinapsis encargadas de causar las señales de dolor son sumamente sensibles a ser bloqueadas por estas toxinas. La segunda es que, a diferencia de los opiáceos que son antagonistas de los receptores acoplados a proteínas G, estos péptidos son antagonistas de canales de iones dependientes de voltaje. Esto permite que las  $\omega$ -conotoxinas no presenten los mismos problemas que los opiáceos, que al ser administrados por un largo periodo provocan que el paciente se vuelva tolerante al fármaco y por lo tanto dejen de ser efectivos (Terlau y Olivera, 2004).

Sin embargo, no sólo las conotoxinas han sido desarrolladas como fármacos, los conopéptidos que son pobres en enlaces disulfuro también han presentado resultados alentadores. La conantocina-G, que tiene como blanco molecular los receptores de NMDA, y contulacina G, agonista del receptor de neurotensina, son péptidos aislados de *Conus geographus* y que ha sido desarrollados para tratar la epilepsia y el dolor, respectivamente. Ambos péptidos se encuentran en ensayos clínicos en la fase I de humanos (Craig *et al*, 1999 citado en Terlau y Olivera, 2004)

## **II.9 *Conus regularis***

Ha sido poco lo que se ha estudiado de esta especie, y por lo tanto, es poca la información que se tiene de ella. La forma más común de *Conus (LeptoConus) regularis* (Figura 11) es una concha alargada y delgada, con una espiral poco pronunciada, de color de fondo blanco marfil y con manchas rectangulares en espiral color café. En promedio mide de largo 59 mm y tiene un diámetro de 32 mm; habita en el intermareal, en profundidades de 5 a 90 m. Se encuentra distribuido en Bahía Magdalena, Baja California, y se puede encontrar a lo largo de todo el Golfo de California, y sobre la costa del Pacífico, hasta llegar a Panamá.

Como se mencionó, la información que existe en la literatura es mínima, por lo que fue necesario utilizar las observaciones que el trabajo de campo nos pudiera ofrecer. Nos dimos cuenta que *Conus regularis* habita en las mismas profundidades que otro cónido de la misma región, *Conus ximenes*. No obstante *Conus regularis* habita tan solo en zonas lodosas, mientras que *C. ximenes* se limita a las áreas arenosas; además de que este último se encuentra en una mayor proporción que *C. regularis*. El hecho de que habite en zonas lodosas nos permite inferir que su alimentación está basada en gusanos, no obstante esto es un hecho que se aún no se ha comprobado.

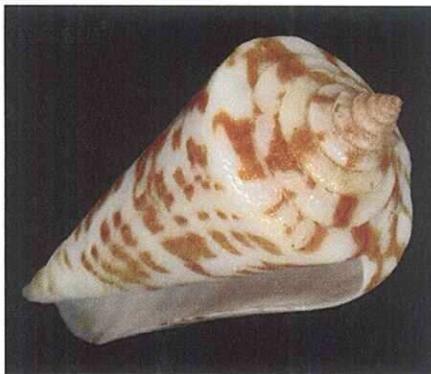


Figura 11. Fotografía de una concha perteneciente a *Conus regularis*.

[http://www.coneshell.net/pages/g\\_regularis2317.hTf](http://www.coneshell.net/pages/g_regularis2317.hTf)

En trabajos realizados por el equipo del Laboratorio de Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), en específico en la tesis de maestría de Oscar Martínez Galván, se ha trabajado con el veneno de *C. regularis*. En esta tesis se realizó una caracterización bioquímica de los componentes mayoritarios del veneno de este caracol. El veneno se purificó utilizando HPLC y se obtuvo una secuencia parcial de una O-conotoxina con un posible blanco molecular sobre canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Cuando se realiza una extracción del veneno, como es en el caso de la tesis de Óscar Martínez, se lleva a cabo un fraccionamiento y purificación de éste que nos permite observar sus blancos moleculares. Sin embargo, a partir de fuentes naturales sólo pueden obtenerse conotoxinas en pequeñas cantidades que limitan su disponibilidad para la investigación; por lo tanto surge una necesidad de producir estos péptidos a mayor escala. Hasta la fecha no existe un estudio del veneno de *C. regularis* desde un punto de vista molecular. La secuenciación de los aminoácidos que componen a un determinado conopéptido puede descifrarse gracias a la deducción de su secuencia de ADN complementario (ADNc). Por lo tanto, si construimos una Biblioteca de ADNc del veneno de *C. regularis* podremos contar con un banco de datos de las conotoxinas de este caracol, que combinado

con la observación de los blancos moleculares sobre los que actúa el veneno, nos permitirá tener una información mucho más completa del potencial farmacológico que pueda tener.

---

### III. JUSTIFICACIÓN

---

El estudio del veneno de los caracoles del género *Conus* no sólo es importante en la industria farmacológica, sino que también es sumamente útil como herramienta a la hora de entender el funcionamiento de los organismos a nivel celular. No obstante, debido a que es imposible conocer en detalle las interacciones que existen entre una determinada especie de cónido y el ambiente que le rodea, el espectro farmacológico que un determinado veneno pueda presentar no puede ser conocido *a priori*.

Por lo tanto, el potencial que una determinada especie de *Conus* pueda tener dentro de la industria biotecnológica sólo se puede conocer al realizar un estudio exhaustivo de su veneno, el cual suele ser limitado.

Los caracoles marinos *Conus regularis*, pertenecientes al estado de Baja California, han sido poco estudiados con respecto a su veneno y a su biología en general; por lo tanto un estudio de las toxinas presentes en el veneno de estos caracoles nos permitirá determinar si estos animales son un recurso regional con potencial biotecnológico. Con la ayuda de este trabajo podremos dirigir nuestra búsqueda de una manera más precisa y acertada en el descubrimiento de nuevos blancos farmacológicos.

---

---

## IV. HIPÓTESIS

---

Con base a la interpretación de las observaciones obtenidas en el trabajo de campo, donde *Conus regularis* se limita a vivir en zonas lodosas, mientras que *C. ximenes* habita las zonas arenosas, se propone la siguiente hipótesis:

Los caracoles marinos *Conus regularis* producen toxinas similares a aquellas encontradas en los cónidos que se alimentan de gusanos poliquetos.

---

## V. OBJETIVO GENERAL

---

Realizar un estudio de los genes que codifican para el veneno del caracol *Conus regularis*, lo que permitirá predecir sus interacciones bióticas.

### V.1 Objetivos Particulares

1. Obtener una biblioteca de ADN complementario (ADNc) de las conotoxinas presentes en el veneno total de *Conus regularis*.
2. Realizar un análisis exhaustivo de las secuencias obtenidas; clasificando, si es posible, en las diferentes superfamilias que se conocen para el género *Conus*.

---

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### VI.1 Obtención de los especímenes.

Los caracoles marinos de la especie *Conus regularis* fueron colectados por un buzo, en base a las características morfológicas de la especie, en la zona intermareal de Bahía de los Ángeles (Figura 12) localizada al sur del estado de Baja California, 28° 55' 00.00" N y 113° 32' 00.00" O. Esta bahía se caracteriza por su gran productividad y riqueza biológica, y al ser un lugar apartado de grandes ciudades es idóneo para la colección de especímenes. A pesar de que no existe un estudio previo que nos indique una pauta sobre las tallas ideales para colectar organismos, se decidió empíricamente colectar únicamente caracoles que tuvieran una longitud alrededor de los 34 mm; esto para evitar capturar aquellos que no se hubieran reproducido y que además, al tener ductos muy pequeños, tuvieran que ser colectados en grandes cantidades para poder recabar el material necesario para el experimento. Los organismos fueron transportados vivos hasta Ensenada donde fueron aclimatados para después ser llevados al laboratorio, una vez ahí se limpiaron rápidamente con agua destilada con la finalidad de eliminar arena y especies ajenas a la colecta. Posteriormente fueron colocados de cinco en cinco en tubos tipo Falcon de 50 ml para después ser empaquetados en bolsas de plástico, etiquetados y colocados a -80°C.



Figura 12. Imagen satelital de la zona de colecta, Bahía de los Ángeles, marcada con una estrella.

## VI.2 Obtención de ductos para extracción de ARN de *Conus regularis*.

Los caracoles utilizados para realizar las dos extracciones de ARN de *C. regularis* fueron aquellos que corresponden a la que se denominó como Colecta IV, la cual llegó al laboratorio el 28 de Septiembre del 2010.

Para poder llevar a cabo la disección fue necesario centrifugar al organismo a 4°C, a 10, 000 rpm durante 15 minutos. Una vez extraído el organismo de su concha, debido a que el ARN se degrada fácilmente y por lo tanto el procedimiento es delicado, se llevó a cabo la disección (Figura 13) con mucho cuidado. Se limpió la superficie con RNase AWAY y se esterilizó todo el material que se iba a utilizar; conforme se iba disecando, cada ducto fue enjuagado con agua con DEPC y después colocado en 300 µl de RNA later®. Los tubos fueron dejados en solución a 4 °C durante toda la noche para después ser almacenados en la misma solución pero a -80 °C.



Figura 13. Disección de *Conus regularis*. Podemos observar, de arriba hacia abajo: la concha, el aparato venenoso y el cuerpo del organismo (Martínez, 2010).

### VI.3 Extracción del ARN del veneno.

EL ARN total del ducto venenoso se extrajo utilizando la técnica de aislamiento de TRIzol® Plus (Invitrogen). Esta técnica combina la propiedad que tiene el reactivo del TRIzol®, que provoca una lisis celular, con la eficiencia que tienen las columnas de centrifugación de sílice para retener el ARN total. Estas columnas de sílice pertenecen al mini kit de Purificación de ARN total utilizado: PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen). Durante todo el tiempo en el que se trabajó con ARN se utilizó un área designada únicamente para ello, se mantuvieron las pipetas sumamente limpias con RNase AWAY y se utilizaron puntas y tubos libres de ARNasas. Los guantes se cambiaron constantemente, sobre todo conforme se iba avanzando de un extracto crudo a un material más puro. El rotor del homogenizador fue limpiado con los siguientes reactivos en el orden en que son mencionados: NaOH 0.2 M, etanol al 100% y agua destilada. El protocolo se divide en dos partes: 1) Separación de Fases y 2) Unión, lavado y elución.

### VI.3.1 SEPARACIÓN DE FASES

Para poder empezar fue necesario juntar todos los ductos y pesarlos en una balanza analítica. Por cada 50-100 mg de tejido se añadió 1 ml de reactivo TRIzol<sup>®</sup> para después homogenizar con el rotor y dejar incubar durante 5 minutos, permitiendo así que se dissociaran completamente los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente se añadió 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol<sup>®</sup> utilizado, el tubo se agitó vigorosamente con la mano durante 15 segundos, se dejó reposar por 3 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

La adición de cloroformo a la muestra, seguida de la centrifugación nos permite separar la solución en una fase acuosa superior que contiene al ARN y una fase orgánica inferior que contiene al fenol (Figura 14). La fase superior (transparente) se transfirió a un tubo nuevo, midiendo siempre cuánto volumen existía (se sabe que es alrededor de 400  $\mu$ l). A continuación se añadió el mismo volumen de etanol al 70% y se mezcló mediante vortex, invirtiendo posteriormente el tubo para dispersar cualquier precipitado que se hubiera podido formar.

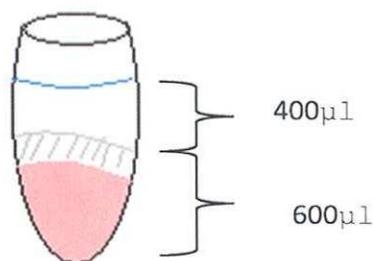


Figura 14. Esquema de cómo queda el tubo después de añadir el cloroformo y ser centrifugado.

### VI.3.2 UNIÓN, LAVADO Y ELUCIÓN

Se transfirieron 700  $\mu$ l de la muestra anterior a un cartucho de centrifugado con su correspondiente tubo de colecta (Figura 15). Estos cartuchos vienen incluidos en

el mini kit y contienen una membrana transparente de sílice que retiene el ARN total de la muestra. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el fluido que pasó a través de la membrana y que ya no es de nuestro interés. Se volvió a repetir todo el procedimiento hasta que la muestra completa pasó a través de la membrana de sílice. Posteriormente se añadieron 700  $\mu$ l de Buffer de Lavado I al cartucho de centrifugado y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Se descartó tanto el fluido como el tubo de colecta y se colocó al cartucho de centrifugado en un tubo de colecta nuevo.



Figura 15. Muestra un tubo de colecta, un cartucho de centrifugado con una membrana de sílice y el mismo cartucho de centrifugado con membrana dentro de su correspondiente tubo de colecta.

Se añadieron 500  $\mu$ l de Buffer de Lavado II al cartucho de centrifugado y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se descartó el líquido y se reinsertó el cartucho de centrifugado en el mismo tubo de colecta. Se volvió a añadir la misma cantidad de Buffer II y se repitió el procedimiento. A continuación se centrifugó el cartucho de centrifugado en el tubo de colecta a 12, 000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente para de esta manera secar la membrana que contiene al ARN total adherido a ella. Se descartó el tubo de colecta y se insertó el cartucho de centrifugado en un tubo de recuperación. Finalmente se realizó la elución del ARN total, en ambas extracciones se utilizaron dos cantidades de 50  $\mu$ l de agua libre de ARNasas.

Una vez llevada a cabo la elución se incubó por 1 minuto y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente, finalmente se almacenó el ARN a -80

°C. Para poder darnos una idea de la calidad del ARN total que extrajimos fue necesario medir la densidad óptica (DO) con la ayuda de un espectrofotómetro de la marca Biotek. Este equipo requiere únicamente 2 µl de la muestra y 2 µl de un blanco con el cual compararla, el cual suele ser agua libre de ARNasas. El espectrofotómetro mide las longitudes de onda a 260 y 280 nm y con ayuda de un software calcula la razón que existe al dividir los resultados de 260 entre los de 280 nm; posteriormente, dependiendo del tipo de muestra con el que se esté trabajando, ADNcd, ADNcs o ARN, multiplicará este resultado por 40, 37 o 33 respectivamente, lo que nos dará los resultados en concentraciones de ng/µl. Además se corrió un gel de agarosa al 1% que, a pesar de no ser específico para ARN, nos ayudó a darnos una idea de qué era lo que teníamos al final del procedimiento.

## **VI. 4 Creación de la 1er Biblioteca de ADNc de *Conus regularis*.**

### **VI.4.1 CREACIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA.**

Si se quiere construir una biblioteca de ADNc lo primero que se tiene que hacer es pasar de ARN a ADN de cadena sencilla (ADNcs). Para la creación de ADNcs se utilizó el kit de Construcción de Bibliotecas de ADNc dirigido In-Fusion® SMARTer<sup>TF</sup> de Clontech, el cual es un método robusto que requiere poca cantidad de ARN y que nos permite obtener ADNc de alta calidad y de tamaño completo.

La función de la transcriptasa reversa (TR) es pasar de ARN a ADNcs. No obstante la TR no siempre es capaz de transcribir un ARN mensajero (ARNm) completo y muchas veces el extremo 5' de los genes queda sesgado en las poblaciones de ADNc, sobre todo en ARNm que son muy largos. La síntesis de ADNc SMART (Switching Mechanism At 5' end of ARN Template), consiste en incorporar dos adaptadores sintéticos tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' del ADNc durante la síntesis de la primera cadena en una sola reacción de la TR (Figura 16). En este protocolo un primer oligo (dT) modificado (3'In-Fusion

SMARTer CDS Primer) inicia la síntesis de la primera cadena de ADNc, mientras que el oligo SMARTer V sirve como un templado corto en el extremo 5' del ARNm. Cuando la TR llega al extremo 5', la actividad transferasa de la enzima terminal añade unos cuantos nucleótidos (en la Figura 16 representados como XXX) al extremo 3' del ADNc. El oligo SMARTer V aparea sus bases con estos nucleótidos adicionales creando un templado extendido, de esta manera la TR cambia de templado y continúa replicando hacia el final del oligonucleótido. El ADNc resultante contiene un extremo 5' completo, así como una secuencia complementaria al oligo SMARTer que sirve como un sitio de inicio universal en las subsecuentes amplificaciones mediante PCR. Sólo aquellos ADNc que tengan la secuencia SMART en el extremo 5', y que por lo tanto estén completos, podrán servir como templados y podrán ser exponencialmente amplificados.

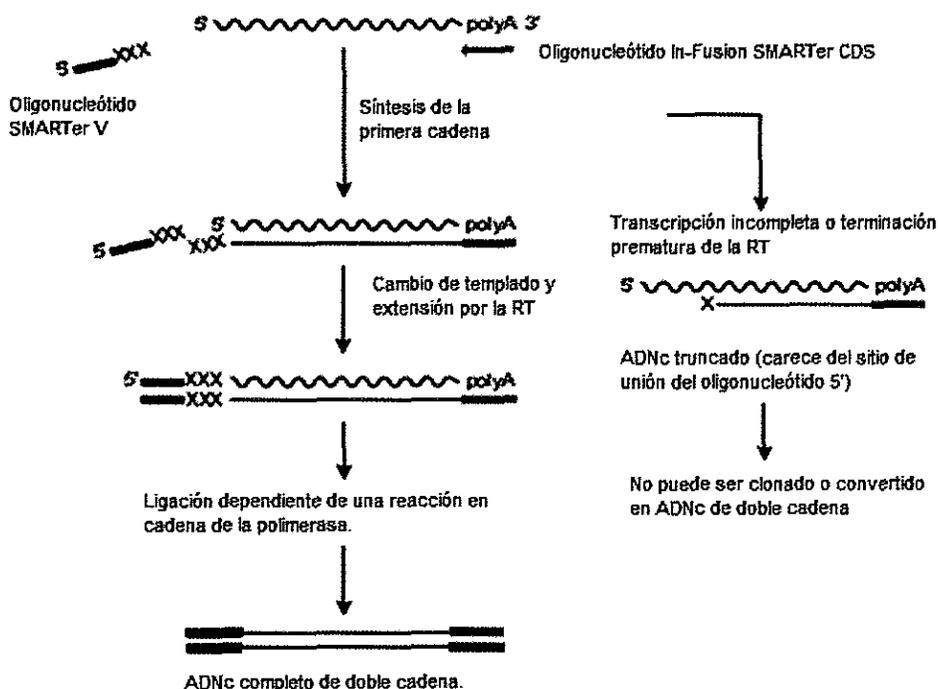


Figura 16. Esquema de cómo se realiza la síntesis del ADN complementario, aquellos que no contienen a los cebadores SMART no podrán ser convertidos a ADN de doble cadena (Modificado de Manual de Usuario de Clontech).

El método consiste en el siguiente procedimiento:

Se combinaron 3.5 µl de ARN con 1 µl del cebador 3' SMART CDS Primer II A (12µM) que se muestra a continuación:

5' **-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT** (30) N-1N-3' en donde N= A, C, G o T; N-1= A, G o C.

Se mezclaron bien los dos componentes y después se incubaron a 72 °C en un termociclador por 3 minutos, para después reducir la temperatura a 42 °C por 2 minutos. Mientras se realizaba la incubación se preparó la "Mezcla Maestra" (ver anexo) y una vez terminada la incubación se añadieron 5.5 µl de esta mezcla al tubo de reacción, asegurándose de que estuvieran bien mezclados. Posteriormente los tubos se incubaron a 42 °C por 90 minutos, seguidos de 10 minutos a 68 °C para terminar la síntesis de la primera cadena de ADNc.

#### **VI.4.2 CREACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN DE CADENA DOBLE MEDIANTE PCR.**

Para crear el ADN de cadena doble (ADNcd) se combinaron los siguientes reactivos: 2 µl de ADNcs, 80 µl de agua desionizada, 10 µl de Buffer Advantage 2PCR 10x, 2 µl de mezcla de dNTP 50X (10 mM), 2 µl de Primer II A PCR 5' (12 µM) y 2 µl de mezcla de polimerasa 50X.

Se programó el termociclador de la siguiente manera:

1. 95°C por 1 minuto
2. 95 °C por 15 segundos
3. 65 °C por 30 segundos
4. 68°C por 6 minutos
5. Regresar al paso 2 por 30 veces
6. 68 °C por 10 minutos

La creación de ADNcd se realizó por triplicado para de esta manera contar con el suficiente material para crear la biblioteca. Una vez sintetizada la doble cadena, fue necesario juntar los productos del PCR, para esto se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se añadieron 5 volúmenes de Buffer PB (Binding buffer), seguidos de 10  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, se mezcló mediante vórtice y se centrifugó brevemente en una microcentrífuga. Posteriormente se pasó el volumen a un cartucho de centrifugado con una membrana específica para ADN y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió con los otros dos tubos que contenían al ADN de doble cadena, siempre utilizando la misma membrana. A continuación se lavó la membrana con 0.5 ml de Buffer PB y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, posteriormente se lavó con 0.75 ml de Buffer PE (Wash Buffer) y se centrifugó de la misma manera. Finalmente se centrifugó por 2 minutos para secar completamente la membrana y después llevar a cabo la elución de ADN con 80  $\mu$ l de Buffer EB (Elution Buffer). Se midió la concentración de ADN en la muestra y se corrió un gel para identificar la calidad del ADN.

#### **VI.4.3 FRACCIONAMIENTO DEL ADNc.**

Para estar completamente seguros de que el ADNc obtenido es del tamaño deseado y deshacernos de productos contaminantes que puedan reducir la calidad de nuestra biblioteca, se llevó a cabo un fraccionamiento que nos permitiera quedarnos únicamente con ADNc de gran tamaño. Para esto se utilizó una columna con una resina que permitiera el paso de moléculas grandes y atraparara aquellas moléculas cuyo tamaño no nos interesa. No obstante debemos de tomar en cuenta que el fraccionamiento por columna sólo nos permite deshacernos de nucleótidos y pequeños cebadores que pudieran existir, pero no nos permite hacer una diferenciación exacta de los distintos tamaños de ADNc que están en la muestra.

Se etiquetaron 16 tubos de 1.5 ml, se preparó una columna colocándola en un soporte universal y permitiendo que el buffer de almacenamiento se drenara completamente. El gel de la columna tenía que estar hasta la marca de 1 ml y el flujo debía de ser el correcto (gotas de 40  $\mu$ l cada 40-60s). Una vez que el buffer del almacenamiento dejaba de salir se añadían 700  $\mu$ l de buffer de columna y se dejaba que se drenara. Después de 15-20 min (una vez que este último buffer dejó de salir) se añadió cuidadosamente y de manera homogénea la muestra que contenía el producto final de los PCR con 2  $\mu$ l de xileno cianol; además se enjuagó el tubo que contenía al ADN con 100  $\mu$ l de buffer de columna y se agregó a la columna. Se dejó que el buffer saliera de la columna y por lo tanto que el colorante avanzara y se colocó el primero de los 16 tubos debajo de la columna. A continuación se añadieron 600  $\mu$ l de buffer de columna y se comenzó a coleccionar cada gota en cada tubo. Posteriormente se preparó un gel de agarosa al 1.1% y se corrieron 3  $\mu$ l de cada tubo con 2  $\mu$ l de colorante en cada pozo. Se colocó una escalera de ADN en medio de los pozos y colorante en los extremos, se detuvo la corrida cuando el colorante había migrado 2 cm. Este gel nos permitió observar las fracciones que contenían al ADNc de interés.

Se juntaron las fracciones que nos interesaban, se añadieron 1/10 volúmenes de acetato de sodio (3M), 1.3  $\mu$ l de glucógeno (20 mg/ml) y 2.5 volúmenes de etanol al 95% a -20°C. Se mezcló bien y se dejó reposar a -20 °C toda la noche. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente y con mucho cuidado se removió el sobrenadante, se centrifugó el tubo brevemente y se eliminó el líquido restante para después dejar secar por 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 10  $\mu$ l de agua desionizada y se mezcló cuidadosamente.

## VI.4.4 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE LA 1er BIBLIOTECA DE ADNc.

### VI.4.4.1 CLONACIÓN

El vector utilizado para ligar a nuestro ADNc es el que venía con el kit de Construcción de Bibliotecas In-Fusion® SMARTer<sup>TF</sup> de Clontech: el vector linearizado pSMART2IF (Figura 17). Este vector es una versión modificada del vector pUC19 ya que sus extremos rasurados contienen secuencias de 15 pares de bases que son complementarias a los extremos del ADNc generado, lo que permite que puedan ligarse fácilmente. El vector le confiere a la bacteria de *Escherichia coli* resistencia a la ampicilina por lo que después de realizar la transformación podemos quedarnos únicamente con aquellas bacterias que hayan incorporado el vector. Además el vector pSMART2IF está diseñado para que el ADNc se ligue de tal manera que interrumpa al gen que codifica para *LacZα*, que como veremos más adelante es importante a la hora de determinar cuáles bacterias contienen al inserto.

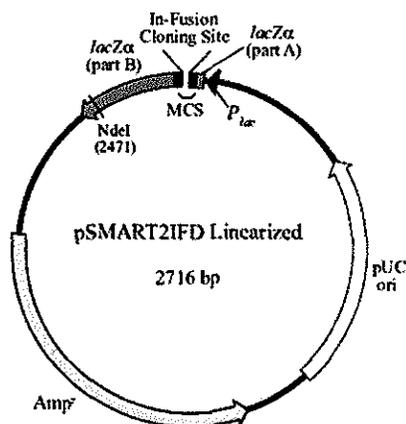


Figura 17. Mapa del vector linearizado pSMART2IF. Las regiones coloreadas de negro corresponden a la secuencia de 15 pares de base que son complementarias al extremo 5' del cebador SMARTer II A. El sitio de clonación se encuentra de tal manera que interrumpe al gen de *LacZα*, que codifica para el fragmento N-terminal de β-galactosidasa, cuya expresión está dirigida por el promotor *lac* (*Plac*). Se muestra el origen de replicación pUC y la región que confiere resistencia a la ampicilina Amp<sup>r</sup>. Tomado del manual de Clontech.

Se llevaron a cabo dos reacciones de clonación separadas con distintas concentraciones de ADN (además de un control negativo) para poder determinar la razón óptima ADNc-vector (Ver Tabla I).

Se mezclaron los contenidos de acuerdo a la Tabla I y se centrifugaron brevemente en una microcentrífuga. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 15 minutos, para incrementar la temperatura a 50 °C por 15 minutos y finalizar la reacción en hielo. Una vez finalizada la reacción se hizo una limpieza rápida de la enzima con una resina. Para esto se añadieron a cada uno de los tubos 90 µl de Buffer TE (Buffer Tris-EDTA) y 10 µl de Resina QuickClean. Se utilizó vortex por un minuto, se centrifugó y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos. Posteriormente se añadió 1.5 µl de glucógeno y 280 µl de etanol al 100%. Se mezcló bien y se dejó incubar por 2 horas a -70 °C. Finalmente se centrifugó durante 20 minutos a 15,000 rpm y con mucho cuidado se retiró el etanol teniendo cuidado de no tocar el pellet. Se dejó secar por 10 minutos y finalmente se suspendió cada uno de los pellets con 10 µl de agua estéril.

Tabla I. Guía de cómo preparar las reacciones para llevar a cabo la clonación

Reactivos	Tubo A	Tubo B	Control Negativo
Buffer In-Fusion 5X	2 µl	2 µl	2 µl
Vector linearizado pSMART2IF (150 ng/µl)	2 µl	2 µl	--
ADNc SMARTer	4 µl	5 µl	5 µl
Enzima In-Fusion	1 µl	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O destilada, desionizada	2 µl	1 µl	--
Volumen total	10 µl	10 µl	10 µl

#### VI.4.4.2 TRANSFORMACIÓN

Antes de llevar a cabo la transformación es necesario preparar cajas con agar y medio LB con ampicilina de concentración 100 µg/ml, con 100 µl de IPTG (1 mM)

y con 40  $\mu$ l de X-Gal (75  $\mu$ g/ml). La ampicilina nos permite crecer únicamente las células de *E. coli* que contengan al vector ya que éste les confiere resistencia a este antibiótico en particular. Por otro lado la  $\beta$ -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, es una enzima que se compone de 2 subunidades: una codificada por el vector (LacZ $\alpha$ ) y la otra es codificada por el cromosoma (LacZ $\Omega$ ). Esta enzima, que le permite a la bacteria de *E. coli* hidrolizar  $\beta$ -galactosidasa en monosacáridos, sólo podrá ser funcional si las dos subunidades están presentes. Al insertar el ADNc en el vector se realiza de tal manera que interrumpa al gen que codifica para LacZ $\alpha$ .

El X-gal que se coloca en las cajas es degradada por la  $\beta$ -galactosidasa (inducida por el IPTG) dando como resultado galactosa y 5-bromo-4-cloro hidroxindol, éste último será oxidado en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo (un producto de color azul insoluble). De esta manera es sumamente fácil distinguir aquellas colonias que no han sido transformadas correctamente porque sus vectores no contienen la secuencia de interés y por lo tanto tienen un gen *lacZ* totalmente funcional (serán de color azul), de aquellas colonias cuya  $\beta$ -galactosidasa no tiene las dos subunidades y que por lo tanto han tenido una transformación exitosa (serán de color blanco).

Para transformar las bacterias de *Escherichia coli* se llevó a cabo lo siguiente: se descongelaron en hielo células electrocompetentes cuya eficiencia era mayor a  $4 \times 10^9$  ufc/ $\mu$ g de ADN. Estas células se utilizaron inmediatamente después de descongelarlas para aumentar la eficiencia de la electroporación. Posteriormente se pipetearon 25  $\mu$ l de estas células en tubos de 1.5 ml previamente enfriados. A cada uno de los tubos se agregó 5  $\mu$ l de la reacción correspondiente preparada en la clonación (Ver Tabla II) y después se transfirió cada mezcla en cubetas de 0.1 cm previamente enfriadas. A continuación se electroporó mediante una descarga eléctrica, retirando inmediatamente las cubetas del electroporador. Posteriormente se agregaron 970  $\mu$ l de medio LB a cada una de las cubetas y se transfirió el

volumen total a tubos de propileno etiquetados como A, B y negativo. Se incubaron con agitación (225 rpm) por una hora a 37 °C. Finalmente se sembraron 150 µl de cada uno de los tubos en las cajas preparadas anteriormente, se dejaron crecer las colonias por 12 horas y se hizo una selección de aquellas colonias que eran blancas.

#### **VI.4.5 VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INSERTO EN LAS COLONIAS.**

Una vez obtenidas las colonias, es necesario verificar que estas contienen el plásmido del tamaño deseado. Para esto se realizó una reacción de PCR con 50 colonias. Se utilizó la siguiente mezcla de reactivos:

- Buffer Advantage 2PCR: 50 µl
- dNTP (10 mM): 10 µl
- Oligonucleótido Sentido (5 µM): 25 µl
- Oligonucleótido Antisentido (5 µM): 25 µl
- Enzima Advantage: 10 µl
- H<sub>2</sub>O: 380 µl
- Volumen total: 500 µl

Estos oligonucleótidos sentido y antisentido están provistos por el kit y tienen su secuencia de reconocimiento en el vector. Se enumeraron los tubos de PCR y se colocaron 10 µl de la muestra en cada uno de ellos. Posteriormente con una punta de 10 µl estéril se tomó una de las colonias y se mezcló en la solución, después, con la misma punta, se transfirió a una caja petri de agar nueva, empleando una rejilla numerada que nos permitiría posteriormente identificar a la colonia. Se utilizó el siguiente programa para la reacción de PCR:

1. 95 °C por 3 minutos
  2. 95 °C por 30 segundos
  3. 60 °C por 30 segundos
  4. 68 °C por 3 minutos
-

5. Ir al paso 2 por 38 veces
6. 68 °C por 10 minutos

Después de haber terminado la reacción de PCR se agregó a cada tubo 1 µl de colorante 10X y se corrieron en un gel de agarosa al 1%, al mismo tiempo que una escalera de ADN 2log. El gel se corrió por 45 minutos a 100 Volts. Se escogieron aquellos insertos que eran mayores a 500 pb, esto en base al tamaño del vector y al tamaño que las toxinas que el género *Conus* suelen tener (un mínimo de 250 pb).

#### **VI.4.6 CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS Y EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO.**

Se pipetearon 4 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/µl) en tubos Falcon de 14 ml y se inocularon con la colonia deseada, para después dejar incubar 12 horas a 250 rpm a 37 °C. Después de la incubación los tubos se centrifugaron por 20 minutos a 4 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y se colocó en hielo para poder extraer el plásmido con el kit Miniprep QIAprep®.

Este kit consiste en el siguiente procedimiento. El pellet se resuspende en 250 µl buffer P1 (siempre manteniendo el buffer en hielo) que permite estabilizar a las bacterias y agrega el indicador que cambiará de color a azul al agregar el siguiente buffer. Posteriormente, cada pellet se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregan 250 µl de buffer P2 el cual provoca la lisis celular y por lo tanto la salida de todos los componentes. En este punto se mezcla con muchísimo cuidado ya que el ADN genómico podría romperse fácilmente. A continuación se agregan 350 µl de Buffer N3 y se mezcla suavemente hasta que la mezcla adquiere una tonalidad blanca. Se centrifuga a temperatura ambiente por 10 minutos a 13, 000 rpm. Una vez finalizado este paso, con mucho cuidado se pasa el sobrenadante a un cartucho con membrana y se centrifuga en las mismas condiciones por un minuto. Después se descarta el líquido y se agrega a cada

membrana 0.5 ml de Buffer PB y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores, éste buffer bloquea la actividad de las nucleasas que pudieran quedar. Se vuelve a descartar el líquido y se agregan 0.75 ml de Buffer PE para centrifugar de la misma manera. Posteriormente el cartucho vacío se centrifuga durante 2 minutos a 13, 000 rpm a temperatura ambiente, después se colocan 40 µl de Buffer EB, se deja reposar durante 2 minutos y finalmente se centrifuga de la misma manera.

#### **VI.4.7 SECUENCIACIÓN**

Una vez obtenido el plásmido, se obtuvo la concentración de ADN en cada uno de los tubos obtenidos y se trabajó únicamente con aquellos cuya concentración era mayor a 80 ng/µl. Para enviar a secuenciar es necesario utilizar alrededor de 1200 ng de ADN, por esta razón se dividió 1200 entre la concentración de cada plásmido, obteniendo así la cantidad de microlitros requeridos.. A cada tubo con ADN se le añadió 2 µl de cebadores 5 µM (ya sea sentido o antisentido) y, en caso de ser necesario, se completó con agua libre de ARNasas para obtener un volumen total de 12 µl. Se mandaron a secuenciar un total de 24 clonas, 12 con cebadores antisentido y 12 con cebadores sentido.

Para analizar las clonas se realizó lo siguiente:

1. Primero se revisó que existía un inserto en la secuencia y que no era únicamente el plásmido.
2. Se tomó la secuencia de nucleótidos y se utilizó BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar si existía algo similar en esta base de datos.
3. Posteriormente con ayuda de Expasy (<http://expasy.org/tools/ADN.html>) se tradujo la secuencia a aminoácidos.
4. Esta secuencia de aminoácidos se volvió a comparar con la base de datos de BLAST.

5. Con ayuda de la siguiente página: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/> se verificó si esta secuencia tenía una secuencia señal y por lo tanto si era una proteína secretada por la célula.

## **VI. 5 Creación de la 2da biblioteca de ADNc.**

Para poder descartar errores se decidió realizar una segunda biblioteca, bajo las mismas condiciones que la anterior, sólo con las siguientes variantes:

- ✓ En lugar de utilizar una concentración de ARN de 159 ng/μl (perteneciente a la 1era extracción) se utilizó una concentración de 986 ng/μl (perteneciente a la 2da extracción).
- ✓ Para la síntesis de la cadena sencilla se realizaron dos reacciones de 100 μl cada una y por lo tanto se utilizaron dos columnas para realizar el fraccionamiento.
- ✓ Para la clonación se utilizaron 3 volúmenes de ADN: 3 μl (Volumen A), 4 μl (Volumen B) y 5 μl (Volumen C).

## **VI. 6 Creación de la 3era biblioteca de ADNc.**

La 3era biblioteca de *Conus regularis* se realizó de manera sumamente similar a las dos anteriores, con las siguientes variantes:

- ✓ Al mismo tiempo que se realizaba la biblioteca para *C. regularis* se decidió correr un control con ARN de hígado de ratón.
  - ✓ Para llevar a cabo la clonación se utilizó un protocolo distinto. En lugar de utilizar el kit SMARTer se utilizó el kit In-Fusion® HD cloning. Para este tipo de clonación se requiere 50-200 ng de vector e inserto. El vector que se utilizó es el mismo que en las bibliotecas pasadas. Los reactivos se muestran en la Tabla II. Una vez mezclados los reactivos que se muestran en la tabla se incubó la reacción por 15 minutos a 50 °C para después colocar en hielo.
-

Tabla II. Componentes a añadir para llevar a cabo la clonación.

Componente	Reacción de Clonación	Control negativo	Control positivo (hígado de ratón)
Fragmento purificado	10-200 ng	--	10-2200 ng
Vector Linearizado	50-200 ng	1 µl	50-200 ng
Premix de Enzima HD In-Fusion 5X	2 µl	2 µl	2 µl
Agua desionizada	Completar a 10 µl	Completar a 10 µl	Completar a 10 µl

- ✓ Después de llevar a cabo la transformación volvimos a obtener pocos resultados. Por lo tanto se decidió cambiar la manera de transformar las células de *E. coli* ya que se sospechó que era la transformación la que no estaba funcionando. Para esto se utilizaron células de *E. coli* químicamente competentes (Stellar cells) que se descongelan en un baño de hielo. Se colocan 50 µl de estas células en tubos de 1.5 ml previamente enfriados y etiquetados como 1, 1:5, 1:10 y ratón. De la mezcla de la clonación se añadió 2 µl en los tubos 1 y ratón. Del resto se añadieron también 2 µl de la clonación de *C. regularis* en una dilución 1:5 y 2 µl de una dilución 1:10. Posteriormente los tubos se incuban en hielo por 30 minutos, después se dio un choque de calor por 60 segundos a 42 °C. A continuación se agregó medio SOC (precalentado a 37 °C) para obtener un volumen final de 0.5 ml. Se sembraron 200 µl de cada una de las transformaciones en cajas de agar con X-Gal e IPTG.
- ✓ La verificación del inserto se realizó de la misma manera en que se había estado haciendo en las bibliotecas anteriores con la diferencia de que se analizaron en tandas de 96 bacterias.
- ✓ De la caja 1 se mandaron a secuenciar 53 clonas. De las cajas 2, 3, 4 y 9 se mandaron a secuenciar 59 clonas.

## VI. 7 Creación de la 4ta biblioteca de ADNc.

Se decidió realizar una nueva biblioteca utilizando sólo ARN poli A<sup>+</sup> en lugar de ARN total, esperando que esta vez se obtuvieran un mayor número de toxinas. Debido a que para poder crear ARN poli A<sup>+</sup> era necesario utilizar todo el ARN con el que contábamos, se consideró necesario crear antes de la biblioteca de poli A<sup>+</sup>, una última biblioteca con ARN total (4ta biblioteca).

El procedimiento fue sumamente similar al que se había utilizado con las bibliotecas anteriores, con las siguientes variantes:

- ✓ Se partió de ARN cuya concentración era de 986 ng/μl (2nda extracción, 1era elución).
  - ✓ Todos los reactivos que se utilizaron fueron preparados bajo una campana de flujo laminar.
  - ✓ Se optimizaron la cantidad de ciclos necesarios en la reacción de PCR para sintetizar la doble cadena. En lugar de utilizar 30 ciclos como en las veces anteriores, se utilizaron 25 ciclos. Para llevar a cabo la optimización se realizó lo siguiente: se crearon dos reacciones de 100 μl cada una y se realizaron 20 ciclos en total. De estos 200 μl se tomaron 30 μl y el resto se guardó a -20 °C. De los 30 μl se tomaron 5 μl y se guardaron aparte. Los 25 restantes se volvieron a colocar en el termociclador para correr 5 ciclos más, posteriormente se tomaron 5 μl y se dejaron aparte. Los 20 μl restantes se corrieron durante 5 ciclos más para obtener un total de 30 ciclos. Al final se corrió un gel con los microlitros correspondientes a los 20, 25 y 30 ciclos.
  - ✓ Para la clonación se tomaron 3, 4 y 5 μl de ADN etiquetados como tubos A, B y C. Además se corrió un control negativo.
  - ✓ Para esta biblioteca se siguió el protocolo del kit SMARTer hasta el paso de la clonación para después realizar la transformación en células de *E. coli* químicamente competentes (Stellar cells). La transformación se realizó con más de 50 ng de ADN.
-

## **VI. 8 Creación de la 5ta biblioteca de ADNc (utilizando ARNm)**

### **VI.8.1 CREACIÓN DE ARN MENSAJERO A PARTIR DE ARN TOTAL.**

Para obtener el ARN mensajero se utilizó el kit de purificación de ARNm MPG®. Este kit utiliza partículas magnéticas que tienen adheridas a ellas oligo (dT)<sub>25</sub> las cuales a su vez se adhieren a la colita poli A de los ARN mensajeros. El procedimiento consiste en lo siguiente: en primer lugar se resuspende el complejo Streptavidin MPG® y se transfiere la cantidad que se desea utilizar a un tubo de 1.5 ml libre de ARNasas, a continuación (con ayuda de un imán sumamente potente) se separan las partículas magnéticas y se retira el sobrenadante. Estas partículas se resuspenden con Buffer de unión y se deja listo para cuando vayan a utilizarse. Posteriormente se transfirió el ARN total a un tubo limpio y se completó el volumen a 350 µl con agua libre de nucleasas para después desnaturalizar las estructuras secundarias que pudieran existir en el ARN con un baño a 65 °C por 3 minutos. El ARN se transfiere al tubo con las partículas magnéticas, se incuba por 3 minutos y se retira el sobrenadante utilizando el imán. A continuación las partículas se resuspenden en un Buffer de lavado tres veces para finalmente resuspenderlas con un buffer de liberación a 65 °C por 2 minutos. El sobrenadante se separa con ayuda del imán y se transfiere a un tubo limpio libre de nucleasas. Este nuevo tubo contiene ahora a nuestro ARNm.

### **VI.8.2 CREACIÓN DE LA 5ta BIBLIOTECA.**

La construcción de esta biblioteca se llevó a cabo de la misma manera que las anteriores a excepción de las siguientes variables:

- ✓ Para la construcción de la doble cadena se utilizaron 28 ciclos en el PCR.
- ✓ Se utilizó otro tipo de columnas para hacer el fraccionamiento del ADN. En este tipo de columnas se coloca la muestra y se centrifugan, el líquido colectado en la centrifugación corresponde al ADN deseado.

- ✓ Para la clonación se utilizó el kit de HD cloning y para la transformación se utilizaron células de *E. coli* químicamente competentes.

## **VI.9 Creación de la 6ta biblioteca de ADNc (utilizando ARNm)**

Se decidió repetir el procedimiento, esta vez de la siguiente manera:

- ✓ La síntesis de la primera y de la segunda cadena se realizaron con el kit SMARTer. En lugar de 2, se realizaron 4 reacciones de 100 µl cada una para la síntesis de la segunda cadena. Los productos de estas reacciones se juntaron utilizando una columna de unión de ADN y el producto final fue fraccionado utilizando el mismo tipo de columnas que en las primeras bibliotecas.
- ✓ La clonación se llevó a cabo utilizando el kit HD Cloning y la transformación se realizó con células de *E. coli* químicamente competentes.

## **VI.10 Utilización de cebadores específicos para determinadas familias de toxinas**

### **VI.10.1 PRUEBA PREMILINAR**

Para poder continuar trabajando con el ARNm que teníamos, se utilizaron cebadores específicos para las siguientes familias: conantocinas, omega, mu y alfa. Estos cebadores se presentan a continuación con las secuencias sentido (S) y antisentido (A), con sus respectivas temperaturas de fusión (Tf) y el número de pares de bases que se obtienen como resultado de usar cada uno:

Conantocinas (Tf= 58° C, aproximadamente 430 pb)

S: 5' GCG ATG CAA CTG TAC ACG TAT CTG 3'

A: 5' AAT AAA CAT GAA AGA TTT GGG GAA 3'

Omega (Tf= 52 °C, aproximadamente 350-370 pb)

---

S: 5' ACC AAA ACC ATC ATC AAA ATG 3'  
A: 5' GCA ATG CGG CTT TTA TTT C 3'

Mu (Tf= 54 °C, aproximadamente 330 pb)

S: 5' CAA GAR GGA TCG ATA GCA GTT C 3'  
A: 5' ACT GCA ATC RTT TTA CTT ATT C 3'

Alfa (Tf= 64 °C, aproximadamente 210-225 pb)

S: 5' AAT AAC CAT GGG CAT GCG GAT G 3'  
A: 5' CTC GAG GTC GTG GTT CAG AGG 3'

Primero se realizó una prueba preliminar para determinar si al utilizar estos cebadores existía un producto. Se prepararon 8 reacciones de 10 µl cada una utilizando Advantage 2 PCR Buffer, dNTP 10 mM, agua, Enzima Advantage y los respectivos cebadores, sentido y antisentido. Cuatro de las reacciones funcionaron como blancos, no se agregó ADNc, y a las 4 reacciones restantes se les añadió ADNc (877 ng/µl) para comprobar que se estaba amplificando un producto. En este caso se realizó una sola reacción de PCR para los 4 cebadores, utilizando una temperatura en común (52°C) y los resultados se corrieron en un mismo gel.

El programa utilizado fue:

1. 95 °C por 3 minutos
  2. 95 °C por 30 segundos
  3. 52 °C por 30 segundos
  4. 68 °C por 3 minutos
  5. Ir al paso 2 por 38 veces
  6. 68 °C por 10 minutos
-

### VI.10.2 PRUEBA ESPECÍFICA

Una vez obtenido un producto preliminar se decidió realizar una prueba más específica dónde se trabajara cada cebador con su temperatura de fusión indicada. Se prepararon 5 tubos con 8  $\mu$ l cada uno que contenían Buffer Advantage 2 PCR, dNTP 10 mM, agua y Enzima Advantage. Los cebadores y el ADNc (alrededor de 50 ng) fueron añadidos de acuerdo a la Tabla III.

Tabla III. Muestra la manera en que fueron añadidos (+) el ADN y los cebadores.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
ADNc	+	-	+	+	+
Sentido	-	+	+	-	+
Antisentido	-	+	-	+	+

El programa para llevar a cabo la reacción de PCR fue el mismo que se utilizó en el caso anterior, no obstante cada par de cebadores para una familia fue trabajado por separado, utilizando siempre la Tf indicada de acuerdo al aparatado VI.10.1.

### VI.10.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN Y EXTRACCIÓN DEL GEL

Una vez que supimos que los cebadores estaban funcionando de la manera adecuada, obteniendo una banda bien definida de ADN del tamaño esperado, se decidió realizar una amplificación del ADNc con los mismos reactivos que se mencionaron anteriormente sólo que en lugar de una reacción de 10  $\mu$ l para cada cebador, se prepararon 10 reacciones de 10  $\mu$ l para cada uno. El resultado de estas reacciones se corrió en un gel preparativo de agarosa al 1% para después extraer el ADN con el kit de Extracción QIAquick. En este protocolo se cortan las bandas deseadas y se pesan, a continuación se agregan 3 volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel. Se disuelve el gel con ayuda de vortex y de calor, se agrega un volumen de isopropanol y después se pasa el producto a través de una

membrana específica para ADN. Se centrifuga por 1 minuto a 13, 000 rpm y se descarta el sobrenadante, para después añadir 0.5 ml de Buffer QG; se centrifuga en las mismas condiciones, se descarta el líquido y se lava la membrana con 0.75 ml de Buffer PE. Finalmente la membrana vacía se centrifuga por dos minutos y se eluye el ADN con 40  $\mu$ l de Buffer EB. Después de extraer el ADNc corrimos un gel con 5  $\mu$ l del resultado anterior para asegurarnos que el resultado había sido el esperado.

#### **VI.10.4 CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN**

Se realizó una ligación rápida utilizando el Buffer Quick Ligase. El procedimiento consiste en añadir 5  $\mu$ l de éste buffer, 1  $\mu$ l de vector pGEMT, 1  $\mu$ l de enzima ligasa GoTaq y 3  $\mu$ l de ADNc. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y después se transfirió en hielo para terminar la reacción.

Para la transformación se pipetearon 45  $\mu$ l de células de *E. coli* químicamente competentes y se añadieron 8  $\mu$ l de la reacción anterior. Se mantuvo en hielo por 30 minutos y se dio un choque de calor a 42 °C por 90 segundos, para terminar la reacción en hielo por 2 minutos. A continuación se añadieron 600  $\mu$ l de medio SOC y se sembraron 150  $\mu$ l del producto final en cajas de agar con IPTG y X-gal.

#### **VI.10.5 VERIFICACIÓN DEL INSERTO**

Al día siguiente se tomaron las colonias de color blanco y se analizaron 24 colonias para cada familia de toxinas analizada. La reacción total consistía en 104  $\mu$ l de Buffer Gotaq 5X, 52  $\mu$ l de cebador T7 (5  $\mu$ M), 52  $\mu$ l de cebador SP6 (5  $\mu$ M), 302  $\mu$ l de agua, 5  $\mu$ l de enzima y 10  $\mu$ l de dNTP (10  $\mu$ M). El programa que se utilizó fue:

1. 94 °C por 3 minutos
2. 94 °C por 45 segundos
3. Tf por 30 segundos

4. 68 °C por 1 minuto
5. Ir al paso 2 por 39 veces
6. 68 °C por 10 minutos

Las clonas se analizaron de igual manera que en los casos anteriores.

---

## VII. RESULTADOS

---

### VII.1 Extracción de ARN total del veneno del cónido.

#### VII.1.1 1era EXTRACCIÓN

Se utilizaron 9 ductos de la especie en cuestión. Al medir la densidad óptima pudimos conocer que la concentración para la primera elución era de 159 ng/ $\mu$ l, mientras que la concentración para la segunda elución era de 40 ng/ $\mu$ l.

Se preparó un gel de agarosa al 1% donde se cargaron 5  $\mu$ l de ARN total (159 ng/ $\mu$ l) diluidos en 5  $\mu$ l de agua y 7  $\mu$ l de escalera de ADN 2log. El gel se corrió durante una hora a 100 Volts y al verlo con luz UV pudimos apreciar una banda bien definida de 600 pares de bases (Figura 18).

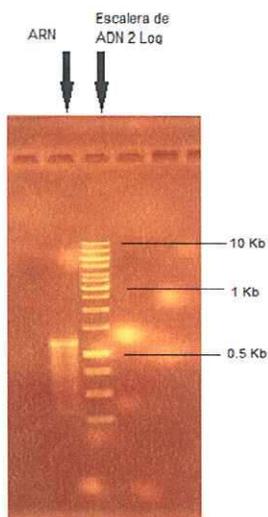


Figura 18. Gel de electroforesis para observar la calidad del ARN de *Conus regularis* en la primera extracción.

A pesar de que el gel utilizado no era específico para ARN podemos concluir que el material se encontraba en buen estado y que por lo tanto podíamos continuar con el experimento.

### VII.1.2 2<sup>da</sup> EXTRACCIÓN

En esta segunda extracción se utilizaron 10 ductos que nos dieron un peso inicial de 0.1 gr. Al medir la densidad óptima pudimos ver que la concentración de la primera elución era mucho mayor a la primera elución de la 1<sup>era</sup> extracción (986.72 ng/ $\mu$ l) y que la segunda elución también presentaba una mayor concentración (117.52 ng/ $\mu$ l). Al igual que en el caso anterior se corrió un gel de agarosa en las mismas condiciones y se obtuvieron resultados similares.

## VII.2 Resultados de la 1<sup>er</sup> biblioteca de ADNc.

### VII.2.1 ADN DE CADENA SENCILLA.

Para determinar la cantidad de ARN presente en la reacción se hizo el siguiente cálculo, tomando en cuenta que la alícuota de ARN utilizada tenía una concentración de 159 ng/ $\mu$ l (1<sup>era</sup> extracción, 1<sup>era</sup> elución) y que se habían utilizado 3.5  $\mu$ l de dicha solución, entonces:

$$3.5\mu\text{l} * \frac{159\text{ ng}}{\mu\text{l}} = 556.5\text{ ng de ARN de } \textit{Conus regularis} \text{ en la reacción (1)}$$

La cantidad de microlitros obtenidos después de sintetizar la primera cadena de ADN complementario era de 10  $\mu$ l. Estos fueron diluidos con 40  $\mu$ l de Buffer, lo que nos dio un total de 50  $\mu$ l. De acuerdo a las tablas que se encontraban en el protocolo si la concentración de ARN utilizado era de alrededor de 500 ng entonces se debían de tomar 4  $\mu$ l del ADN de una sola cadena para realizar la amplificación mediante PCR. En la Figura 19 podemos observar una banda poco

definida que corresponde al ADNc de la primera cadena, la cual sólo nos permite afirmar que existe un producto que está siendo amplificado.

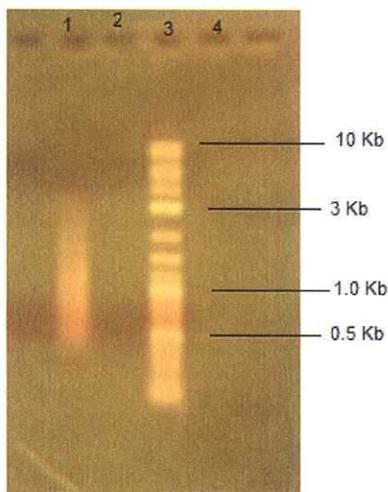


Figura 19. ADNc de *Conus regularis* (carril 1). Escalera de ADN 2 Log (carril 3)

### VII.2.2 ADN DE CADENA DOBLE Y FRACCIONAMIENTO DEL PRODUCTO.

La concentración obtenida después de juntar los productos de los 3 PCR realizados fue de 91.9 ng/ $\mu$ l. Debido a que el volumen total de ADN de doble cadena es de 80  $\mu$ l, entonces:

$$80\mu\text{l} * \frac{91.9\text{ ng}}{\mu\text{l}} = 7352\text{ ng de ADNc de doble cadena} \quad (2)$$

Al correr el resultado en un gel de agarosa pudimos ver que existía un producto, mas no se podía apreciar una banda bien definida debido a que son varios los tamaños de ADNc que existen en la muestra. Posteriormente se hizo un fraccionamiento del ADNc utilizando una columna, al correr los productos obtenidos en un gel de agarosa al 1% pudimos ver que nuestro ADNc se encontraba principalmente desde el tubo 8 hasta el 12 (Figura 20).

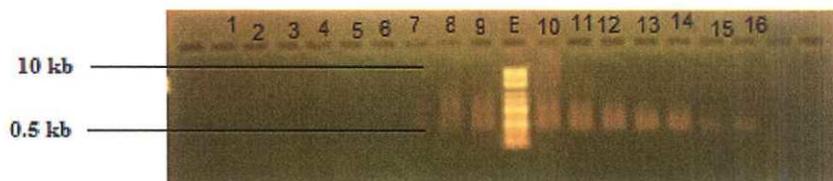


Figura 20. Análisis del ADNc fraccionado. Los carriles están numerados dependiendo del número de tubo que contienen. La escalera de ADN (E) es ADN  $\lambda$  Log.

Antes de juntar las fracciones se determinaron las concentraciones de cada una de ellas: 17.8 ng/ $\mu$ l (fracción 8), 25.6 ng/ $\mu$ l (fracción 9), 23.1 ng/ $\mu$ l (fracción 10), 22.5 ng/ $\mu$ l (fracción 11) y 18.5 ng/ $\mu$ l (fracción 12). Teniendo en cuenta la cantidad de microlitros de cada fracción, se concluyó que al final se contenían alrededor de 4  $\mu$ g de ADNc, suficientes para llevar a cabo la construcción de la biblioteca.

### VII.2.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO.

Después de realizar la transformación, se transfirieron de manera ordenada 50 colonias blancas a una nueva caja Petri. Se realizó un PCR de estas colonias de para hacer un tamizado que nos permitiera comprobar qué colonias contaban con el inserto del tamaño que estábamos buscando, el cual es mayor a los 500 pares de bases. En el gel que corresponde al tamizado (Figura 21) se puede observar que la mayoría de las colonias presentaron un inserto del tamaño esperado, como era la primera vez que se mandaba a secuenciar sólo se escogieron aquellas que presentaban un inserto lo suficientemente grande, definido y sencillo (que no tuvieran un doble inserto como es el caso de la colonia 5).

Siguiendo este criterio se dejó crecer toda la noche las colonias: 1, 4, 7, 9-11, 13, 14, 17-22, 24, 26-32, 37, 43, 44, 46 y 47 de las cuales se extrajo el plásmido al día siguiente.

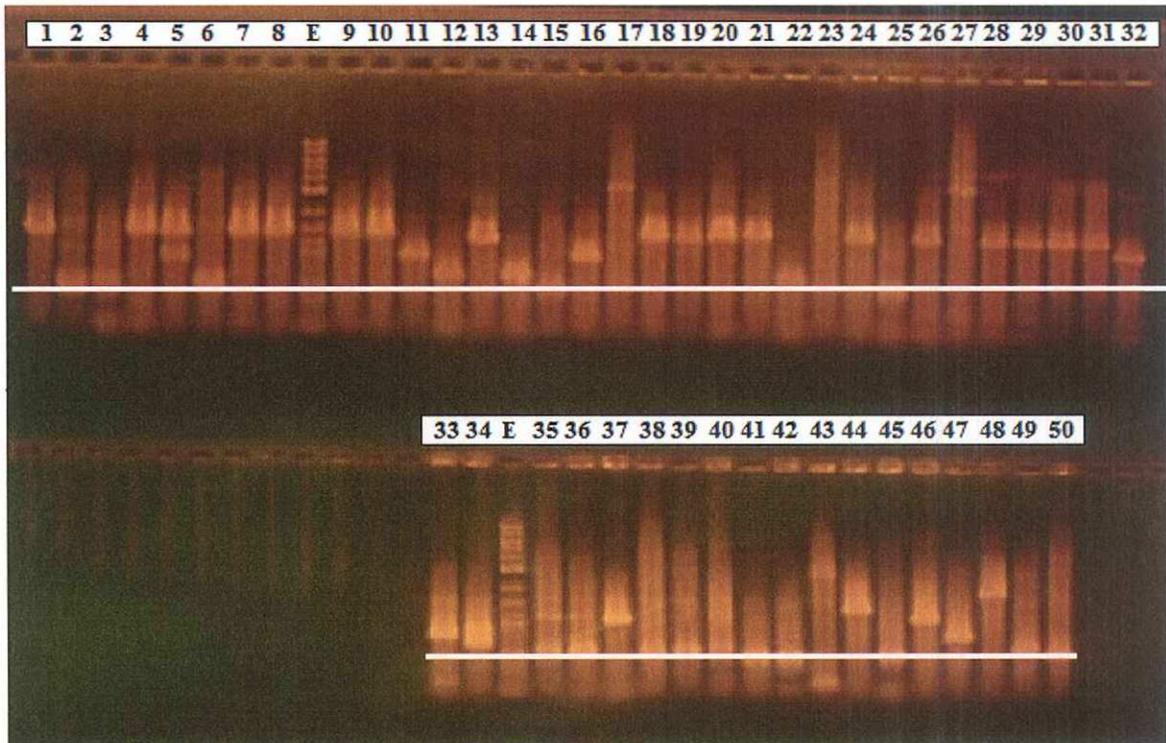


Figura 21. Productos de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para llevar a cabo el tamizado, que serán los mismo oligonucleótidos que se utilicen a la hora de secuenciar. Cada uno de los carriles corresponde a una colonia de bacterias de *E. coli* en específico, el número del carril coincide con el número de la colonia en la caja. La escalera de ADN (E) corresponde a una escalera de ADN  $\lambda$  Log. La línea blanca indica dónde se encuentra el tamaño correspondiente a 500 pares de bases, a partir de la cual estarán las colonias de interés.

#### VII.2.4 EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO

De los plásmidos que se mencionaron anteriormente se eliminaron los pertenecientes a los números: 1, 11, 14, 21, 32, 46 y 47 por no contener la suficiente cantidad de ADN para mandar a secuenciar. Desafortunadamente no existía una toxina en el inserto y las secuencias del plásmido que se obtuvieron fueron erróneas porque se sufrió una contaminación por otro plásmido con el que se había estado trabajando en el laboratorio anteriormente.

## VII.3 Resultados de la 2nda biblioteca de ADNc.

### VII.3.1 SÍNTESIS DE ADN.

Se utilizaron 3.5  $\mu\text{l}$  de ARN (986 ng/ $\mu\text{l}$ ) para sintetizar la primera cadena. Se obtuvo un total de 10  $\mu\text{l}$  de ADNcs de los cuales se utilizaron 4  $\mu\text{l}$  para llevar a cabo dos reacciones de 100  $\mu\text{l}$  cada una y sintetizar de esta manera la segunda cadena. Se corrió un gel con 5  $\mu\text{l}$  de estas últimas para comprobar que se había obtenido un resultado en el que se pudo ver una banda difusa que nos indicaba que había habido una amplificación.

### VII.3.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN.

Se corrieron dos columnas (una para cada 100  $\mu\text{l}$ ) para poder fraccionar el ADN. Posteriormente se corrieron dos geles que nos permitieron reconocer con cuáles fracciones se iba a trabajar. De la primera columna se tomaron de la fracción 5 a la 12 que dieron un volumen total de 300  $\mu\text{l}$ , de la segunda columna se tomaron de las fracciones 4 a la 11 las cuales dieron un volumen total de 270  $\mu\text{l}$ . Después de haber precipitado el ADN de las dos columnas y de haber juntado el volumen total de ambos (20  $\mu\text{l}$ ) se determinó que la concentración final era de 332.6 ng/ $\mu\text{l}$ .

### VII.3.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO.

Los resultados que se obtuvieron después de haber llevado a cabo la transformación fueron los que se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Resultados obtenidos después de haber llevado a cabo la transformación para la 2da biblioteca de *Conus regularis*.

Caja	Total de bacterias en la caja	Azules	Blancas
A	9	2	7
B	11	4	7
C	25	7	18
<b>Total de bacterias</b>			32

Cómo se puede observar los resultados no fueron muy alentadores ya que, a pesar de que el número de colonias azules es menor al número de colonias blancas, la cantidad de bacterias obtenidas es muy pequeña en comparación a los cientos de bacterias que se suelen obtener cuando una transformación es exitosa. De acuerdo al protocolo utilizado, se dice que una transformación es exitosa cuando al sembrar 2 µl del concentrado de bacterias se obtienen cajas con bacterias confluentes; es decir que son tan abundantes que casi se tocan unas con otras (~15, 000-30, 000 cfu por cada caja sembrada). A pesar de que este no fue el caso, se decidió realizar un tamizado de la misma manera que en la biblioteca anterior, para de esta manera identificar aquellas bacterias que tuvieran un inserto mayor a 500 pb. De las 32 bacterias que se analizaron únicamente 7 tenían un inserto que podría ser una posible conotoxina.

#### **VII.3.4 EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO**

Se extrajeron los plásmidos de las 7 colonias, se mandaron a secuenciar y se obtuvieron los mismos resultados que en el caso anterior: no hubo toxinas y se obtuvo otro plásmido distinto al que se estaba trabajando. Ahora bien, al mismo tiempo que se estaba realizando esta biblioteca, un estudiante de doctorado (M.C. Samuel Espino) estaba trabajando de la misma manera para construir una biblioteca de una especie de *Conus* distinta. Debido a que él tampoco estaba obteniendo buenos resultados decidimos trabajar juntos para ir eliminando posibles errores.

### **VII.4 Resultados de la 3era biblioteca de ADNc.**

#### **VII.4.1 SÍNTESIS DE ADN DE *Conus regularis* Y ADN DE HÍGADO DE RATÓN.**

En esta ocasión, además de trabajar con el ADN de *Conus regularis*, se decidió trabajar con un control de hígado de ratón. Al final de la síntesis de la segunda cadena, se obtuvieron dos reacciones de 100 µl para el caracol y dos reacciones

de 100  $\mu$ l para el hígado de ratón. Como en los casos anteriores, se corrió un gel para poder observar que había habido una amplificación, el cual nos permitió continuar con el siguiente paso.

#### VII.4.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN DE LA 3era BIBLIOTECA DE *Conus regularis* Y DEL CONTROL.

Se utilizó una columna por cada 100  $\mu$ l de reacción obtenida para la doble cadena de ADN. Para la primera reacción de *Conus regularis* se utilizaron las fracciones 8-13, mientras que para la segunda reacción se utilizaron de la fracción 7 a la 12. En el caso del hígado de ratón para la primera reacción se utilizaron de la fracción 7 a la 11 y en la segunda reacción se utilizaron de la fracción 7 a la 12.

Las fracciones se juntaron de acuerdo a la metodología que se había seguido por lo que al final el pellet de ADN de cada organismo fue resuspendido en 10  $\mu$ l de agua. Para *Conus regularis* se obtuvo una concentración de ADN de 286 ng/ $\mu$ l, mientras que para el hígado de ratón la concentración fue de 744 ng/ $\mu$ l.

#### VII.4.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO.

Nuestra primera sospecha fue que la biblioteca anterior no había sido exitosa porque la clonación no estaba funcionando de la manera adecuada, por esta razón la compañía Clontech nos ofreció trabajar con el kit In-Fusion® HD cloning. Este protocolo no requiere más de 200 ng de ADN y por lo tanto fue necesario hacer una dilución. Tomando en cuenta que:

$$C_1V_1 = C_2 \quad (3)$$

donde  $C_1$  y  $V_1$  corresponden a la concentración y volumen del tubo 1, mientras que  $C_2$  y  $V_2$  corresponden a la concentración y volumen del tubo 2.

##### *Conus regularis*

$$V_1 = \frac{50 \frac{ng}{\mu l} \cdot 10 \mu l}{286 \frac{ng}{\mu l}} = 1.8 \mu l \quad (4)$$

Se obtuvo un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  cuya concentración era alrededor de 50 ng/ $\mu\text{l}$ .

#### Hígado de ratón

$$V_1 = \frac{50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} * 10 \mu\text{l}}{744 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}} = 0.7 \mu\text{l} \quad (5)$$

Al final se obtuvo un volumen de 10  $\mu\text{l}$  con una concentración de 50 ng/ $\mu\text{l}$ .

Se decidió llevar la clonación con 80 ng: 1.5  $\mu\text{l}$  de ADN de *Conus regularis* y 2.5  $\mu\text{l}$  de ADN de hígado de ratón. Para esto se agregaron los reactivos de acuerdo con la Tabla II que se encuentra en el apartado VI.6.

Al llevar a cabo la transformación, de la misma manera en que se había realizado en las dos bibliotecas pasadas, no se obtuvieron colonias. Esto nos hizo pensar que la manera en que se estaba llevando a cabo la transformación no era la correcta, posiblemente debido a un error al realizar la electroporación; por lo tanto se decidió utilizar células de *E. coli* químicamente competentes. Al utilizar las células químicamente competentes se obtuvieron cajas Petri con una densidad de colonias sumamente alta. No se calculó la eficiencia de transformación pero sí se observó que la cantidad de colonias era tan alta que casi se tocaban unas con otras. De estas cajas se tomaron las bacterias blancas y se sembraron de manera ordenada en cajas nuevas. Al final se contaba con 10 cajas de 96 colonias cada una.

Al igual que en las bibliotecas anteriores se realizó una verificación del inserto. Se analizaron las cajas 1, 2, 3, 4 y 9; es decir se analizaron 5 cajas con 96 colonias cada una. Para fines prácticos únicamente se mostrará el gel de la caja 1 (Figura 22), aunque cabe destacar que no todos arrojaron tan buenos resultados como ese caso, donde 48 colonias resultaron tener insertos más grandes de 500 pb. Para la caja 2, 33 colonias resultaron tener insertos mayores a 500pb, para la caja

3 se obtuvieron 15 colonias, para la caja 4 se obtuvieron 12 colonias y finalmente para la caja 9 se obtuvieron 21.

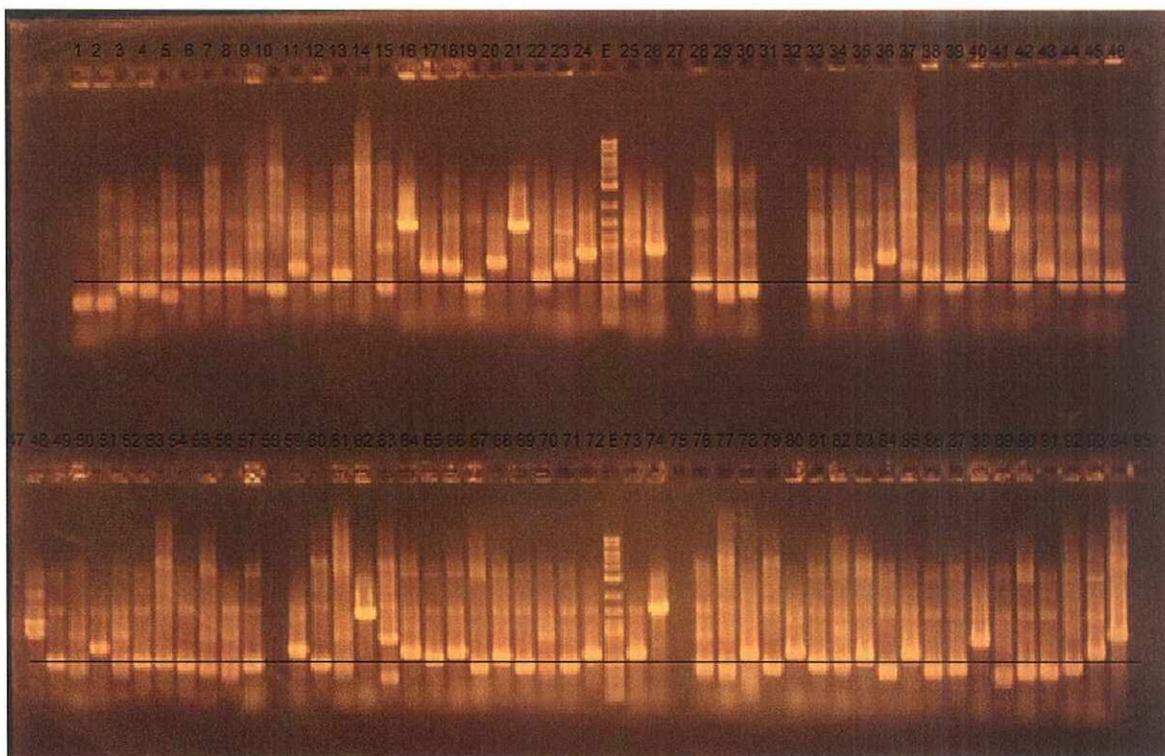


Figura 22. Productos de PCR de las colonias de la caja 1 de la 3era biblioteca de *Conus regularis*. El número de carril corresponde con el número de la colonia en la caja, la línea negra indica los 500 pares de bases. El carril que corresponde a la escalera de ADN 2 log está representado con la letra E.

#### VII.4.4 EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO

Del total de bacterias se escogieron aquellas cuyo plásmido era mayor a 500 pb y se dejaron crecer toda la noche para después extraer el plásmido de la manera que ya se ha mencionado. Después se escogieron aquellos plásmidos cuya concentración era mayor a 80 ng/ $\mu$ l y se mandaron secuenciar. La nomenclatura que se utilizó para decidir el nombre de la secuencia es la siguiente: R#\_FScr/RScr donde R se refiere a *regularis*, # es el número de la caja Petri y número de colonia (Ejemplo: 1.2 es caja 1, colonia 2; 3.4 es caja 3, colonia 4) y

FScr o RScr será dependiendo de si se utilizó un oligonucleótido sentido o un oligonucleótido antisentido para mandar a secuenciar.

## VII.4.5 RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN

### VII.4.5.1 RESULTADOS GENERALES

Se mandó a secuenciar 2 veces, distintas colonias, y se obtuvieron los siguientes resultados:

#### I SECUENCIACIÓN: Cajas 1 y 2

Total de clonas analizadas: 53

- Secuencias que resultaron ser ARN Ribosomal o ARN Mitocondrial: 17
- Secuencias que resultaron ser similares a una proteína en BLAST: 0
- Secuencias que presentaron una secuencia señal: 9
- Secuencias que no presentaron inserto: 20
- Secuencias con inserto pero que no arrojaron ningún resultado: 6
- Secuencias que resultaron ser conotoxinas: 1**

#### II SECUENCIACIÓN: Cajas 2, 3, 4, 9 y 10

Total de clonas analizadas: 59

- Secuencias que resultaron ser ARN Ribosomal o ARN Mitocondrial: 17
- Secuencias que resultaron ser ARN mensajero: 2
- Secuencias que resultaron ser similares a una proteína en BLAST: 0
- Secuencias que presentaron una secuencia señal: 9
- Secuencias que no presentaron inserto: 29
- Secuencias con inserto pero que no arrojaron ningún resultado: 2

TOTAL DE CLONAS ANALIZADAS: 112 (100%)

- Ribosomal/Mitocondrial: 34 (30%)
  - Posible proteína con secuencia señal: 19 (17%)
  - Proteínas con resultado en BLAST: 0
-

- Sin inserto: 50%
- ARN mensajeros para una conotoxina: 2 (2%)
- Conotoxina: 1 (1%)**

Como podemos observar, la gran mayoría de las clonas analizadas no presentaban un inserto y las secuencias obtenidas únicamente correspondían al plásmido utilizado. Debido a que se utilizó ARN total, muchas de las secuencias obtenidas (30%) correspondían a ARN mitocondrial o ribosomal, los cuales no son de interés para nuestro trabajo. Un 17% eran secuencias pertenecientes a una proteína con una posible secuencia señal, lo cual sólo era un indicador de que esa proteína había sido secretada por la célula.

Ninguna de las proteínas tuvo una similitud con alguna proteína de la base de datos de BLAST. No obstante, al comparar la secuencia de nucleótidos obtuvimos 2 ARN mensajeros (clonas R3.4\_RScr y R4.11\_RScr) que codificaban para una conotoxina cuya secuencia presenta una gran similitud con las conotoxinas de la superfamilia T identificadas en *Conus litteratus*, que es reconocido como vermívoro.

#### VII.4.5.2 ANÁLISIS DE LA CONOTOXINA

La única conotoxina encontrada pertenece a la clona R2.2\_FScr. La secuencia del prepropéptido obtenido es: M E K L M M L I L I A T A L F S I L V V I G G D G E K P L M G R T A A Q R R L P L R R R D C K Q R G S D C D K D E E C C P N L E C K C Q A G Q C P Q T D S K C R P Stop

De acuerdo a ProP 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>) pudimos determinar cuáles aminoácidos correspondían a la secuencia señal (de color azul), cuáles a la región pro (de color morado) y cuáles a la toxina en sí (de color verde).

MEKLMMLILIATALFSILVIGGDG

EKPLMGRTAAQRRRLPLRRR

DCKQRGSDCDKDEECCPNLECKCQAGQCPQTDSKCRP

Con respecto a la toxina, podemos observar que presenta un total de 37 aminoácidos, de los cuales 8 corresponden a residuos de cisteínas cuyo patrón de distribución es el siguiente: C-C-CC-C-C-C-C.

Al obtener esta secuencia, lo primero que se decidió hacer fue un análisis utilizando la base de datos de BLAST. Esta base de datos nos indicaba que, con una similitud sumamente baja, era una conotoxina parecida a aquellas que comprenden a la superfamilia O. Debido a que la base de datos que se mencionó anteriormente era insuficiente para el análisis, se decidió comparar a nuestra secuencia con aquellas que se encontraban en la base de datos del laboratorio del Dr. Baldomero Olivera, en el Departamento de Biología de la Universidad de Utah.

Se realizaron alineaciones de los aminoácidos que conforman al precursor (región pre y pro) con precursores de familias que ya han sido establecidas. El objetivo que perseguimos al realizar un alineamiento entre dos secuencias es determinar si poseen suficiente similitud como para poder justificar la existencia de homología entre ellas. La similitud la determinaremos con el porcentaje de identidad que presenten los aminoácidos que conforman a la secuencia. La homología será la conclusión a la que llegaremos después de observar el porcentaje de similitud entre las secuencias y será las que no indicará si estas están o no relacionadas.

No sólo analizaremos en si los aminoácidos que comparten las secuencias son idénticos, sino que en dado caso de que sean distintos, si los cambios que se generan por cambiar un aminoácido por otro son conservados. La cadena lateral de los aminoácidos juega un papel muy importante en la estructura y función de

una determinada proteína; se dice que los cambios son conservados si al sustituir un aminoácido por otro sus propiedades químicas son tan similares que no afectan en gran medida a la función original de la proteína.

Para llevar a cabo el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Este software agrupa a los aminoácidos en 4 grupos considerados como semejantes, es decir que su cadena lateral presenta características que los hacen similares.

- Grupo 1.- comprende aquellos aminoácidos pequeños o hidrofóbicos, incluidos los aromáticos. Estos aminoácidos son los siguientes: Alanina (A), Valina (V), Fenilalanina (F), Prolina (P), Metionina (M), Isoleucina (I), Leucina (L) y Triptófano (W).
- Grupo 2.- aquí se encuentran los aminoácidos ácidos, por lo tanto está comprendido por el Ácido aspártico (D) y el Ácido glutámico (E).
- Grupo 3.- se encuentran los aminoácidos que son básicos. La Arginina (R), la Histidina (H) y la Lisina (K).
- Grupo 4: en este grupo se encuentra la Glicina (G) y aquellos aminoácidos con un hidroxilo en su cadena lateral, una amina o con cadenas laterales que presenten basicidad. Estos serían: Serina (S), Treonina (T), Tirosina (Y), Histidina (H), Cisteína (C), Asparagina (N) y Glutamina (Q).

La puntuación que se utiliza para comparar a dos aminoácidos es la siguiente: "\*" significa que los residuos de aminoácidos en la columna son idénticos.; ":" significa que se han observado sustituciones conservadas y "." significa que existen sustituciones semiconservadas.

Conociendo las características que se tomaron en cuenta podremos proseguir a las alineaciones que se realizaron. Al principio parecía que el precursor de la

toxina de *Conus regularis* era similar al de una toxina perteneciente a la familia mu ( $\mu$ ). Estas alineaciones se presentan en la Figura 23.

```

C. regularis  -MEKMMTILITATAIFSLVV-IGGD--GEKE--LMGR TAAQRRLPLRRR- 44
Mu           MMSKMGVILITCLLDEPLTALPMDGQPADREPAERMQDDISSEHYPLFEKR 51
            *  **  : * : *  ** .: .: .: **  .: *  *  : .: : **  .:

```

Figura 23. Las dos secuencias que se muestran corresponden a la región del precursor: la primera, que consta de 44 aminoácidos, pertenece a *C. regularis* y la segunda, con 51 aminoácidos, pertenece a la familia mu. Las regiones sombreadas corresponden a los aminoácidos que son idénticos, que a su vez están identificados con un "\*". Los aminoácidos que indican un cambio conservado se identifican con ":", mientras que los que provocan un cambio semiconservado se identifican con ".". Los espacios vacíos que son añadidos para alinear mejor a las secuencias se identifican con "-".

En este caso, la secuencia más grande presenta 51 aminoácidos y 12 de ellos son exactamente iguales entre ambas secuencias, lo que nos da un 23.52% de similitud. De los aminoácidos restantes, 10 indican un cambio conservado y 9 un cambio semiconservado. Si tomamos en cuenta a los aminoácidos que indican un cambio conservado para llevar a cabo el porcentaje de similitud entonces obtenemos un 43%. Este resultado nos permite afirmar que las secuencias no son homólogas y que por lo tanto es necesario realizar nuevas alineaciones con secuencias distintas a los de la familia mu.

Por esta razón se volvió a hacer una nueva búsqueda y se encontró a un precursor de la familia gamma ( $\gamma$ ) del caracol *C. bullatus*. Los resultados los podemos ver en la Figura 24.

```

C. regularis  MEKMMTILITATAIFSLVVIGGDGEKPLMGRTAAQRRLPLRRR 44
Gamma        MOKTITLILVAAVIMSTQALIQGGER----RPKEKIKFLSKRK 40
            *  **  : * : * : * : * : *  .: *  *  ***  *  : .: : * :

```

Figura 24. La primera secuencia (*C. regularis*) corresponde a la región del precursor de nuestra toxina, la cual consta de 44 aminoácidos. La segunda secuencia (gamma) corresponde a la región del precursor de la toxina de la familia gamma, que tiene 40 aminoácidos. Las regiones sombreadas corresponden a los aminoácidos que son idénticos, que a su vez están identificados con un "\*". Los aminoácidos que provocan un cambio conservado se identifican con ":", mientras que los que provocan un cambio semiconservado se identifican con ".". Los espacios vacíos que son añadidos para alinear mejor a las secuencias se identifican con "-".

En este caso existió una mayor similitud: de los 44 aminoácidos comparados, 15 resultaron ser idénticos (34%). A diferencia de la alineación anterior, existió una proporción mayor de aminoácidos que representaban un cambio conservado (12) sobre aquellos que representan un cambio semiconservado (4). Si tomamos en cuenta los aminoácidos idénticos y aquellos que representan un cambio conservado, obtenemos un porcentaje de similitud del 61%. No obstante, este no es suficiente para afirmar que existe homología entre estas secuencias.

Debido a que, al igual que las toxinas de la familia I, nuestra toxina presenta 8 cisteínas, se decidió alinear el precursor de la toxina de *C. regularis* con el de una toxina de la familia I de *C. arenatus* (Figura 25).

```

C. regularis  MEKLMMLIITAAAFSILVVIGGDGKPLMGRITAAQRRLPLRRR 44
I            -----MKICVVFILVLMILPSVTGKSSSEERLALLRG-VKRR 37
              : * . * * : : : : .   * * * .   * * * *   *   : : * *

```

Figura 25. La primera secuencia (*C. regularis*) corresponde a la región del precursor de nuestra toxina, la cual consta de 44 aminoácidos. La segunda secuencia (I) corresponde a la región del precursor de la toxina de la familia I del cónido *C. arenatus*. Las regiones sombreadas corresponden a los aminoácidos que son idénticos, que a su vez están identificados con un "\*". Los aminoácidos que representan un cambio conservado se identifican con ".", mientras que los que indican un cambio semiconservado se identifican con ":". Los espacios vacíos que son añadidos para alinear mejor a las secuencias se identifican con "-".

De esta alineación pudimos ver que de los 44 aminoácidos alineados, 12 resultaron ser idénticos (27.27%). En este caso existieron 8 aminoácidos que representaban un cambio conservado y 3 que representaban un cambio semiconservado. De la misma manera que en los casos anteriores, si tomamos en cuenta a los aminoácidos idénticos y los aminoácidos que representan un cambio conservado (20), obtenemos un porcentaje de similitud del 45%. Esta alineación presentó una similitud menor que la obtenida con el precursor de la familia gamma. Aún así se decidió comparar la región de la toxina de las tres secuencias: *C. regularis*, gamma e I (Figura 26).

```

C.regularis   DCKQ■RGSD■CDKDEE■CCPNLE■ECKC■QAGQ■CPQTDSKCRP 37
Gamma        QCKPGNQA■CEKDEE■CCRPFE■ECKC■VSKSDAMTGFKCKS 37
             :**  .. *:*:*:*:*  :****  :  .  *  **:.

C.regularis   DCKQ■RGSD■CDKDEE■CCPNLE■ECKC■QAGQ■CPQTDSKCR--P- 37
I            TCSRRGHRC■IRDSQCCGGM-C-CQGNRCFVAIRRCFHL■PF 38
             *.:**  *  :*.:**  .:  *  **..:*  :  :*  *

```

Figura 26. Dos comparaciones de la región de la toxina de *C. regularis* con la región de la toxina de la familia gamma y con la región de la toxina I de *C. arenatus*. Los residuos de cisteína están sombreados de color rojo, mientras que los aminoácidos que las toxinas presentan en común están sombreados de color gris. Todos los aminoácidos idénticos están identificados con un "\*\*". Los aminoácidos que corresponden a un cambio conservado se identifican con ":", mientras que los que corresponden con un cambio semiconservado se identifican con ".". Los espacios vacíos que son añadidos para alinear mejor a las secuencias se identifican con "-".

De estos últimos resultados pudimos observar que la secuencia de la toxina de *C. regularis* presentó una mayor cantidad de aminoácidos iguales con la secuencia de la toxina de la familia gamma (43%), en comparación con la cantidad de aminoácidos idénticos que presentó en común con la toxina I (34%). No obstante, a la hora de comparar la región de la toxina, es mucho más importante que sean la cantidad de cisteínas y el patrón que estas presenten las que obtengan una mayor similitud. La cantidad de cisteínas que nuestra conotoxina presenta es más parecida a la cantidad de cisteínas que tiene la familia I, no obstante el patrón no es el mismo ya que para *C. regularis* es C-C-CC-C-C-C-C, mientras que para la toxina I es C-C-CC-CC-C-C.

Por otro lado se encontró que en la misma base de datos existía una toxina extraída del cónido *C. rosearapum* (rosea) y que presentaba una similitud bastante alta con la toxina de interés (*regularis*) (Figura 27).

```

regularis MEKLMMLILIALFSLVVIIGGDGEKPLMG---RTAAQRR-LPLRRRDCKQRGSDCDKD 56
rosea     MEKLTFLILVAAAVLSIQVMAGGDGCKPLMGRITRDAADGLSMLMRGKRCRGYHAACVRD 60
          ****  ****:*:*:*:* * : ****  *****  * **:  : :* : * :  : * :*

regularis          EECCP-NLECKCQAGQCPQTDSKCRP 81
rosea             SDCCSGNCECR-NAADCYGYTPLCR- 88
          .:*:* * ** :*:* * . **

```

Figura 27.- La secuencia denominada *regularis* corresponde a nuestra toxina de 56 aminoácidos completa. La segunda secuencia (*rosea*), que tiene 60 aminoácidos, corresponde a la toxina completa del cónido *C. rosearapum*. Los residuos de cisteína están sombreados de color rojo, mientras que los aminoácidos que tienen en común están sombreados de color gris. Todos los aminoácidos idénticos están marcados con un "\*", los que corresponden a un cambio conservado se identifican con ":" y para cambio semiconservados se representa con ".". Los espacios vacíos que son añadidos para alinear mejor a las secuencias se identifican con "-".

La región del precursor (una región clave a la hora de comparar a dos superfamilias) cuenta con 25 aminoácidos, 17 de los cuales son idénticos entre las dos secuencias. Esto nos muestra un 68% de similitud entre las dos regiones, el porcentaje más alto hasta ahora encontrado. De estos 25 aminoácidos que comprenden al precursor, de los 8 aminoácidos que no resultaron ser idénticos, 5 representan cambios conservados. Si consideramos los aminoácidos idénticos y los aminoácidos que presentan un cambio conservados nos da un total de 22 aminoácidos que representan el 88% del total.

Como en las alineaciones anteriores comparamos tanto la región del precursor como la región pro, haremos lo mismo en este caso. Estas dos regiones constan de 44 aminoácidos de los cuales 26 son idénticos, lo que representa un 59% de similitud. Si a esto le sumamos que de los aminoácidos restantes 9 son cambios conservados entonces podemos hacer el cálculo de similitud con 35 aminoácidos que nos da un porcentaje del 80%. Esto nos permite afirmar que las dos secuencias, en la región del precursor, son homólogas.

El patrón de cisteínas es prácticamente idéntico, ambas son C-C-CC-C-C-C-C, siendo tan solo la cantidad de aminoácidos entre los residuos de cisteína los que no coinciden completamente:

*C. regularis* CX<sub>6</sub>CX<sub>5</sub>CCX<sub>4</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>6</sub>C

*C. rosearapum* CX<sub>6</sub>CX<sub>5</sub>CCX<sub>3</sub>CX<sub>1</sub>CX<sub>5</sub>CX<sub>6</sub>C

## **VII.5 Resultados de la 4ta biblioteca de ADNc.**

### **VII.5.1 SÍNTESIS DE ADN.**

Después de llevar a cabo la optimización de la reacción de PCR para la síntesis de la doble cadena se decidió que la cantidad de ciclos ideal era de 25. El gel que se utilizó para tomar esta decisión no se muestra porque en la foto no es posible apreciar las bandas de los diferentes ciclos.

### **VII.5.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN DE LA 4ta BIBLIOTECA.**

Después de sintetizar la doble cadena se obtuvieron un total de 170 µl que se separaron en dos tubos de 85 µl cada uno y se fraccionaron en dos columnas por separado. Las fracciones que se tomaron de la columna 1 fueron de la 7 a la 11 que dieron un volumen total de 180 µl, mientras que de la columna 2 fueron las fracciones de la 8 a la 12 que dieron un volumen total de 200 µl. Al final se obtuvo un volumen total de 20 µl con una concentración de 234 ng/µl.

### **VII.5.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO.**

Después de llevar a cabo la clonación se contaba con las siguientes concentraciones de ADNc: Tubo A= 55.3 ng/µl, Tubo B= 89.1 ng/µl y Tubo C= 104.1 ng/µl. Para la transformación se utilizaron 2 y 4 µl de ADNc del tubo B, en 50 µl de células que se suspendieron en 500 µl de medio SOC. Al final de la

transformación se sembraron 150  $\mu\text{l}$  de cada concentración y se obtuvieron 50 colonias para la caja que tenía menor concentración y 100 colonias para la caja que tenía mayor concentración. Esto nos permite inferir que la transformación no fue del todo óptima ya que las colonias no eran confluentes. Se sembró el resto de las células transformadas para obtener un mayor número de colonias y se analizaron mediante un tamizado como se había estado haciendo anteriormente. El gel, que fue resultado de esta reacción, mostró que ninguna de las colonias presentaba un inserto. Se volvió a hacer un tamizado con las mismas colonias y con colonias nuevas y se obtuvo lo mismo: ninguna presentaba un inserto.

## **VII.6 Resultados de la 5ta biblioteca de ADNc.**

### **VII.6.1 CREACIÓN DEL ARN MENSAJERO A PARTIR DEL ARN TOTAL.**

Se partió de una cantidad de 165  $\mu\text{l}$  de ARN total de *Conus regularis* cuya concentración era de 223.2 ng/  $\mu\text{l}$  por lo que contábamos con 36  $\mu\text{g}$  de ARN total. Al final del procedimiento se contaban con 20  $\mu\text{l}$  de concentración 8.48 ng/ $\mu\text{l}$ , es decir 169.6 ng. Estos nanogramos representan alrededor del 0.471% del ARN total (debemos tomar en cuenta que en células de mamífero, el ARN mensajero tan solo representa el 1-5% del ARN total).

### **VII.6.2 FRACCIONAMIENTO DEL ADN DE LA 5ta BIBLIOTECA.**

Con el nuevo tipo de columnas que se utilizaron se recuperó muy poco volumen de ADN con muy poca concentración. Al final se obtuvo un tubo con 50  $\mu\text{l}$  de una concentración de 8.6 ng/ $\mu\text{l}$  y otro tubo con 50  $\mu\text{l}$  de una concentración de 6.8 ng/ $\mu\text{l}$ .

### **VII.6.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSERTO.**

Para llevar a cabo la clonación se utilizaron 60.2 ng de ADN que nos permitieron obtener al final de la reacción una concentración de 30 ng/ $\mu$ l, de los cuales se utilizaron 2  $\mu$ l para realizar la transformación. Debido a que sólo se obtuvieron 28, colonias se decidió realizar una nueva biblioteca. Es necesario tomar en cuenta que cuando se realiza una transformación con células químicamente competentes no se deben de utilizar más de 50 ng de ADN. En este tipo de transformaciones más no es mejor. Posiblemente esta fue la razón por la que las bibliotecas IV y V no funcionaran.

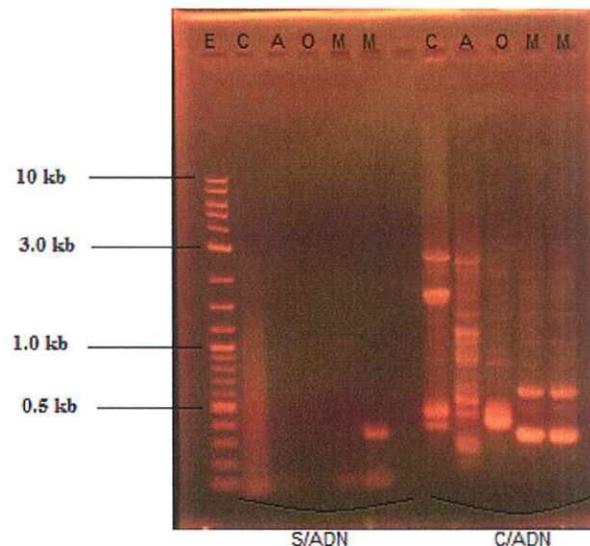
### **VII.7 Resultados de la 6ta biblioteca de ADNc.**

Al final de la síntesis de la segunda cadena se contaba con 100  $\mu$ l de ADNc cuya concentración era de 197.8 ng/ $\mu$ l. Estos 100  $\mu$ l fueron fraccionados para al final obtener 20  $\mu$ l cuya concentración era de 877 ng/ $\mu$ l. Se realizó una dilución para obtener una concentración de 50 ng/ $\mu$ l, de los cuales se utilizaron 2  $\mu$ l (100 ng). Se determinó la concentración del ADN después de la clonación: 23.3 ng/ $\mu$ l. Se realizaron dos transformaciones una tomando 2.5  $\mu$ l de la clonación y otra haciendo una dilución 1:10. Se sembraron 150  $\mu$ l y se obtuvieron cajas con una alta densidad de bacterias. Después de realizar la verificación del inserto el gel mostraba muy buenos resultados por lo que se mandaron a secuenciar 47 clonas. Desafortunadamente todas las clonas resultaron estar contaminadas con ARN mensajero de ratón. Esto es debido a que antes de extraer el ARN mensajero para *Conus regularis* se hizo un ensayo previo con ARN de hígado de ratón y a pesar de que se hizo una limpieza a conciencia de los materiales, no fue suficiente para evitar que la muestra se contaminara.

## VII.8 Resultados de la utilización de Cebadores específicos.

### VII.8.1 PRUEBA PREMILINAR

Afortunadamente, debido a que se piensa que *Conus regularis* está relacionado con *Conus* a los que se les conoce como verdaderos *Conus* podemos suponer que presentan familias de toxinas similares a ellos. Por esta razón se decidió utilizar cebadores específicos para 4 familias de conotoxinas que suelen estar presentes en la mayoría de los venenos de estos cónidos: conantocinas, alfa, omega y mu. Al correr el gel de agarosa que nos permitiera identificar si obteníamos un producto después de utilizar los cebadores específicos para *Conus*, pudimos mostrar que los cebadores para las 4 familias eran útiles ya que al mezclar los cebadores y el ADN, se obtenían bandas que significaba que un producto estaba siendo amplificado (Figura 28).



**Figura 28.** Productos de PCR utilizando cebadores específicos para *Conus*. El primer carril contiene a la escalera de ADN  $\lambda$ log (E), los siguientes 5 carriles contienen al blanco de los cebadores utilizados, es decir se agregaron todos los reactivos de la reacción excepto el ADNc. El siguiente carril no contiene muestra y los siguientes 5 carriles contienen a las reacciones que llevaron a cabo en su totalidad: el ADNc con su respectivo cebador. Las iniciales representan el cebador utilizado en cada caso: C (conantocinas), A (alfa), O (omega) y M (mu).

### **VII.8.2 PRUEBA ESPECÍFICA**

Cuando se utilizó una temperatura de fusión adecuada para cada cebador, se encontró que para todos los cebadores se obtenía una banda bien definida del tamaño esperado para ese cebador. Como ya se mencionó en la sección VI.10.1, el tamaño de las conotoxinas para cada familia es el siguiente: para conantocinas se espera un tamaño aproximado de 430 pb, para omega es aproximadamente de 350-370 pb, para mu se esperan alrededor de 330 pb y finalmente para alfa se estiman de 210-225 pb. Por lo tanto pudimos continuar con una amplificación del ADNc mediante PCR, para posteriormente realizar una extracción de este en un gel preparativo. Una vez extraído el ADNc se llevó a cabo la clonación y transformación como se describió en la metodología.

### **VII.8.3 VERIFICACIÓN DEL INSERTO**

Se realizó un tamizado de las clonas obtenidas y se pudo comprobar que varias de las clonas contenían un inserto (Figura 29). Se escogió con el mismo criterio anterior, el cual indica que al ligar el ADNc al vector el producto final debe de ser mayor a 500 pb, aquellas colonias de las que se extraería el plásmido. Se mandaron a secuenciar las que contenían la concentración requerida (80 ng/  $\mu$ l).

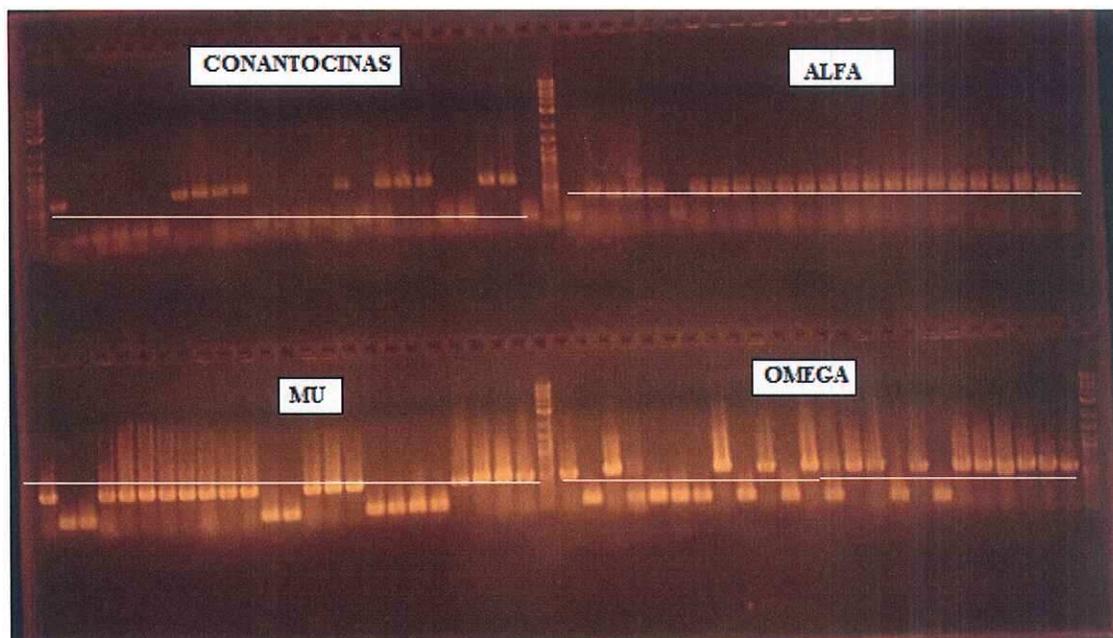


Figura 29. Productos obtenidos después de llevar a cabo la ligación del ADNc, obtenido con un cebador específico para un determinada superfamilia, y el vector pSMART2IF. Se obtuvieron conotoxinas para las superfamilias de conantocinas, alfa, mu y omega respectivamente. Se utilizó una escalera de ADN 2log, la raya blanca indica donde se encuentran las 500 pares de bases.

#### VII.8.4 SECUENCIACIÓN

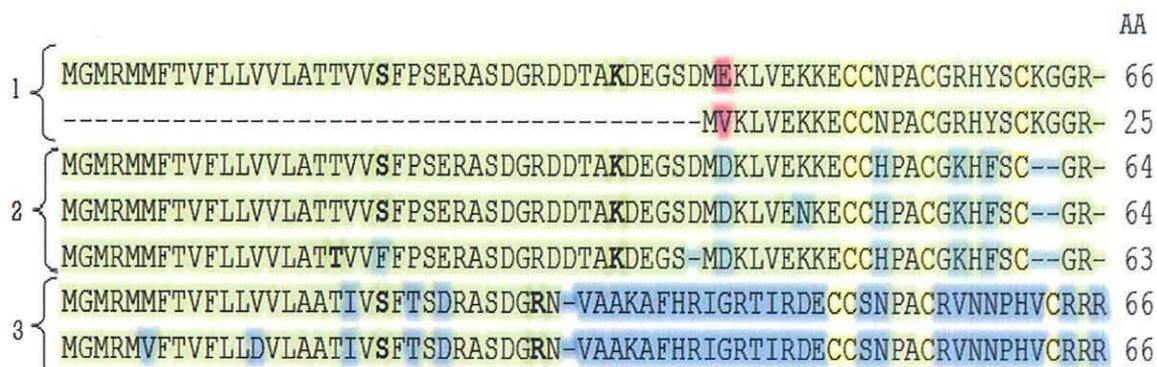
La Tabla V presenta el total de clonas analizadas para cada cebador

Tabla V. Total de clonas analizadas para cada uno de los cebadores.

Cebadores	Secuencias analizadas
Alfa	14
Omega	6
Mu	14
Conantocinas	9

#### VII.8.4.1 Toxinas pertenecientes a la familia $\alpha$ (CC-C-C)

De las 14 secuencias analizadas para el cebador de la familia alfa, se encontraron 3 toxinas diferentes, donde las 11 restantes fueron secuencias repetidas. Los enlaces de cisteínas se resaltan de color amarillo y los aminoácidos que se encuentran en las tres toxinas se resaltan de color verde. Dentro de las 3 toxinas existieron variaciones, pero debido a que eran poco aminoácidos los que no coinciden, pueden considerarse la misma conotoxina. La toxina 1 presenta dos aminoácidos distintos que se resaltan de color fucsia; la toxina 2 tiene resaltados los aminoácidos distintos en azul celeste, mientras que la toxina 3 presenta sus aminoácidos diferentes en color azul marino. Se resalta en color negro aquellos aminoácidos que posiblemente sean donde se lleva a cabo la hidrólisis de la región pre y pro respectivamente.



#### VII.8.4.2 Toxinas pertenecientes a la familia $\Omega$ (C-C-CC-C-C)

Del total de clonas analizadas para las secuencias que utilizaron un cebador perteneciente a la familia omega pudimos identificar a 3 conotoxinas distintas. Al igual que en el caso anterior las cisteínas se marcan de color amarillo y los aminoácidos compartidos se resaltan de color verde. La toxina 1 se identifica con el color fucsia, la toxina 2 con el color azul celeste y la toxina 3 con el color azul marino. Al igual que en el caso anterior se resalta en color negro los aminoácidos

dónde es altamente probable que se lleve a cabo la hidrólisis de la región pre y pro.

```

1 -----MKLTCVV-IVAVLLLTACQLITADDSRGTQKHRALRSSTKLTLSTRCKSP
2 -----MKLTCVV-IVAVLLLTACQLITADDSRGTQKHRALGSTTELSLSTRCKSP
3 EFTSDYQNHHQNETDVCGDRRRAALTACQLITADDSRGTQKHRALRSSTKLTLSTRCVPS

1 GTPCSRGMRDCCT-SCLLYSNKCRRY 74
2 GSSCSPTSYNCCR-SCNPYTKRCSG- 73
3 GGSCSRTAYSCCHGSCS--GGRCG-- 82
AA

```

#### VII.8.4.3 Toxinas pertenecientes a la familia $\mu$ (CC-C-C-CC)

En este caso únicamente se encontraron dos tipos de conotoxinas, la 1 identificada con el color fucsia, que sólo presenta diferencias en la región pro, y la 2 identificada con el color azul marino. Los aminoácidos resaltados en color negro indican dónde se lleva a cabo la hidrólisis para obtener una toxina final madura.

```

1 { MSKLGVLLTICLLLFPLTALPMDGDEPANRPVERMQDNISSEQYPLFEKRDCCTPPKK
   { -----MDGDEPANRPVVRMQDNISSEQYPLFEKRDCCTPPKK
   { MMSKLGVLLTICLLLFPLTALPMDGDEPADRPVERMQDNISSEQYPLFEKRDCCTPPKK
   { MMSKLGVLLTICLLLFPLTALPMDGDEPANRPVERMQDDISSEQYPLFEKRDCCTPPKK
2 → MMSKLGVLLTICLLLFPLTALPMDGDEPANRPVERMQDNISSEQYPLFEKRDCCTPPRK

1 { CKDRQCKPQRCCAGR 75
   { CKDRQCKPQRCCAGR 53
   { CKDRQCKPQRCCAGR 75
   { CKDRQCKPQRCCAGR 75
2 → CKDRRCKPMKCCAGR 75
AA

```

#### VII.8.4.4 Toxinas pertenecientes a la familia conantocinas.

Por último para los cebadores que nos permitieron obtener conopeptidos pertenecientes a las conantocinas se encontraron 3 secuencias diferentes que

presentaban casi todos los aminoácidos iguales. Los aminoácidos en color negro limitan las regiones pre, pro y toxina madura.

```

1 { MQLYTYLYLLVPLVTFHLLILGTGTLDDGGALTERRSADATALKAEVPLQKSAARSTDDN
   { MQLYTYLYLLVPLVTFHLLILGTGTLDDGGALTERRSADATALKAEVLLQKSAARSTDDN
2 { MQLYTYLYLLVPLVTFHLLILGTGTLDDGGALTERRSADATALKAEVLLQKSAARSTDDN
   { MQLYTYLYLLVPLVTFHLLILGTGTLDDGGALTERRSADATALKAEVLLQKSAARSTDDN
3 { MQLYTYLYLLVPLVTFHLLILGTGTLDDGGALTERRSADATALKAEVLLQKSAARSTDDN
   { MQLYTYLYLLVPLVTFHLLILGTGTLDDGGALTERRSADATALKAEVLLQKSAARSTDDN

1 { GEDRLTQMKRILKQRGNKARGEELQENQELIREKSNGKR 100
   { GKDRLTQMKRILKQRGNKARGEELQENQELIREKSNGKR 100
2 { GKDRLTQMKRILKQRGNKARGEELQENQELIREASNGKR 100
   { GKDRLTQMKRILKQRGNKARGEELQENRELIRESNGKR 100
3 { GKDRLTQMKRILKQRGNKARGEELQASQEAIIRESNGKR 100
   { GKDRLTQMKRILEQRGNKARGEELQASQEAIIRESNGKR 100
AA

```

### VII.8.5 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

A pesar de que las clonas estuvieron contaminadas con hígado de ratón, supusimos que las conotoxinas de *C. regularis* estaban en la muestra y decidimos utilizar cebadores específicos de las conotoxinas más comunes en el veneno de los cónidos verdaderos para poder encontrar toxinas en el veneno de interés. Los resultados parecían muy alentadores, se obtuvieron varias conotoxinas para cada uno de los cebadores utilizados y las secuencias parecían estar completas. No obstante cuando el Dr. Olivera, que es un experto en conotoxinas, analizó las secuencias observó que las toxinas obtenidas pertenecían en realidad a otra especie, *Conus geographus*. Este último cónido es sumamente utilizado en el laboratorio del Dr. Olivera, se han realizado múltiples estudios sobre su veneno y posiblemente la contaminación se dio por utilizar un reactivo que hubiera estado en contacto con el veneno del cónido. Para confirmar las sospechas del Dr. Olivera se alinearon las secuencias obtenidas con aquellas pertenecientes a *C. geographus* y pudimos ver que, en efecto, no eran más que secuencias repetidas.

---

## VIII. DISCUSIÓN

---

El estudio del veneno de cónidos es relativamente reciente, hace tan sólo 3 décadas que las primeras conotoxinas fueron aisladas y caracterizadas. Desde entonces los descubrimientos que se han hecho al respecto no han dejado de maravillarnos y poner en la mesa nuevas preguntas al respecto. El Laboratorio de Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) ha contribuido durante 11 años con nuevos descubrimientos que nos han permitido entender de mejor manera al género *Conus*. En este laboratorio se ha abordado el estudio del veneno mediante su purificación a través de HPLC, para aislar picos mayoritarios que puedan ser probados en distintos blancos moleculares. No obstante, el enfoque de este trabajo fue abordar el estudio del veneno del cónido desde otra perspectiva: se decidió trabajar desde un punto de vista molecular, construyendo bibliotecas de ADNc que nos permitieran encontrar secuencias que codifican para conotoxinas.

De las diferentes bibliotecas, podemos afirmar que la 3era resultó ser la más exitosa. Es verdad que de las 112 clonas analizadas tan sólo una resultó ser una conotoxina completa y dos un posible ARNm, pero estos resultados nos han permitido plantearnos nuevos retos que resolver. Comparando nuestros resultados con los de la bibliografía, encontramos que Biggs *et al* (2010) realizaron una biblioteca de ADNc de las toxinas presentes en el veneno de *Conus californicus*, utilizando el mismo método que nosotros. Ellos analizaron 285 secuencias de las cuales 120 (47%) resultaron tener clonas de ADNc maduros y de esa cantidad 50 (20%) resultaron ser distintas. Biggs y colaboradores concluyen que estas 50 clonas representan tan sólo una mínima fracción de la totalidad de los

---

componentes del veneno de *C. californicus* y que aún existen por lo menos 100 toxinas cuya secuencia es desconocida. Es cierto que al comparar los resultados obtenidos en esta tesis, con los obtenidos por Biggs y colaboradores en el 2010, nos damos cuenta que los nuestros no son idóneos. En perspectiva podemos decir que para obtener buenos resultados es prácticamente indispensable contar con ARN de muy buena calidad. Se considera necesario trabajar con ductos disecados de organismos vivos para que el tejido esté lo más fresco posible; además es recomendable trabajar con ARNm en lugar de ARN total para evitar obtener secuencias que sean ARN mitocondrial o ribosomal.

Tenemos que tomar en cuenta que, de acuerdo a la nomenclatura establecida, los miembros de una determinada superfamilia deben de tener en común dos características: en la región del precursor deben de compartir una secuencia señal altamente conservada y en la región de la toxina madura deben de presentar un arreglo de residuos de cisteínas único, con un número y patrón característico. Por esta razón es necesario realizar un análisis exhaustivo antes de poder afirmar que la toxina ha sido clasificada. Uno de los resultados más interesantes de la 3era Biblioteca es una secuencia de una conotoxina completa que se vuelve a mostrar a continuación:

MEKLMMLILIATALFSILVVIGGD**G**EKPLMGRTAAQRRLP  
LRRRDCKQRGSDCDKDEECCPNLECKCQAGQCPQTDS  
KCRP **Stop**

Por lo regular, en este tipo de análisis, la primera base de datos que se utiliza es BLAST, tal como se hizo en este estudio; esto es porque BLAST suele ayudarnos a tener una primera aproximación de lo qué es la toxina con la que estamos trabajando. Sin embargo, en el caso de este estudio su alcance fue limitado, probablemente por tratarse de conotoxinas nuevas o de especímenes con los que se ha trabajado poco. En ese sentido, la posibilidad de poder consultar con la base

de datos del laboratorio del Dr. Baldomero Olivera, en el Departamento de Biología de la Universidad de Utah, fue de gran ayuda.

Muchas veces, sobre todo cuando se trabaja con secuencias de ADN que están relacionadas, las primeras alineaciones que surjan pueden parecer a simple vista que son las correctas; sin embargo esta primera impresión puede modificarse conforme se profundice con el estudio. Tal es el caso de las alineaciones que se hicieron para el precursor de nuestra toxina: en un principio parecía similar al de la Familia mu ( $\mu$ ) pero después de compararlo con una toxina de la familia gamma ( $\gamma$ ) de *C. bullatus* la similitud resultó ser mejor. Por otro lado, el patrón de cisteínas tiene un papel muy importante a la hora de clasificar a las toxinas, y en un principio parecía que éste era parecido al de una familia totalmente diferente a las anteriores, el de la familia I de *C. arenatus*.

Ninguna de las dos alineaciones resultaba satisfactoria. El precursor seguía presentando una gran disimilitud y, teniendo en cuenta que nuestro patrón de cisteínas es C-C-CC-C-C-C-C, podíamos observar que no coincidía ni con el de la familia de la toxina gamma que sólo tiene 7 cisteínas (C-C-CC-C-C-C) ni con el de la familia I (C-C-CC-CC-C-C) que tiene un arreglo distinto.

En ese punto del estudio, fue importante contar con la posibilidad de trabajar con la base de datos del Dr. Olivera, ya que el precursor de una toxina de *C. rosearapum* resultó ser prácticamente idéntico al de nuestra conotoxina. El porcentaje de similitud ,de 88%, nos permitió afirmar que existía homología entre las dos secuencias; esto sumado al hecho de que ambas toxinas presentaban la misma cantidad de cisteínas y que estas cisteínas presentaban un mismo patrón, nos permite decir que es sumamente probable que estén relacionadas.

Una parte importante de esta investigación fue el hallazgo de una conotoxina con 8 residuos de cisteínas, una condición poco conocida que condujo a un extensivo análisis bibliográfico para sistematizar el estado de conocimiento, y así contextualizar nuestro descubrimiento. La primera superfamilia de conotoxinas con 8 residuos de cisteínas en ser descrita, fue la superfamilia I (C-C-CC-CC-C-C). A diferencia del resto de las superfamilias, la superfamilia I se subclasifica en dos grupos debido a que los aminoácidos que conforman a su péptido señal no son siempre los mismos, por lo que tenemos a la superfamilia I<sub>1</sub> y a la superfamilia I<sub>2</sub>. Además podemos distinguir en 3 grupos si nos fijamos en el patrón de los residuos de cisteínas: el grupo A (CX<sub>6</sub>CX<sub>5</sub>CCX<sub>1</sub>CCX<sub>4</sub>CX<sub>8-10</sub>C) y el grupo B (CX<sub>6</sub>CX<sub>5</sub>CCX<sub>3</sub>CCX<sub>4</sub>CX<sub>6</sub>C) pertenecen a la superfamilia I<sub>1</sub>, mientras que el grupo C (CX<sub>6</sub>CX<sub>5</sub>CCX<sub>3</sub>CCX<sub>2-3</sub>CX<sub>3</sub>C) pertenece a la superfamilia I<sub>2</sub>. (Peng et al, 2008). El patrón de cisteínas que presenta la conotoxina de *C. regularis*, no pertenece a ninguno de ellos, por lo que esto sumado al hecho de que el precursor tampoco coincide, nos permite descartar que nuestra conotoxina pertenezca a la superfamilia I. Por otro lado Peng y colaboradores (2008) habían caracterizado una nueva conotoxina de 8 residuos de cisteínas cuyo patrón y secuencia señal eran únicos. Esta nueva conotoxina (vi5a) fue extraída del caracol *Conus virgo*, el cual se encuentra clasificado dentro de las especies vermívoras. Peng y colaboradores (2008) utilizaron esta secuencia señal como un cebador que permitiera obtener otras conotoxinas similares, encontrando conotoxinas muy parecidas en *Conus vitulinus* y *Conus characteristicus*. Ellos proponen una nueva superfamilia denominada V. El arreglo de cisteínas que reportan para esta conotoxina es idéntico al patrón que presenta la conotoxina encontrada en *Conus regularis* (C-C-CC-C-C-C-C), no obstante la secuencia señal del péptido es sumamente diferente. En este artículo, también mencionan que encontraron una conotoxina en *Conus litteratus* con el patrón de cisteínas al que ellos proponen como superfamilia V, no obstante la secuencia del péptido señal que esta toxina presenta es distinto al que ellos habían propuesto para esta superfamilia.

Sobre esta base, parece correcto haber establecido que nuestra conotoxina presenta una similitud muy alta con la perteneciente a *C. rosearapum*, sobre todo en la región del precursor, y que tienen el mismo patrón de cisteínas. Esto nos lleva a pensar que es probable que la superfamilia V presente la misma complejidad que la superfamilia I, donde un precursor y un patrón de cisteínas no definen a la superfamilia. Es claro que el precursor de la conotoxina de *C. regularis*, *C. rosearapum* y *C. litteratus* no coinciden con el precursor que Peng *et al* clasifican como V, no obstante el patrón de cisteínas si es idéntico al de esta superfamilia.

Esta aparente contradicción nos lleva a plantear diferentes soluciones: pudiera ser que la conotoxina de *C. regularis* y la conotoxina de *C. rosearapum* pertenezcan a una nueva superfamilia aún no descrita; que ambas conotoxinas pertenezcan a la superfamilia V pero que presenten un precursor distinto a esta como sería el caso de la conotoxina de *C. litteratus*, o que la toxina de *C. regularis* pertenezca a una superfamilia completamente distinta al veneno de los cónidos mencionados. Es importante recalcar que la nomenclatura hasta ahora descrita nace de la necesidad que como seres humanos tenemos de clasificar las cosas. Por lo tanto podemos decir que la clasificación hasta ahora mencionada es totalmente artificial y es sumamente difícil que todas las toxinas puedan clasificarse perfectamente dentro de estas agrupaciones.

Otro segmento interesante de este estudio es lo que nos llevó a resultados que permiten sospechar firmemente que *C. regularis* es vermívoro. Sabemos que existe una divergencia interespecífica sumamente remarcable en los genes que codifican para los péptidos que se encuentran en el veneno de los cónidos; la cual puede ser debida a las interacciones bióticas específicas para cada especie. Los conopéptidos que se encuentran en el veneno de una determinada especie pueden ser correlacionados con los parámetros ecológicos y de comportamiento que esta pueda presentar en su hábitat, por lo tanto conocer la distribución y la

---

función fisiológica de los conopéptidos puede ser utilizada como una manera de realizar estudios ecológicos a la inversa: el veneno es una lectura molecular de las interacciones bióticas de una especie o clado (Olivera, 2002). Incluso existen casos extremos en los que una familia de péptidos puede ser específica de un clado: se puede encontrar únicamente en las especies que pertenezcan a éste. Las pruebas que nos guiaron a afirmar que *C. regularis* es una especie vermívora son las siguientes: en primer lugar, en la 3era biblioteca se encontró un ARN mensajero que, de acuerdo a la base de datos de BLAST, posiblemente codifica para conotoxinas pertenecientes a la superfamilia T, presente en el veneno de *Conus litteratus*. Este tipo de cónidos se alimentan exclusivamente de poliquetos, principalmente de Capitellidae, y son alimento de un cónido moluscívoro, *C. marmoreus* (Duda *et al*, 2001). En segundo lugar, *C. regularis* no sólo presentó toxinas similares a las de este cónido vermívoro sino que, de acuerdo a Peng *et al* (2008), la toxina es similar a aquellas presentes en el veneno de *C. virgo*, que también es un caracol que se alimenta de vermes. Esto nos permite afirmar que el veneno de un cónido está sumamente relacionado con el hábitat en el que se encuentra y que por lo tanto es muy probable que *C. regularis* mantenga una dieta basada principalmente en poliquetos.

Para finalizar, diremos que en este trabajo abordamos el estudio del veneno de *C. regularis* desde un punto de vista molecular, analizamos cuáles son las secuencias que conforman a las toxinas que comprenden al veneno lo que nos permite entender mejor a la biología del cónido. No obstante esta base de datos de toxinas de *Conus regularis* es tan sólo el primer peldaño de una serie de estudios que se pueden llevar a cabo. Cada secuencia codifica para una toxina que puede ser sintetizada y a su vez probada en disitntos blancos moleculares los cuales pueden estar involucrados en alguna enfermedad en específico.

---

## IX. CONCLUSIONES

---

Se construyeron 6 bibliotecas de *Conus regularis*, siendo la tercera de la que se obtuvo una secuencia que codifica para una nueva conotoxina completa.

Existen tres posibilidades para clasificar a la nueva conotoxina encontrada: que pertenezca a una nueva superfamilia de toxinas junto con una toxina de *C. rosearapum*; que pertenezca a una subclasificación de la superfamilia V propuesta por Peng *et al* (2008) o que pertenezca a una nueva superfamilia de conotoxinas aún no descrita.

En el tejido del ducto venenoso de *Conus regularis* se encontró ARN mensajero similar al que codifica para conotoxinas de la superfamilia T en conotoxinas de *C. litteratus*. Es posible que al utilizar un cebador específico para esta conotoxina se encuentren más conotoxinas.

El hecho de que se hayan encontrado conotoxinas similares en cónidos que se alimentan de gusanos, nos permite sugerir que *C. regularis* es una especie vermívora.

---

---

## X. PERSPECTIVAS

---

Se diseñó un cebador en base a las similitudes que presentan la toxina de *Conus regularis* y la toxina de *Conus rosearapum*. Este cebador nos permitirá identificar más toxinas en el veneno de *Conus regularis* y de esta manera, poder tener más herramientas para llegar a una conclusión con respecto a cómo clasificar a la toxina encontrada.

Realizar nuevamente la biblioteca, siguiendo los mismos pasos que se siguieron al realizar la 3era biblioteca. Esta vez empezando con una mayor cantidad y de mejor calidad de ARN para de esta manera poder obtener más ARN mensajero.

---

## XI. BIBLIOGRAFÍA

---

- Bandyopadhyay, P. K., Garrett, J. E., Shetty, R. P., Keate, T., Walker, C. S. y Olivera, B. M. 2002.  **$\gamma$ -Glutamyl Carboxylation: an extracellular Post-translational Modification that Antedates the Divergence of Mollusks, Arthropods and Chordates.** *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1264-1269.
- Becker, S. y Terlau, H. 2008. **Toxins From Cone Snails: Properties, Applications and Biotechnological Production.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 79:1-9.
- Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre N., Ownby, J.P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K. J., Bernaldez, J., Licea-Navarro, A., Cornlei, P.S. y Olivera, B.M. 2010. **Evolution of *Conus* peptides toxins: Analyziz of *Conus Californicus* Reeve, 1844.** *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 56(1):1-12.
- Bulaj, G. y Olivera, B.M. 2008. **Folding of Conotoxins: Formation of the Native Disulfide Bridges During Chemical Synthesis and Ciosynthesis of *Conus* Peptides.** *Antioxidants & Redox Signaling.* 10(1): 141-155.
- Buzcek, O., Bulaj G. y Olivera, B. M. 2005. **Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products.** *Cell. Moll. Life. Sci.* 62:3067-3079.
-

- Craig, A. G., Norberg T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navarro, V., Macella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. 1999. **Contakulin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin.** *J Biol Chem* 274:13752-13759.
- Duda, T. F., Kohn, A. L. y Palumbi, S. R. 2001. **Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 73:391-409
- Espiritu, D. J., Watkins, M. , Dia-Monje, V., Cartier, G. E., Cruz, L. J. y Olivera, B. M. 2001. **Venomous cone snails: molecular phylogeny and the generation of toxin diversity.** *Toxicon* 39:1899-916
- Favreau, P. y Stöcklin, R. 2009. **Marine Snail Venoms: Use and Trends in Receptor and Channel Neuropharmacology.** *Pharmacology.* 9:594-601.
- Hooper, D., Lirazan, M. B., Schoenfeld, R., Cook, B., Cruz, L. J., Olivera, B. M. y Bandyopadhyay, P. 2000. **Post-translational Modification: a Two Dimensional Strategy for Molecular Diversity of *Conus* Peptides.** En: *Peptides for the New Millenium: Proceedings of the Sixteenth American Peptide Symposium*, Editado por Fields G. B., Tam J. P., and Barany G. Dodretch, *The Neteherlands: Kluwer Academic.*
- Juárez, K. O. 2005. **Caracterización Electrofisiológica del Veneno del Caracol Marino *Conus californicus* en Canales Iónicos de Potasio.** Tesis de Maestría. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.* Ensenada, B.C., México. 157 pp.
-

- Keen, A. M. 1971. **Sea Shells of Tropical West America: Marine Mollusks from Baja California to Peru.** *Stanford University Press*. Second edition. 1064 pp.
- Khon, A. 1956. **Piscivorous Gastropods of the Genus *Conus*.** *Zoology*. 42:168-171.
- Kohn, A. J. 1985. **Evolutionary Ecology of *Conus* on Indo-Pacific Coral Reefs.** *Proc. Fifth Int, Coral Reef Cong.* 4:139-144.
- Kohn, A. J., Omori, M., Yamakawa, H. y Koike, Y. 2001. **Maximal Species Richness in *Conus*: Diversity, Diet and Habitat on Reefs of Northeast Papua New Guinea.** *Coral Reefs* 20:25-38.
- Lewis, R. J., Nielsen, K. J., Craik, D. J., Loughnan, M. L., Adams, D. A., Sharpe, I. A., Luchian, T., Adams, D. J., Bond, T., Thomas, L., Jones, A., Matheson, J. L., Drinkwater, R., Andrews, P. R. y Alewood, P. F. 2000. **Novel  $\omega$ -conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes.** *J Biol Chem* 275:35335-35344.
- Lewis, R.L. y García, M. L. 2003. **Theapeutic Potential of Venom Peptides.** *Nature Reviews Drug Discovery*. 2:790:802.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, A.C., Krieger, M., Scott, P. M., Bretscher, A. y Ploegh, H. 2008. **Molecular Cell Biology.** 6ta Edición. Freeman. 1150 pp.
- Marshall, J., Kelley, W. P., Rubakhin, S. S., Bingham, J. P., Sweedler, J. V. y Gilly, W. F. 2002. **Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus*.** *Biol. Bull.* 203:27-41.
-

- Martínez, O. 2010. **Caracterización Bioquímica del Veneno del Caracol Marino *Conus regularis***. Tesis de Maestría. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada*. Ensenada, B.C., México. 61 pp.
- McIntosh, J. M., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Dooley, D. J., Stoehr, S. J., Giordani, A. B., Naisbitt, S. R. y Olivera, B. M. 1982. **Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus***. *Arch Biochem Biophys* 218:329-334.
- McIntosh, J.M., Santos, A. D. y Olivera B. M. 1999. ***Conus* Peptides Targeted to Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes**. *Annual Review of Biochemistry*. 68: 59-88.
- McIntosh, J. M. y Jones, R. M. 2001. **Cone Venom- From Accidental Stings to Deliberate Injection**. *Toxicon*. 39: 1447-1451.
- Nakamura, H., Kobayashi, J., Ohizumi, Y. e Hirata, Y. 1982. **The occurrence of arachidonic acid in the venom duct of the marine snail *Conus textile***. *Experientia* 39: 897.
- Olivera, B. M. 1997. ***Conus* peptides, receptor and ion channel targets and drug design: 50 million years of neuropharmacology**. *Mol Biol Cell* 8:2101-2109.
- Olivera, B. M. y Cruz, L. J. 2001. **Conotoxins, in Retrospect**. *Toxicon*. 39: 7-14.
- Parra, I. 2011. **Aislamiento e Identificación de Agentes Citotóxicos Provenientes del Caracol Marino *Conus ximenes* con Actividad contra una Línea Celular de Cáncer de Colon (LIM-1215)**. Tesis de Maestría.
-

*Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.*  
Ensenada, B.C., México. 57 pp.

Peng, C., Liu, L., Shao, X., Chi, C. y Wang, C. 2008. **Identification of a Novel Class of Conotoxins Defined as V-conotoxins with a Unique Cysteine Patterns and Signal Peptide Sequence.** *Peptides*. 29:985-991.

Terlau, H. y Olivera, B. M. 2004. **Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides.** *Physiol. Rev.* 84:41-68.

Smith, M. T., Cabot, P. J., Ross, F., Robertson, A. D. y Lewis, R. J. 2002. **The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices.** *Pain* 96:119-127.

#### **Páginas electrónicas:**

	Consultado en:
<a href="http://biology.burke.washington.edu/Conus/index.php">http://biology.burke.washington.edu/Conus/index.php</a>	Julio 2010
<a href="http://www.seashell-collector.com/beginners/CONIDAE.jpg">http://www.seashell-collector.com/beginners/CONIDAE.jpg</a>	Julio 2010
<a href="http://www.spacecoastmedicine.com/2009/11/cone-snail-venom-effective-remedy-for-pain.html">http://www.spacecoastmedicine.com/2009/11/cone-snail-venom-effective-remedy-for-pain.html</a>	Mayo 2011
<a href="http://www.coneshell.net/pages/c_catus.html">http://www.coneshell.net/pages/c_catus.html</a>	Junio 2011
<a href="http://www.coneshell.net/pages/g_regularis2317.html">http://www.coneshell.net/pages/g_regularis2317.html</a>	Julio 2010
<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	Abril 2011
<a href="http://expasy.org/tools/ADN.html">http://expasy.org/tools/ADN.html</a>	Mayo 2011
<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/</a>	Septiembre 2011
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>	Octubre 2011

---

## XII. ANEXO

---

### Mezcla Maestra

2 µl 5x Buffer de la primera cadena

0.25 µl DTT (100 m)

1 µl Mezcla dNTP

1 µl Cebador SMARTer II A (12 µM)

5'-**AGGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX**- 3' donde X= a una base no descrita propiedad de la secuencia SMARTer.

0.25 µl Inhibidor de RNAsa

1 µl Transcriptasa reversa SMARTscribe