

Tesis defendida por
JOHANNA BERNÁLDEZ SARABIA
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director del Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Miembro del Comité

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez
Miembro del Comité

Dr. Rogelio Hernández Pando
Miembro del Comité

Dr. Tomás Benjamín Rentería
Evangelista
Miembro del Comité

Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador
Programa de Posgrado en Ciencias de
la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

08 de noviembre de 2013

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



Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida

Aislamiento y caracterización de toxinas de caracoles marinos del género *Conus*
con actividad en *Mycobacterium tuberculosis*

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Presenta:

Johanna Bernáldez Sarabia

Ensenada, Baja California, México, 2013

Resumen de la tesis de Johanna Bernáldez Sarabia, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Aislamiento y caracterización de toxinas de caracoles marinos del género *Conus* con actividad en *Mycobacterium tuberculosis*

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navaro

La enfermedad de la tuberculosis es considerada la causa principal de muerte por un solo agente infeccioso (*Mycobacterium tuberculosis*). Se estima que la tercera parte de la población mundial es portadora del bacilo de la tuberculosis (WHO Report 2006). En el año 2011, Baja California reportó el mayor número de defunciones en el país por TB pulmonar. La permanencia de esta micobacteria a través de la historia, se puede vincular a la quimioterapia actual, que ha resultado ser una profilaxis muy compleja, con la administración de 4 fármacos por un periodo de 6 a 8 meses. Por lo tanto, este proyecto se enfocó en la búsqueda de moléculas de origen marino con potencial para su futura aplicación en la terapia contra la tuberculosis. Se realizó la caracterización bioquímica y biológica de los venenos de los caracoles *C. californicus*, *C. ximenes* y *C. regularis*. Donde fueron identificados dos moléculas de origen proteico que lograron inhibir el crecimiento *in vitro* del bacilo, nombradas xm1a y cal26a, aisladas de *C. ximenes* y *C. californicus*, respectivamente. Los resultados mostraron que cal26a logra inhibir a la cepa H37Rv con una MIC de 4.08 µg/ml, mientras que xm1a presentó una MIC de 44.12 µg/ml. Las características de la estructura primaria de cal26a, indican que contiene 4 enlaces disulfuro, 4 prolinas modificadas y su C-terminal amidado. Esta complejidad estructural dirigió el trabajo a su clonación empleando la técnica RACE, para conocer el gen completo con la intención de identificar la región del propéptido que pudiera orientar a conocer el plegamiento nativo de la conotoxina. En este trabajo se clasificó a cal26a como miembro de una nueva familia que pertenece a la superfamilia –O. Para xm1a, se observó una estructura menos compleja, con 2 enlaces disulfuro, y la amidación del C-terminal. Por lo tanto, la síntesis química de la molécula fue la mejor opción para obtenerla en grandes cantidades que nos permitiera realizar un ensayo preliminar de tuberculosis progresiva en un modelo murino. Los resultados indican que xm1a inhibe el crecimiento de la cepa H37Rv significativamente al segundo mes de tratamiento. Lo que colocan a xm1 como nuestro mejor candidato para futuros estudios, enfocados en su incorporación al tratamiento con antibióticos convencionales para evaluar su actividad sinérgica y su comportamiento en cepas MDR.

Palabras clave: **conotoxina, tuberculosis, fármacos anti-tuberculosis.**

Abstract of the thesis presented by Johanna Bernáldez Sarabia as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Isolation and characterization of toxins from marine snails of the genus *Conus* with activity in *Mycobacterium tuberculosis*

Summary accepted by:

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navaro

Tuberculosis disease is considered the leading cause of death from a single infectious agent (*Mycobacterium tuberculosis*). It is estimated that one-third of the world population carries the tuberculosis bacillus (WHO Report 2006). In 2011, Baja California reported the largest number of deaths in the country for pulmonary TB. The permanence of this mycobacteria through history can be linked to current chemotherapy, which has been proven to be a very complex prophylaxis with 4 drugs administration for a period of 6 to 8 months. Therefore, this work focused on the search for marine molecules with potential for future application in tuberculosis therapy. We performed biochemical and biological characterization of the venoms of snails *C. californicus*, *C. ximenes* and *C. regularis*. Two molecules of protein origin were identified, which were able to inhibit the *in vitro* growth of bacilli and named xm1a and cal26a, these proteins were isolated from *C. ximenes* and *C. californicus*, respectively. The results showed that cal26a inhibits to H37Rv strain with a MIC of 4.08 µg/ml, while xm1a provided a MIC of 44.12 µg/ml. Primary structure of cal26a shows 4 disulfide bonds, 4 modified prolines and C-terminal amidated. This structural complexity led to cloning work using RACE technique, to determine the complete gene identifying the propeptide region that could orient to know the native folding of conotoxin. In this work, cal26a was classified as a new family member that belongs to superfamily –O. For xm1a, there was a less complex structure, with two disulfide bonds and a C-terminal amidation. Therefore, chemical synthesis of this molecule was the best choice for obtaining large quantities to conduct a preliminary test of progressive tuberculosis in a murine model. The results indicate that xm1a inhibits growth of strain H37Rv significantly after two months of treatment. This placed to xm1a as our best candidate for future studies focused on inclusion of this peptide to the conventional antibiotic therapy to assess their synergistic activity and behavior on MDR strains.

Keys words: **conotoxin, tuberculosis, anti-tuberculosis drugs.**

Por que sólo tu conoces los secretos del mar
Por que me brindaste la oportunidad de conocerte
Por darme las mejores lecciones y tantas enseñanzas
Por la tranquilidad con que siempre me recibes
Hoy solo quiero agradecerlo

Esta tesis es dedicada a mis hermanos **ALFREDO C., NOELY, CARLOS ALFREDO y B. ROXANNA** por darle sentido a este nuevo ciclo de mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado... gracias por brindarme la fortaleza e inspiración necesaria para culminar esta tesis.

Agradecimientos académicos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por el apoyo, instalaciones y facilidades otorgadas durante el doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A mi director de tesis, Dr. Alexei F. Licea Navarro, por realmente guiar y direccionar este proyecto por tantos años. Te agradezco todo el interés, apoyo y dedicación a mi tesis.

A los miembros del comité de tesis: Dra. Elizabeth Ponce Rivas, Dra. Iris Estrada García, Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. Tomás Rentería Evangelista y Dr. Manuel Aguilar Ramírez por ser unos excelentes sinodales, agradezco infinitamente todos sus valiosos consejos, correcciones y apoyo académico y personal durante este proyecto.

Al Dr. Hernández Pando por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y ser parte de su gran equipo de trabajo.

Al Dr. Rentería Evangelista por facilitarme las instalaciones y equipo en su laboratorio.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón, Dra. Karla Cervantes, Dr. Jorge Barrios y Dra. Dulce Mata por su orientación y consejos en el desarrollo de los experimentos de este proyecto.

Al M. en C. Eduardo Morales por ser un Técnico clave en el desarrollo de este trabajo. Agradezco mucho el apoyo brindado en las purificaciones por HPLC. Gracias por tantas horas compartidas.

A los compañeros de laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE por su gran ayuda en las colectas de trabajo; gracias por compartir sus conocimientos y materiales: Karla C., Samanta, Noemí, Irasema, Paola, Andrea, Ricardo, Félix, Tanya y Pavel.

A los compañeros de laboratorio en el INNSZ, Zyanya, Fernanda, Yadira, Héctor, Jazmín, Vasti, Nesti, Adrián, Eren y Gladys por todo el apoyo brindado en mi estancia en su laboratorio. Gracias por compartir sus conocimientos y tiempo, por enriquecer mi estancia de trabajo con todos sus consejos.

A todo el personal administrativo, Lupita Martínez, Adriana Mejía, Yolanda Rivas y Viviana Oloño, por todo su apoyo y comprensión en la facilitación de los trámites administrativos.

Agradecimientos personales

Agradecimiento a los pilares de mi vida, gracias por su presencia eterna...

A cada pedacito del Chato y de mi mom...que son los mejores regalos de la vida. Gracias Alfredo C., Noely, Carlos A., y Roxanna por hacerme muy feliz.

A Alexei por todo lo que representas en mi vida. Por ser mi amigo y parte importante de esta etapa.

A personas clave en este ciclo: Samanta, Mimiss y Karlita, gracias por estar "ahí", unas veces platicándonos, otras simplemente "estando". Les agradezco mucho su presencia en los momentos buenos y malos en todo este tiempo.

Contenido

	Página
Resumen español.....	II
Resumen inglés.....	III
Dedicatorias.....	IV
Agradecimientos académicos.....	VI
Agradecimientos personales.....	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIV
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 Biología de las micobacterias.....	4
2.2 Proteínas de transporte en micobacterias.....	5
2.3 Fármacos antifímicos en uso.....	8
2.4 Nueva generación de fármacos anti-tuberculosis.....	9
2.5 Animales venenosos como fuente potencial de nuevos fármacos.....	10
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	14
5. Objetivo general.....	15
6. Objetivos particulares.....	15
7. Metodología.....	16
7.1 Obtención de los especímenes.....	16
7.2 Manipulación del veneno.....	16
7.3 Fraccionamiento de los venenos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP).....	17
7.4 Caracterización biológica de las fracciones de venenos en cepas de <i>M. tuberculosis (in vitro)</i>	18
7.4.1 Uso del método colorimétrico para evaluar la susceptibilidad de la cepa H37Rv expuesta a las fracciones venenosas.....	18
7.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	20
7.5 Caracterización bioquímica de las conotoxinas.....	20
7.6 Obtención del gen <i>cal6.7</i> , que codifica la conotoxina con actividad anti-TB, encontrado en la especie <i>C. californicus</i>	20
7.6.1 Extracción del ARN total de los ductos venenosos....	21
7.6.2 Diseño de cebadores y condiciones de PCR.....	22
7.6.3 Amplificación rápida de los extremos de ADNc (siglas en inglés de RACE).....	26
7.6.4 Manipulación enzimática del ARN para el 5' RACE...	28
7.6.5 Síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN total para 5' RACE.....	29
7.6.6 PCR 5' RACE externo.....	29
7.6.7 PCR 5' RACE interno.....	29

7.6.8 Síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN total para 3' RACE.....	30
7.6.9 PCR 3' RACE externo.....	30
7.6.10 PCR 3' RACE interno.....	30
7.6.11 Pureza de los productos de PCR.....	30
7.6.12 Técnica T/A para clonar los productos de PCR.....	31
7.6.13 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	32
7.6.14 Verificación del tamaño del inserto en las colonias..	34
7.6.15 Extracción de plásmido mediante lisis alcalina.....	35
7.6.16 Análisis de las secuencias obtenidas.....	35
7.7 Evaluación de la toxina sintética xm1b, en un modelo murino de enfermedad progresiva de tuberculosis.....	37
7.7.1 Procedimiento de infección intratraqueal.....	37
7.7.2 Cuantificación de bacterias vivas en el pulmón por determinación de unidades formadoras de colonias (UFC).	38
8. Resultados.....	40
8.1 Obtención de los especímenes.....	40
8.2 Extracción del veneno.....	42
8.3 Purificación de los componentes del veneno.....	42
8.4 Caracterización bioquímica y biológica de las conotoxinas aisladas de las diferentes especies de trabajo.....	44
8.4.1 <i>Conus regularis</i> : fraccionamiento del veneno y evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicobacteriana de sus componentes.....	44
8.4.2 <i>Conus californicus</i> : fraccionamiento del veneno y evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicobacteriana de sus componentes.....	48
8.4.2.1 Estructura primaria de la conotoxina cal26a (fracción F6.7).....	53
8.4.2.2 Clonación del gen cal26a correspondiente a una conotoxina nativa de <i>C. californicus</i>	55
8.4.2.2.1 Extracción e integridad del ARN.....	55
8.4.2.2.2 Optimización del diseño y uso de oligonucleótidos.....	57
8.4.2.2.2.1 Amplificación del extremo 5' usando oligonucleótidos Ccal1R y Ccal2R.....	57
8.4.2.2.2.2 Amplificación del extremo 3' usando oligonucleótidos Ccal1F y Ccal2F.....	59
8.4.2.2.2.3 Amplificación del extremo 5' usando oligonucleótidos Ccal1ER y Ccal1R.....	62
8.4.2.2.2.4 Amplificación del extremo 3' usando oligonucleótidos Ccal1EF y Ccal1F.....	63
8.4.2.2.2.5 Amplificación del extremo 5' usando oligonucleótidos Ccal3ER y Ccal3IR.....	67
8.4.3 <i>Conus ximenes</i> : fraccionamiento del veneno y evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicobacteriana de sus componentes.....	75

8.4.3.1 Evaluación de la toxina sintética xm1b mediante cuantificación de bacterias vivas en el pulmón del modelo murino.....	87
9. Discusión.....	90
9.1 Caracterización bioquímica y biológica de la conotoxina cal26a.....	90
9.2 Caracterización bioquímica y biológica de la conotoxina xm1b.....	97
Conclusiones.....	103
Referencias bibliográficas.....	105

Lista de figuras

Figura		Página
1	Gráfica que muestra la morbilidad por tuberculosis pulmonar en México en el año 2011	2
2	Envoltura celular de las micobacterias	4
3	Estructura tridimensional del canal MscL presente en la membrana de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	7
4	Fármacos antifímicos de primera línea y los mecanismos de acción	9
5	Clasificación de los componentes del veneno de los <i>Conus</i>	12
6	Esquema de ensayo colorimétrico en microplaca	19
7	Esquema general de la posición de los cebadores provistos por el kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion) y los diseñados a partir de la toxina madura cal6.7	25
8	Esquema generalizado del kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion)	27
9	Mapa del vector linealizado pGEM®-T	32
10	Esquema general del tratamiento en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva	38
11	Fotografía del caracol marino <i>Conus californicus</i>	40
12	Fotografía del caracol marino <i>Conus regularis</i>	41
13	Fotografía del caracol marino <i>Conus ximenes</i>	41
14	Perfil cromatográfico del extracto total del veneno de <i>C. regularis</i> , aislado de ductos venenosos	42
15	Perfil cromatográfico del extracto total del veneno de <i>C. californicus</i> , aislado de ductos venenosos	43
16	Perfil cromatográfico del extracto total del veneno de <i>C. ximenes</i> , aislado de ductos venenosos	43
17	Fotografía de la microplaca que muestra la evaluación de las 12 fracciones del veneno de <i>C. regularis</i>	45
18	Fragmentos del perfil cromatográfico del veneno total de <i>C. regularis</i>	46
19	Sección de microplaca que muestra los resultados obtenidos al exponer a las subfracciones F7.1 - F7.7, contra la cepa H37Rv	47
20	Perfil cromatográfico de la repurificación de la subfracción F7.3; subfracción F7.5; y subfracción F7.7 del veneno de <i>C. regularis</i> .	48
21	Sección de microplaca que muestra a la fracción F6, comprendida por los minutos 30 al 35	49
22	Sección de perfil cromatográfico del extracto total del veneno de <i>C. californicus</i> que muestra las siete subfracciones (F6.1 a F6.7) incluidas en los minutos 30 al 35	50
23	Sección de microplaca que muestra los resultados obtenidos al exponer a la fracción F6.7 y a la fracción control F6, contra la cepa H37Rv	50

24	Perfil cromatográfico de la repurificación del minuto 35.6 al 35.9 del veneno de <i>C. californicus</i>	51
25	Evaluación de la MIC de los picos F6.7.1 y F6.7.2 y los fármacos Estreptomicina (SM), Isoniazida (INH) y Etambutol (EMB)	52
26	Secuencia primaria parcial del péptido F6.7, obtenido mediante la degradación de Edman	53
27	Secuencia primaria parcial del péptido F6.7 (1) alineada con la secuencia de la toxina cl tx-4 (2)	54
28	Electroforesis de ARN de ductos venenosos de <i>C. californicus</i> , en amortiguador TAE 1X, para evaluar la integridad del material biológico	56
29	Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se ve la migración de varias bandas amplificadas	57
30	Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (1 mg/ml) que muestra el producto de la PCR con los cebadores 5' RACE interno y Ccal2R	59
31	Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (1 mg/ml), donde se muestran los productos de PCR usando los cebadores CcalF y 3' RACE externo; y los cebadores Ccal2F y 3' RACE interno	60
32	Gel de agarosa que muestra los productos de PCR donde se usaron los cebadores Ccal2F y 3' RACE interno a diferentes temperaturas de alineamiento	61
33	Gel de agarosa con la PCR usando los cebadores externos 5' RACE y CcalER; y el uso de los cebadores internos 5' RACE y CcalIR	63
34	Geles de agarosa que muestran los resultados de las PCRs donde se usaron dos juegos de cebadores	64
35	Geles de agarosa con los productos de PCR que muestran, en inciso A) el gradiente de concentración de MgCl ₂	65
36	Reamplificación de 5 fragmentos de PCR elegidos para ser clonados	66
37	Secuencia parcial nucleotídica y secuencia parcial deducida de aminoácidos del ADNc del gen <i>cal26a</i>	67
38	Geles de agarosa que muestran los productos de PCR, usando los cebadores 5' RACE externo y Ccal3ER; los cebadores internos 5' RACE y Ccal3IR	68
39	Geles de agarosa que muestran los productos de las PCRs usando los cebadores 5' RACE externo y Ccal3ER	69
40	Productos de PCR de las colonias utilizando oligonucleótidos específicos M13F y M13R	70
41	Secuencia nucleotídica y de aminoácidos que corresponden al precursor peptídico de cal26a, donde también se incluye la región 3' hasta su poliadenilación	71
42	Predicción del péptido señal de cal26a empleando el programa SignalP-4.0	72

43	Secuencia nucleotídica y de aminoácidos que corresponden al precursor peptídico de cal26a, donde también se incluye la región 3' hasta su poliadenilación	73
44	Alineación de 7 precursores peptídicos con el programa ClustalW	74
45	Alineamiento en ClustalW de los precursores peptídicos cal26a y cal12.1.1a	75
46	Sección de microplaca que incluye a las 6 fracciones que mostraron inhibir el crecimiento de la cepa H37Rv	76
47	Perfil cromatográfico del veneno total de <i>C. ximenes</i> , donde se muestran las subfracciones incluidas en los minutos 25 al 60	76
48	Sección de microplaca que muestra las MICs de 8 subfracciones evaluadas frente a la cepa H37Rv	77
49	Repurificación cromatográfica de las fracciones F3-F6, donde se obtuvieron 9 subfracciones	79
50	Bioensayo para determinar la MIC de las fracciones F3-F6.1 a F3-F6.9, expuestas a la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i>	80
51	Perfil cromatográfico obtenido para F3-6.3 y F3-6.4	81
52	Secuencia primaria del péptido F3-F6.7, obtenida en el análisis de espectrometría de masas con ionización por electroespray (ESI-MS por sus siglas en inglés) y confirmado por degradación de Edman	82
53	Alineamiento de la secuencia F3-F6.7 y la α -CTX lml, empleando el programa ClustalW	82
54	Perfil cromatográfico obtenido de la fracción F14, donde se reportaron 12 subfracciones	83
55	Bioensayo para evaluar la MIC de los picos F14.1 y F14.2, expuestas a la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i>	85
56	Diagrama que resume el trabajo realizado para las fracciones F3-F6 y F14 de <i>C. ximenes</i>	86
57	Evaluación de la cepa H37Rv <i>in vivo</i> , retada con la conotoxina xm1b	88

Lista de tablas

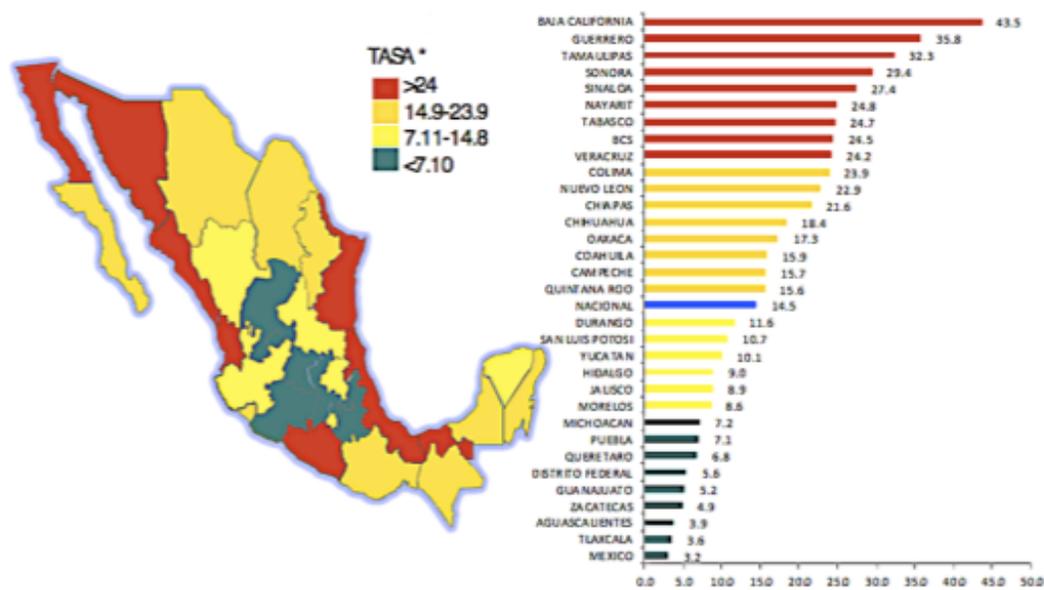
Tabla		Página
1	Lista actualizada de fármacos antifúngicos convencionales: de primera y segunda línea	10
2	Características de la estrategia empleada en el fraccionamiento de los componentes de los diferentes venenos	17
3	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen <i>cal6.7</i>	24
4	Características del lote generado para la repurificación de las fracciones F7.3, F7.5 y F7.7	47
5	Descripción del código empleado para cada una de las subfracciones y la concentración o rango de concentración al que la fracción mostró actividad	78
6	Concentración empleada en el bioensayo de las fracciones F3-F6.1 a F3-F6.9	79
7	Concentración empleada en el bioensayo de los picos F14.1 a F14.12	84
8	Lista de patrones de cisteínas encontrados en las conotoxinas y lo reportado de sus conectividades y blancos moleculares	93

1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una de las patologías infecciosas más antiguas de la historia humana. Es considerada la causa principal de muerte por un solo agente infeccioso (*Mycobacterium tuberculosis*) y la segunda después del SIDA (Frieden *et al.*, 2003).

Se estima que la tercera parte de la población mundial es portadora del bacilo de la tuberculosis (WHO Report 2006), causando unos dos millones de fallecimientos anuales. Aunque la TB tiene mayor incidencia en países poco desarrollados, ninguna región del mundo se encuentra exenta de la presencia de infecciones causadas por la micobacteria. La Secretaría de Salud en México informó que el Estado con mayor incidencia de casos de tuberculosis pulmonar es Baja California (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2012). Cabe señalar que Baja California triplica la tasa nacional (14.5) con una morbilidad de 43.5 por cada 100 mil habitantes, figura 1. En el año 2011, Baja California reportó el mayor número de defunciones en el país por TB pulmonar.

Incidencia de tuberculosis pulmonar, México 2011



Fuente: Plataforma única de información, módulo tuberculosis

Figura 1. Gráfica que muestra la morbilidad por tuberculosis pulmonar en México (2012). Recuperado y modificado de www.programassociales.org.mx/sustentos/Veracruz834/archivos/Situacion-de-la-TB-en-Veracruz

La quimioterapia actual ha resultado ser una profilaxis compleja, mediante el uso de 5 ó 6 fármacos administrados de forma conjunta por periodos de 6 a 8 meses de tratamiento. En este contexto, la información del Instituto de Servicios de Salud Pública del Estado de Baja California (Isesalud) indica que las muertes por este padecimiento van en aumento (http://www.saludbc.gob.mx/wp-content/uploads/2011/02/IMSS_070_08_EyR.pdf). Tomando los últimos datos del 2011, se ha registrado un total de 1759 muertes a causa de la tuberculosis pulmonar. Ese año, México reportó una tasa nacional de 1.6 por cada 100, 000 habitantes, donde específicamente Baja California reportó una tasa de 5.99. En este contexto, podemos aseverar que existe una necesidad urgente de descubrir y desarrollar nuevos fármacos contra la TB, que sean dirigidos hacia nuevos blancos moleculares que controlen procesos vitales de la micobacteria.

Por otro lado, los organismos que emplean venenos como parte de su defensa natural contra sus depredadores o para la captura de sus presas, presentan un repertorio muy amplio de toxinas contenidas en sus venenos. En la actualidad, se ha dado gran relevancia al estudio de estas toxinas como fuente potencial en el desarrollo de nuevos fármacos. Principalmente, esto se debe a que cada uno de los componentes de los venenos presentan funciones biológicas distintas, y en muchos casos, son dirigidos específicamente a isoformas de sus blancos moleculares, como canales iónicos o receptores de membrana (Terlau & Olivera, 2004; Xie *et al.*, 2003). Debido a lo anterior, este proyecto está enfocado a la búsqueda de moléculas de origen marino con potencial para su futura aplicación en la terapia contra la tuberculosis.

2. Antecedentes

2.1 Biología de las micobacterias

La característica morfológica más sobresaliente del género *Mycobacterium*, es atribuida a su envoltura celular. Como se muestra en la figura 2 la envoltura celular está compuesta por una membrana plasmática, una pared celular y una membrana externa (o cápsula, en el caso de especies patógenas). La membrana plasmática presenta la peculiaridad de contener algunos lipopolisacáricos, comunes en todos los actinomicetales (Mahapatra, 2005).

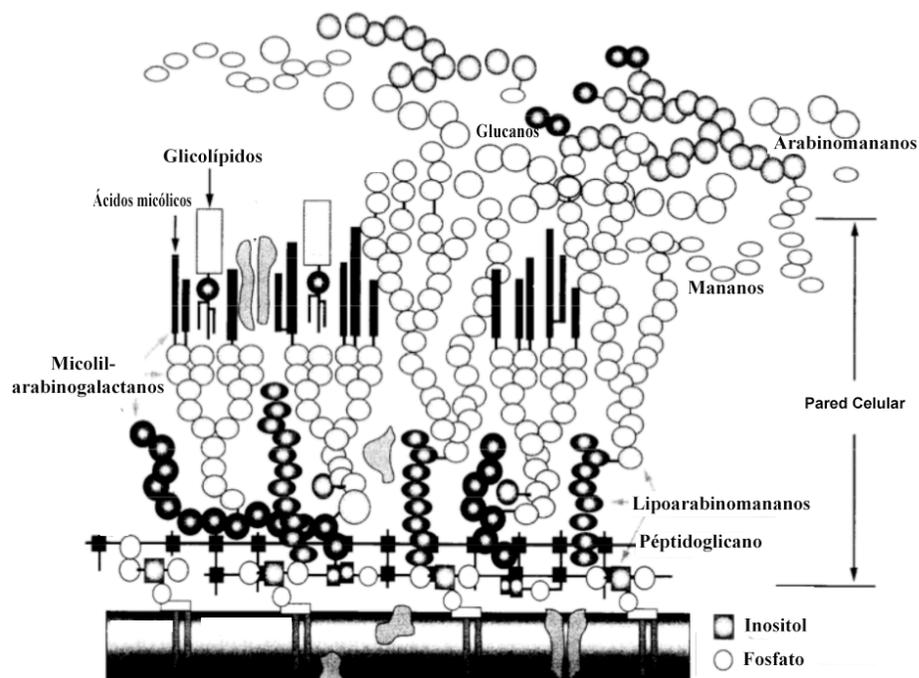


Figura 2. Envoltura celular de las micobacterias. Está compuesta de una membrana interna, una pared celular compuesta de peptidoglicanos, arabinogalactanos y ácidos micólicos; así como una membrana externa o cápsula de 9-10 nm de grosor, compuesta de glucanos, arabinomananos y mananos. Modificado del Chartterje (1997) p. 581.

La constitución de la pared celular de *M. tuberculosis* es una de las más complejas entre las procariontas. Es dos veces más gruesa y fuerte que la de las bacterias Gram positivas y constituye una verdadera coraza lipídica, difícilmente penetrable, que otorga a la micobacteria su típica resistencia a la acción del alcohol y los

ácidos (Madigan *et al.*, 1999). Consiste de un esqueleto conformado por peptidoglicanos que están unidos mediante enlaces covalentes a un polímero de arabinogalactanos. A su vez, los arabinogalactanos se encuentran unidos mediante enlaces covalentes a ácidos micólicos, compuestos de largas cadenas de 60 a 90 átomos de carbono. A este respecto, se ha demostrado que los ácidos micólicos forman una barrera protectora altamente eficiente, confiriéndole a la micobacteria, su típica resistencia a la mayoría de los antibióticos, agentes quimioterapéuticos y desinfectantes químicos (Brennan *et al.*, 1995). A la fecha, los ácidos micólicos producidos por las micobacterias son los ácidos grasos más largos identificados en la naturaleza. El complejo lípido-polisacárido-peptidoglicano, proporciona el carácter hidrofóbico a la superficie de la célula.

La cápsula comprende del 2 al 3% de peso seco de la micobacteria. Los componentes individuales son polisacáridos (como glucanos, arabinomananos, mananos y xilanos), proteínas de gran número de especies moleculares, y en menor cantidad algunos lípidos (Ortalo *et al.*, 1995). Se ha sugerido que estos constituyentes de la cápsula, pueden ser modificados después de una infección de la micobacteria en una célula hospedera como mecanismo de protección (Abdallah *et al.*, 2007).

2.2 Proteínas de transporte en micobacterias

La compleja organización de la envoltura celular de las micobacterias, actúa como barrera impidiendo que la mayoría de los agentes antimicrobianos sean capaces de difundirse a través de la membrana celular. Por lo tanto, los movimientos de casi todos los iones y moléculas a través de la membrana celular, son mediados por las proteínas transportadoras como las porinas, canales mecano sensibles de alta conductibilidad (MscL) y proteínas de influjo/eflujo, que se encuentran embebidas en los diferentes niveles de las membranas y pared celular de la micobacteria, favoreciendo la viabilidad celular (Niederweis *et al.*, 2010; Yefimov *et al.*, 2008).

Las porinas en el género *Mycobacterium* fueron descubiertas cuando se observó la difusión de azúcares y aminoácidos dentro de vesículas lipídicas, después de la reconstrucción de una pared celular del extracto de *M. chelonae* (Trials *et al.*,

1992). Posteriormente, la proteína fue purificada demostrando su actividad como canal.

Las porinas de *M. tuberculosis* son esenciales en la captura de nutrientes y son consideradas como proteínas clave en el influjo de fármacos hidrofílicos. Esto es importante debido a que 3 de los 4 fármacos antifímicos de primera línea (isonizida, etambutol y pirazinamida), son moléculas pequeñas e hidrofílicas (Lambert, 2002).

La MspA es la porina más abundante en *Mycobacterium smegmatis*, actuando como intercambiador de solutos hidrofílicos a través de la pared celular. La porina MspA posee una estructura tetramérica con un poro central de 10 nm de longitud. El canal está constituido principalmente por hojas beta plegadas antiparalelas, lo que le proporciona una mayor estabilidad en relación a todas las porinas conocidas en las bacterias Gram negativas (Heinz *et al.*, 2003).

Una proteína transmembranal relacionada a bacterias Gram negativas y de la cual se ha encontrado su homólogo en micobacterias es la porina OmpA, denominada OmpATb. En relación a esta porina, diversos estudios han evidenciado una fuerte inducción de la transcripción del gen ompATb a pH bajo (30 veces) y en macrófagos (5 veces). Esto sugiere que la acidificación del fagosoma es la señal que acelera el mecanismo de defensa dependiente de OmpATb, presente en *M. tuberculosis*. De esta manera, la porina OmpATb es una de las proteínas consideradas como factor virulento asociado a la membrana externa de la micobacteria (Raynaud *et al.*, 2002).

Otro de los canales presentes en micobacterias es el canal mecanosensible de alta conductibilidad (MscL), mostrado en la figura 3. Los canales mecanosensibles son proteínas ubicuas ampliamente distribuidas en bacterias así como organismos superiores. La implicación de estos canales posibilita a las células a responder frente a estímulos como el sonido, tacto, gravedad y presión (Chang *et al.*, 1998). Varios estudios han confirmado la importancia de este canal para la osmorregulación en bacterias. Una bacteria expuesta a un cambio osmótico considerable incrementa la tensión de la membrana, lo que lleva a la lisis celular a

menos que el gradiente osmótico pueda ser revertido. Bajo estas circunstancias, el canal mecanosensible permite el transporte de potasio y otros osmoprotectores para ser excretados por la célula (Blount *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 1998; Ajouz *et al.*, 1998). En *E. coli* y *B. subtilis* la expresión del canal es inducida en respuesta a alta concentración de sal y al inicio de la fase estacionaria, anticipando cambios osmóticos (Haswell *et al.*, 2011).

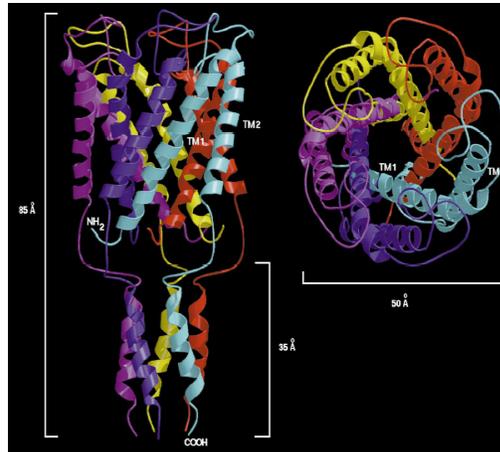


Figura 3. Estructura tridimensional del canal MscL presente en la membrana de *Mycobacterium tuberculosis*. A la izquierda se muestra una vista lateral y a la derecha se observa una vista frontal del canal MscL. De Chang *et al.*, (1998) 2223 p.

La organización estructural del canal mecanosensible en *M. tuberculosis* comprende una estructura homopentamérica de 85 Å de longitud. Cada subunidad de 151 residuos está constituida por dos α hélices transmembranales (TM1 y TM2) de 50 Å de largo y una α hélice citoplasmática que se extiende 35 Å por debajo de la bicapa (Finney *et al.*, 2001). Las hélices TM1 están arregladas para bloquear la difusión a través del canal en sus extremos amino; esta región también exhibe secuencias altamente conservadas. Una región de cruce (o *loop*, en inglés) entre TM1 y TM2 se extiende en el poro, lo cual puede contribuir a la conductividad del canal. La estructura del poro del canal exhibe similitud a lo reportado para el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR, por sus siglas en inglés). Donde la TM1 del MscL y la M2 del nAChR presentan similitud en la orientación, empaquetamiento de la hélice y ángulo de inclinación (Chang *et al.*, 1998). La

escisión de los dominios citoplásmicos tiene poco efecto en la apertura del canal (Ajouz *et al.*, 2000; Gullingsrud *et al.*, 2001).

2.3 Fármacos antifímicos en uso

La quimioterapia frente a la TB comenzó en los años 40 del siglo pasado, con el descubrimiento de agentes terapéuticos como la estreptomicina (abreviada como ST, descubierta en 1944), la isoniazida (INH, 1952), la pirazinamida (PZA, 1952), el etambutol (EMB, 1961) y la rifampicina (RIF, 1966). Estos agentes terapéuticos en conjunto, lograron a convertir a la tuberculosis en una enfermedad controlable.

Actualmente, la quimioterapia de la TB se ha ido complicando, especialmente por la presencia de cepas Resistentes a Múltiples Drogas (MDR). Que por definición se refiere a las cepas que son resistentes a fármacos como INH y RIF, lo que dificulta y alarga el tratamiento administrado. En general, los fármacos utilizados para el tratamiento incluyen a agentes de amplio y de reducido espectro, así como combinaciones de varios medicamentos que pueden llegar a ser hasta cinco, dependiendo del tipo de infección.

Los fármacos antifímicos suelen agruparse en dos bloques principales:

- 1) Agentes de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB) y estreptomicina (ST).
- 2) Agentes de segunda línea: etionamida (ETH), ácido *p*-aminosalicílico (PAS), cicloserina (CS), capreomicina (CPR), kanamicina (KAN), clofazimina (CFZ), ofloxacino (OFL) rifabutina (RFB) y por último, rifapentina (RFP).

La clasificación anterior se basa en la eficacia, potencia y efectos secundarios de los fármacos. Por lo tanto, un fármaco es considerado de segunda línea por ser menos efectivo que los agentes incluidos en el primer bloque; por presentar mayores efectos secundarios; o por no encontrarse disponible en países desarrollados.

A pesar de que estos agentes terapéuticos han sido administrados a los pacientes con tuberculosis por muchos años, en la década pasada con la determinación del

genoma de *M. tuberculosis*, se proporcionaron los conocimientos fundamentales para entender los mecanismos de acción, como se muestra en la figura 4.

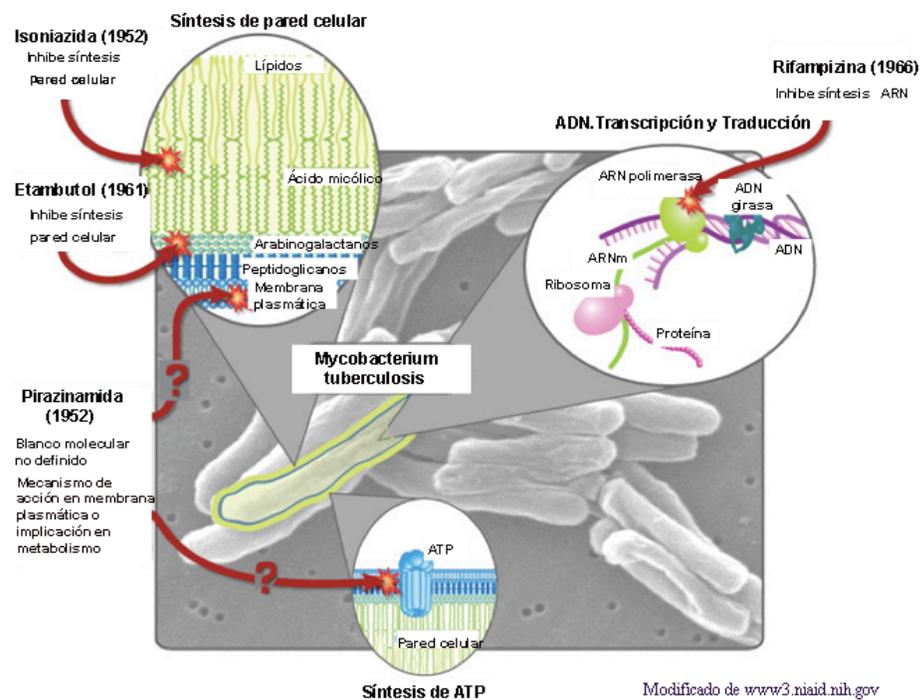


Figura 4. Fármacos antituberculosos de primera línea y los mecanismos de acción. La INH es un profármaco, que penetra por difusión, inhibiendo la síntesis de los ácidos micólicos presentes en la pared celular de la micobacteria. El mecanismo de acción de EMB no está bien identificado pero se ha postulado que interfiere en la síntesis de los arabinogalactanos, presentes en la pared celular. Para la PZA solo se ha demostrado que depende de una amidasa bacteriana para ser activada y es altamente específica contra TB. La RIF atraviesa la pared celular de la micobacteria y se une a la ARN polimerasa perturbando la síntesis del ARN bacteriano de forma selectiva. Modificado de <http://www3.niaid.nih.gov/SiteCollection/Images/topics/tuberculosis/tb1.jpg>

2.4 Nueva generación de fármacos anti-tuberculosis

En los últimos 30 años no se han adicionado nuevas moléculas como fármacos, a la listas de antituberculosos. Considerando que la tuberculosis humana sigue siendo una de las causas principales de muerte en el mundo. Esto ha provocado que en años recientes se hayan propuesto nuevas estrategias rápidas y seguras para la evaluación de nuevos fármacos. Algunas de estas moléculas ya se encontraban en el mercado como antibacterianos pero nunca antes habían sido expuestas a cepas micobacterianas. Otras más son moléculas nuevas de origen natural, que han sido

evaluadas como posibles candidatos a fármacos antituberculosos. A continuación se muestra una tabla donde se enlistan algunos de los fármacos anti-TB convencionales, así como los fármacos recientemente aprobados y los que se encuentran en ensayos clínicos (tabla 1).

Tabla 1. Lista actualizada de fármacos antifímicos convencionales: de primera y segunda línea. Se incluye a los fármacos recientemente aprobados y los que se encuentran en ensayos clínicos. Se enlista el nivel de actividad y el mecanismo de acción de cada uno de ellos. Modificado de Guy *et al.*, (2008) 402 p.

Fármaco	Nivel de actividad	Mecanismo de acción
Primera línea		
Isoniazida	bactericida	inhibe síntesis ácidos micólicos
Rifampicina	bactericida	inhibe ARN polimerasa
PZA	bactericida	desconocido
EMB	bacteriostático	inhibe enzima arabinosil transferasa
Segunda línea		
Etionamida	bacteriostático	inhibe síntesis ácidos micólicos
p-ácido aminosalicílico	bacteriostático	interfiere en síntesis ácido fólico en bacterias
Capreomicina	bactericida	inhibe síntesis de proteínas
Aminoglicósidos	bactericida	interrumpe síntesis de proteínas en bacterias
Fluoroquinolonas	bactericida	inhibe ADN girasa
Cicloserina	bacteriostático	inhibe síntesis de pared celular
Fármacos aprobados		
Metronidazol	bactericida	forma radicales reactivos que dañan ADN
Linezolid	bactericida	inhibe síntesis de proteína ribosomal
Clofazimina	bacteriostático	se une a ADN micobacterial
Sulbactam-ampicilina	bactericida	inhibe síntesis de proteínas en pared celular
Fármacos en ensayos clínicos		
		inhibe beta-lactamasas
PA-824	bactericida	inhibe síntesis de proteínas de pared celular
OPC-67683	bactericida	inhibe síntesis ácidos micólicos
TCM-207	bactericida	inhibe síntesis de bomba de ATP
SQ-109	bactericida	inhibe síntesis de pared celular

2.5 Animales venenosos como fuente potencial de nuevos fármacos

Los organismos terrestres y marinos, como víboras, escorpiones, caracoles marinos y anémonas, secretan venenos como parte de su defensa natural o para la captura de sus presas. Algunos componentes de esos venenos, como péptidos, han mostrado numerosas actividades biológicas como la inhibición de canales iónicos y receptores de membrana en diferentes tipos celulares.

En el año 2003, Xie y colaboradores reportaron un péptido de 60 aminoácidos extraído del veneno de la víbora *Naja atra*, que mostró actividad contra cepas MDRs de *Mycobacterium tuberculosis*, en ensayos *in vitro* (Xie *et al.*, 2003). Sin embargo, a la fecha no existen reportes adicionales que mencionen avances en el estudio de ese péptido con actividad anti-TB.

En el año 2004, se reportaron 88 compuestos que mostraron actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis* en ensayos *in vitro*. Los compuestos provenían principalmente de extractos de plantas terrestres, hongos, plantas marinas y una bacteria. Sin embargo, al realizarse los ensayos de citotoxicidad, la mayoría mostraron ser altamente citotóxicos en células epiteliales de mamífero (Okunade *et al.*, 2004).

Como antecedente directo de este trabajo, en el año 2005 se realizaron ensayos en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE, demostrándose que una fracción cromatográfica del veneno del caracol marino, *Conus californicus*, presentaba actividad anti-TB en ensayos *in vitro* (Munro, 2005).

El estudio de los componentes de los venenos de las aproximadamente 700 especies de caracoles marinos del género *Conus*, se ha visto intensificado en las últimas décadas. Las más de 2,000 publicaciones, indican características comunes para los componentes de sus venenos, llamadas conotoxinas. Estos péptidos son ligandos que afectan principalmente la función de moléculas de señalización en la membrana plasmática de las células. La mayoría de los blancos moleculares son específicamente subtipos de canales iónicos, localizados principalmente en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). De esta manera, los caracoles inyectan un coctel de conotoxinas y otras moléculas para inmovilizar a su presa, para defenderse y contra competidores, figura 5.

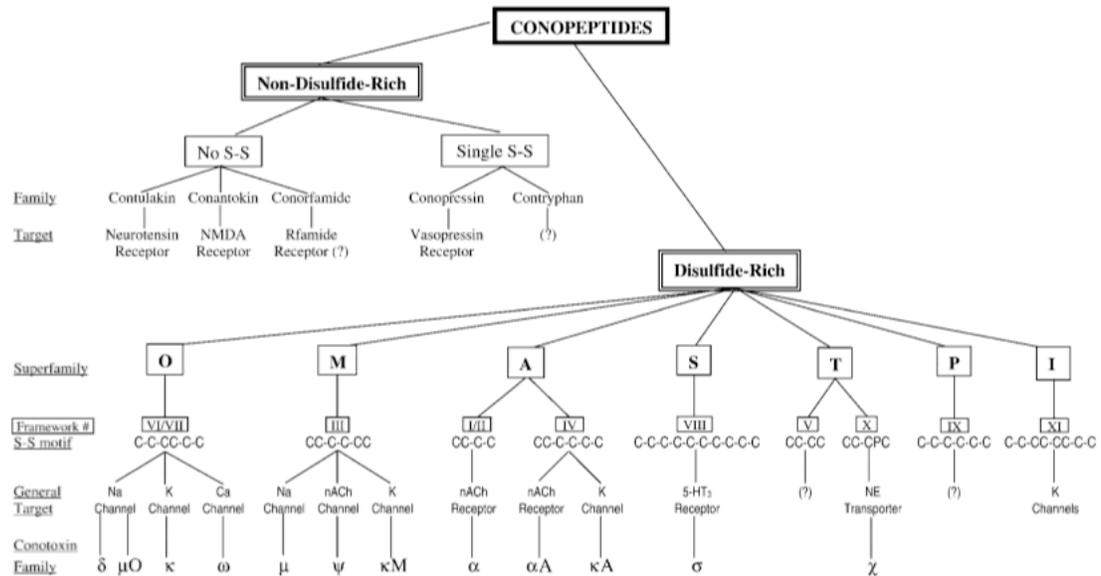


Figura 5. Clasificación de los componentes del veneno de los *Conus*. Destacando a las familias de conotoxinas que presentan una gama de blancos moleculares a los que se unen con gran afinidad. Recuperado de Terlau & Olivera, (2004) 45 p.

La característica más interesante de las conotoxinas es que logran combinar una elevada afinidad y una delicada selectividad hacia sus blancos moleculares. Asimismo, se ha demostrado que las conotoxinas son capaces de discriminar entre canales iónicos estrechamente relacionados y entre canales iónicos tejido-específicos, y lograr una rápida y eficiente interacción entre el ligando-receptor (Woodward *et al.*, 1990). En este contexto, en la búsqueda de nuevas y mejores moléculas con actividad antituberculosis, se puede sugerir el empleo de los componentes de los venenos del género *Conus* por presentar cualidades valiosas en el desarrollo de nuevos fármacos.

3. Justificación

El número de casos de TB en el mundo aumenta 3 % cada año, principalmente debido a la expansión de cepas MDR. Se ha sugerido que la prevalencia de la tuberculosis está subestimada y que la resistencia a los medicamentos está extendida en todo el mundo. La emergencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes, o multirresistentes a los agentes terapéuticos disponibles, ha propiciado una necesidad urgente de aislar y desarrollar nuevos fármacos que desestabilicen e inhiban la viabilidad del agente causal de esta enfermedad.

La información generada en los últimos años con la secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* poco a poco ha proporcionado los conocimientos fundamentales, para que las nuevas generaciones de antifímicos se desarrollen en base al entendimiento de la biología, del ciclo intracelular y de la bioquímica de la micobacteria. Por eso se ha propuesto el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos dirigidos hacia nuevos blancos moleculares.

Por otro lado, se cuenta con el antecedente de que algunos organismos venenosos marinos presentan numerosas sustancias activas que van dirigidas a canales o receptores que se encuentran en la membrana plasmática o membranas intracelulares. Considerando que la micobacteria es una barrera casi impenetrable por los fármacos convencionales (que tienen que atravesarla para ejercer su acción) y que a pesar de ello, existe un constante influjo de nutrientes mediado por los canales de su membrana, nuestra propuesta de trabajo se dirige a identificar y caracterizar conotoxinas a partir de venenos de especies del género *Conus*, con capacidad inhibitoria del agente causal de la tuberculosis.

4. Hipótesis

En el veneno de los caracoles marinos *C. californicus*, *C. ximenes* y *C. regularis* existe por lo menos un componente en cada uno de ellos, con actividad inhibitoria sobre la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

5. Objetivo general

Obtener una conotoxina capaz de inhibir el crecimiento del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*

6. Objetivos particulares

1. Colectar y fraccionar los venenos provenientes de diferentes especies del género *Conus*
2. Caracterizar biológicamente las fracciones de los venenos en una cepa de *M. tuberculosis* (*in vitro*)
3. Caracterizar bioquímicamente las posibles fracciones que muestren efecto inhibitorio en *Mycobacterium tuberculosis*
4. Clonar el gen completo de la conotoxina con actividad en *M. tuberculosis*
5. Evaluar la actividad de la toxina recombinante y/o sintética en *M. tuberculosis*, en ensayos *in vivo*

7. Metodología

7.1 Obtención de los especímenes

En este proyecto fueron evaluadas 3 especies de caracoles marinos del género *Conus*. La distribución geográfica de la especie *Conus californicus* comprende la zona Este del Pacífico, abarcando desde San Francisco, California, hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur. Nuestro punto de colecta fue la región intermareal del km 58 carretera Tijuana-Ensenada, Baja California, México. Para las especies *Conus ximenes* y *Conus regularis*, los caracoles fueron colectados en la región intermareal de la zona costera, en Bahía de los Ángeles, a 480 km al sur de Ensenada. Para determinar el día y hora de mareas bajas, fue necesario realizar una consulta al calendario de mareas proporcionado por el CICESE (<http://predmar.cicese.mx>).

7.2 Manipulación del veneno

La obtención de los venenos se realizó a partir de la extracción de los ductos venenosos de cada una de las especies. Se emplearon dos estrategias diferentes dependiendo del grosor de la concha. Para la especie *C. californicus*, la disección de los caracoles fue por rompimiento manual de la concha, mientras que para *C. ximenes* y *C. regularis*, se realizó por centrifugación a 4,500 x g, a 4 °C por 7 minutos (min.), usando una centrífuga Heraeus Multifuge 1S-R. Una vez expuesto el animal, el aparato venenoso fue extraído para posteriormente aislar el ducto venenoso.

Para la extracción del veneno se adicionó 1 ml de solución C [H₂O 60 % / acetonitrilo (AcN) 40 %] por cada 20 ductos, para después macerarlos con un homogenizador manual de vidrio, siempre manteniendo la muestra en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 x g por 5 min., a 4 °C, 2X, para eliminar residuos de tejido. El sobrenadante recolectado, se congeló a -70 °C para liofilizarlo (liofilizadora Lyph-Lock 6, Labconco).

7.3 Fraccionamiento de los venenos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP)

El extracto total de cada veneno fue fraccionado de acuerdo al tiempo de retención de sus componentes. Para este procedimiento, las muestras fueron manipuladas en un cromatógrafo Agilent 1100 (Agilent Technologies). Se utilizó una columna analítica Vydac C₁₈ (Grace-Vydac 218TP54, 4.6 x 250 mm, 300 Å) con una pre-columna Zorbax C₁₈ (Zorbax-Agilent Technologies, 4.6 x 12.5 mm, 5 µm), ambas fueron equilibradas con solución A [H₂O 99.88 % /TFA 0.12 %] por 30 minutos. En promedio, las inyecciones de material biológico fueron de 4 mg. Las características del método de purificación se muestra en la tabla 2:

Tabla 2. Características de la estrategia empleada en el fraccionamiento de los componentes de los diferentes venenos. Procedimiento realizado mediante HPLC fase reversa (solución A: H₂O 99.88 % /TFA 0.12 %; solución B: AcN 99.9 % /TFA 0.1 %).

Tiempo (t)	Σt	Solución A (en %)	Solución B (en %)
0	0	100	0
5	5	100	0
60	65	40	60

Cada una de las muestras fue eluída a temperatura ambiente durante 65 minutos, empleando un gradiente lineal de solución B de 1 % por minuto, con un flujo de colecta de 1 ml por minuto. La detección de los péptidos se realizó por absorbancia en el rango de luz UV, a una longitud de onda de 230 nm. Las fracciones fueron almacenadas a -70 °C y después liofilizadas.

El plan estratégico de purificación inicial, consistió en coleccionar por periodos de 5 min. Los conjuntos de toxinas incluidas cada 5 min, fueron nombrados como fracciones. Este protocolo nos permitió tamizar de forma rápida las posibles fracciones con actividad anti-TB. De esta manera, en los bioensayos iniciales se analizaron 12 fracciones de cada veneno.

Una vez identificada la fracción con actividad, solo los componentes incluidos en la fracción de interés (nombrados subfracciones) fueron repurificados de forma individual. Para una segunda y/o tercera repurificación, las muestras fueron nombradas como picos cromatográficos. Para el análisis de subfracciones y picos, se trabajó con una columna analítica Vydac C₁₈ (Grace-Vydac 218TP51, 1 x 250 mm, 5 µm) y una pre-columna Zorbax C₁₈ (Zorbax-Agilent Technologies, 4.6 x 12.5 mm, 5µm). En el protocolo de repurificación, se consideró el porcentaje de solución B en el que eluye la subfracción de interés para diseñar un gradiente de solución B con 10-12 %, menos y más, respectivamente, previo y posterior al porcentaje de elusión. En este caso, se inyectaron de 100 a 200 µg de la fracción a repurificar.

7.4 Caracterización biológica de las fracciones de venenos en cepas de *M. tuberculosis* (*in vitro*)

Esta sección aborda las estrategias empleadas para evaluar la capacidad inhibitoria de las fracciones venenosas y la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de las subfracciones, picos cromatográficos y toxinas sintéticas.

7.4.1 Uso del método colorimétrico para evaluar la susceptibilidad de la cepa H37Rv expuesta a las fracciones venenosas

En los bioensayos se evaluó la capacidad de las fracciones de inhibir la viabilidad bacilar mediante el método colorimétrico en microplaca, utilizando un reactivo revelador (Martin *et al.*, 2005). Con este protocolo se emplean reactivos de óxido-reducción como indicadores de crecimiento/viabilidad celular, que bajo condiciones de reducción como las generadas durante la actividad metabólica bacteriana, cambian de color. Un ejemplo es el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio (o MTT), donde la presencia de la enzima succinato dismutasa provoca un rompimiento del anillo de tetrazolio del compuesto, ocurriendo un cambio de color de amarillo a café. Otro ejemplo, es el reactivo resazurina (o azul alamar) que cambia de color morado a rosa. Por lo tanto, solo las bacterias viables y metabólicamente activas, generarán un microambiente con las condiciones necesarias para el cambio de color (Luna *et al.*, 2003).

En la figura 6, se muestra un esquema que ejemplifica un ensayo colorimétrico, utilizando una microplaca de 96 pozos. Considerando que la especie *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno de crecimiento lento, el revelado de la placa se realizaba por lo menos 7 días después de haberse montado el ensayo. En todos los casos se colocaron 200 μ l de agua estéril a los pozos de la periferia para evitar evaporación del contenido de los pozos empleados para el bioensayo. A los pozos de trabajo se les colocaron 100 μ l de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa). Se adicionó la muestra a evaluar por duplicado, a una concentración inicial de 200 μ g/ml. Y por último se adicionaron 100 μ l de suspensión bacteriana de un cultivo de *M. tuberculosis*.

La suspensión bacilar de trabajo debe tener una turbidez similar al tubo 1 de la escala de McFarland (3×10^8 células/ml). Seguido de una dilución 1:20 del inóculo, resultando en una suspensión bacilar de 1.5×10^7 células/ml.

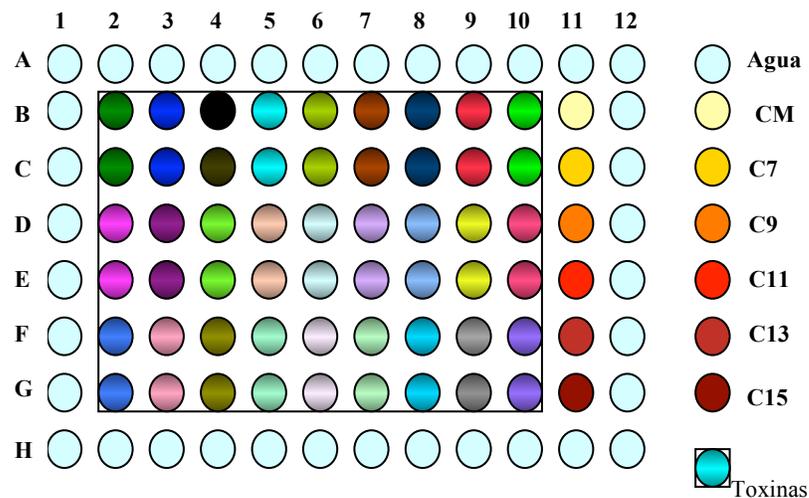


Figura 6. Esquema de ensayo colorimétrico en microplaca. Se ejemplifica la evaluación de 27 fracciones (por duplicado), para determinar la capacidad antimicobacteriana. La fila 11 corresponde a los controles, descritos en el texto.

La figura anterior ejemplifica el bioensayo colorimétrico donde se utilizaron los pozos 11B a 11G como controles. El pozo codificado como CM (11B) corresponde al control de esterilidad del medio (Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC). Los controles con los códigos C7, C9, C11, C13 y C15 (pозos 11C a 11G) pertenecen a

los controles de crecimiento que contienen medio enriquecido más la suspensión bacilar. Al séptimo día de incubación (37 °C), al control C7 se le adicionó el reactivo revelador considerando las especificaciones del fabricante. Transcurrido el tiempo indicado debe ocurrir un cambio de color para proceder a revelar los pozos restantes del bioensayo. La interpretación de los resultados se realiza a simple vista. Si en el control C7 no ocurre cambio de coloración, se realiza el revelado al tercer día al pozo C9 (día 9 de incubación), y se incuba el tiempo indicado para cada reactivo. De esta forma, el cambio de color en los pozos C7 al C15, indica el día en que se debe adicionar el reactivo revelador a los pozos del bioensayo.

7.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Este ensayo se basa en el método colorimétrico, con las modificaciones necesarias para determinar la MIC de la muestra que haya presentado actividad en el ensayo previo. En la evaluación, las muestras a analizar fueron subfracciones y picos individuales con actividad. Se realizó una dilución seriada considerando la concentración inicial del ensayo previo, donde idealmente se inicia con 200 µg/ml de muestra, mientras que para toxinas sintéticas fue de 50 µg/ml.

7.5 Caracterización bioquímica de las conotoxinas

La identificación y análisis de la estructura primaria y masa molecular de las conotoxinas, fue solicitado al Laboratorio Atheris, en Suiza. De acuerdo al reporte emitido, los péptidos fueron analizados en un Espectrómetro Waters, con un análisis de masas TOF, y una fuente de iones ESI. El análisis de la secuencia fue realizado por degradación de Edman y confirmado por espectrometría. Tras la obtención de las secuencias, se determinó la estrategia a seguir para obtener cantidades mayores de material biológico para los bioensayos posteriores.

7.6 Obtención del gen *cal6.7*, que codifica la conotoxina con actividad anti-TB, encontrado en la especie *C. californicus*

En esta sección, se abordaron las técnicas moleculares empleadas en el manejo del material biológico del cónido *C. californicus*. Se incluye la metodología usada en la extracción del ARN total a partir de ductos venenosos, los diferentes

oligonucleótidos (o cebadores) diseñados para la obtención de la secuencia de interés y las diferentes estrategias de PCR propuestas para la amplificación y clonación del ADN.

7.6.1 Extracción del ARN total de los ductos venenosos

La extracción de ARN total se realizó a partir de dos lotes de caracoles marinos, manipulados por separado. En febrero del 2011, se realizó la primera extracción, de 5 organismos. Previamente a la disección de los ductos venenosos, los caracoles fueron congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El protocolo de extracción empleado fue a partir del reactivo TRI (Sigma Aldrich No. Catálogo T9424). Considerando un peso total estimado de 25 mg de tejido, la muestra se homogenizó con 500 μl de reactivo TRI y se incubó por 5 min., a temperatura ambiente (TA). Se añadieron 50 μl de 1-bromo-3-cloropropano (o BCP, de Sigma Aldrich) al homogenizado y se agitó vigorosamente por 15 segundos, seguido de incubación por 2 a 15 min. a temperatura ambiente. Para lograr una separación de fases (orgánica, interfase y acuosa), la muestra se centrifugó a $13,000 \times g / 4\text{ }^{\circ}\text{C} / 20\text{ min}$. La fase acuosa que contiene el ARN se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo. Una vez separada la fase acuosa, se precipitó el ARN con 250 μl de isopropanol al 100 % (grado molecular, Sigma Aldrich). La muestra se incubó de 5 a 10 min. a TA, y se centrifugó a una velocidad de $12,000 \times g / 2-8\text{ }^{\circ}\text{C} / 10\text{ min}$. El ARN sedimentado forma un botón; por lo tanto el sobrenadante fue decantado y el botón de ARN fue lavado con 500 μl de etanol al 75 % (v/v); se empleó agitación manual. Después, la muestra fue centrifugada a $7500 \times g / 2-8\text{ }^{\circ}\text{C} / 5\text{ min}$. y el botón resultante fue secado a TA / 5-10 min. Una vez terminado el proceso de secado, el ARN total se resuspendió en agua estéril con DEPC, y fue almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La concentración y pureza de ARN se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm y la relación de la absorbancia 260/280 nm, respectivamente (G&E Healthcare Life Sciences, Nanovue Spectrophotometer). Para corroborar la integridad del ARN total se realizó un gel de agarosa al 1.2 %, disuelto en TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). La muestra fue tratada de la siguiente manera: a 3 μl de ARN total (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), se le agregaron 18 μl de formamida al 100 % y 5 μl

de amortiguador de carga [Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 50 mM (pH 8.0), naranja G 0.4%, azul de bromofenol 0.03 %, xilen cianol FF 0.03 %, Ficoll 400 15 %], 1 μ l de bromuro de etidio (1 mg/ml); lo anterior fue aforado a 30 μ l de volumen final. La muestra fue desnaturalizada por calentamiento a 65 °C por 5 min. e inmediatamente después fue colocada en hielo 5 min. Una vez finalizado el tratamiento, la muestra fue dispuesta en el gel y se corrió a 50 V durante 2.5 horas (protocolo modificado de Masek *et al.*, 2005).

En noviembre del 2011 se realizó una colecta de 20 caracoles para una segunda extracción de ARN total. El peso estimado total de los tejidos fue de 240 mg. Para realizar la disección, los organismos fueron manipulados inmediatamente después de su captura, sin previo congelamiento, disponiéndose los ductos venenosos en solución RNAlater® (Quiagen). El procedimiento general de la extracción de ARN total se realizó de forma similar a lo ya descrito, solo haciendo los ajustes para la cantidad de material biológico empleado en este caso.

Con el propósito de eliminar ADN genómico que pudiera estar presente en el ARN total, la muestra fue tratada con ADNasa (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade Invitrogen). Para cada caso, se procesó 1 μ g de ARN de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez concluido el tratamiento, se procedió a la síntesis y amplificación de los ADNc empleando la técnica de amplificación rápida de los extremos de ADNc (o RACE, por sus siglas en inglés).

7.6.2 Diseño de cebadores y condiciones de PCR

Hasta el momento nuestro péptido ha sido nombrado como fracción F6.7, por lo que al referirnos al gen, lo estaremos nombrando *ca/6.7*. Cabe mencionar que la conotoxina F6.7 posteriormente fue renombrada como *cal26a* (ver sección 8.4.2.1). Para el diseño de los oligonucléotidos iniciales, la información inicial era muy limitada, lo que resultó en que los primeros cebadores elaborados presentaran un alto grado de degeneración (cebador CcalF y CcalR, sentido y antisentido, respectivamente), mostrados en la figura 7.

El protocolo general consistió en realizar PCR anidados, donde el producto del primer PCR sirvió como molde para una segunda reacción. Pueden usarse cebadores con alineamiento en una región más interna de la secuencia del gen de interés. Por lo tanto, se diseñaron otro par de oligonucleótidos sentido Ccal2F y antisentido Ccal2R, que codifican la región más interna de *cal6.7*.

En otro intento por encontrar el gen *cal6.7* se diseñaron otros cebadores considerando la frecuencia relativa del uso de codones reportados para las especies *Conus quercinus* y *Conus regius* (www.kazusa.or.jp). Este grupo de cebadores fueron denominados como: cebadores sentido CcalEF y CcalIF, externo e interno, respectivamente; y los cebadores antisentido CcalER y CcalIR, externo e interno, respectivamente.

Por último, los cebadores Ccal3ER y Ccal3IR fueron diseñados a partir de la secuencia parcial de la región 3' del gen, obtenida de los ensayos descritos más adelante. Esto quiere decir que finalmente se trabajó con cebadores específicos del gen *cca/6.7*. El oligonucleótido Ccal3ER pertenece a la secuencia no traducida 3' de nuestro gen, mientras que Ccal3IR codifica la secuencia interna LPCPSSG.

En total fueron diseñados 10 oligonucleótidos que se emplearon en diferentes estrategias para aislar las regiones 5' y 3' del gen *cal6.7*. La siguiente tabla enlista los nombres de los oligonucleótidos, su secuencia y las especificaciones de las temperaturas de desnaturalización (T_m) y alineamiento (T_a).

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *cal6.7*. Donde Tm es: temperatura de desnaturalización en grados centígrados calculada por el fabricante. Ta: temperatura de alineamiento utilizada en este estudio para cada reacción de PCR. El código para las bases degeneradas es M: A,C; N: A, C, G, T; R: A, G; Y: C, T; W: A, T; S: G, C.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)	Ta (°C)
CcalF	MGNCCNAARTGYTGYTGYGTN	64	60
CcalR	NSWNSWNGGRCANGGNARRTG	66	60
Ccal2F	TGYGGNGTNGTNGGNMGNAAR	66	60,62,64 y 66
Ccal2R	NACNGGRTGRCAYTTRTCCCA	64	60
CcalEF	AGGCCTAAATGYTGTTGTGTS	61	56
CcalIF	TGTGGCGTSGTSGGCAGGAAA	68	60
CcalER	AGAAGAAGGRCAAGGCARATG	62	58
CcalIR	ATGRCATTTTRTCCAGGTAGA	60	56
Ccal3ER	GAAGGACGGATAGGAAGAAGG	64	59
Ccal3IR	GCCACTGCTGGGGCAAGGAAG	70	65
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	50	50
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	50	50

En la tabla anterior también son incluidos los cebadores universales M13F y M13R, que fueron utilizados en la amplificación de los insertos clonados en el vector pGEM-T y en todas las preparaciones de los plásmidos a secuenciar, a una concentración final de 6.4 μ M.

La figura siguiente muestra una organización general, del posicionamiento de los diferentes oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones 5' y 3' del gen *cal6.7* mediante la técnica RACE.

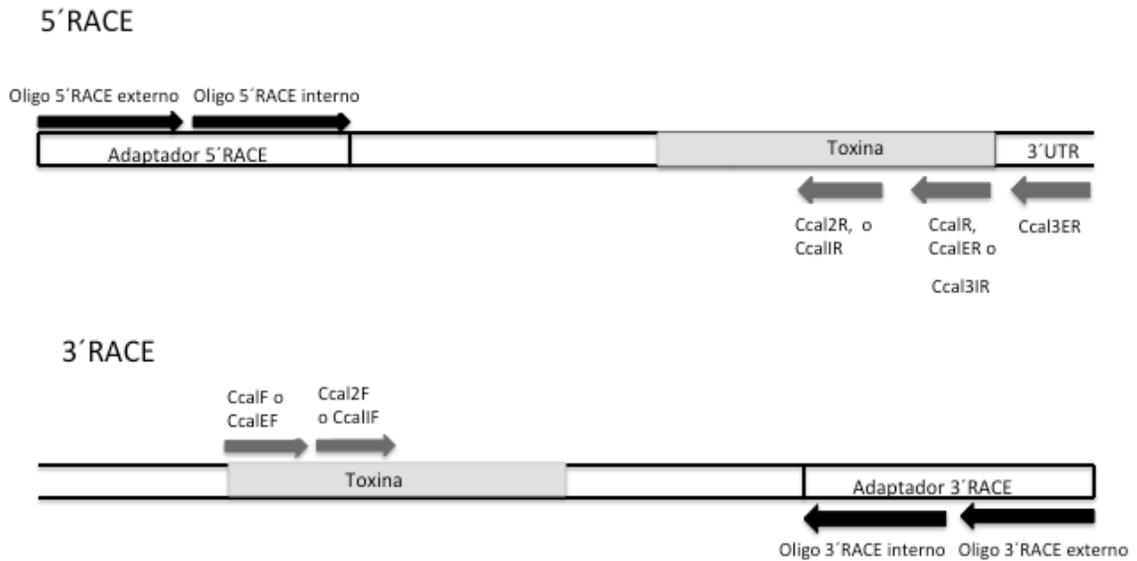


Figura 7. Esquema general de la posición de los cebadores provistos por el kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion) y los diseñados a partir de la toxina madura cal6.7.

El uso de cada uno de los oligonucleótidos se especifica en la sección de resultados. Para el caso de los cebadores proporcionados por el kit, el protocolo menciona que tienen un rango de temperatura de alineamiento entre 55 a 65 °C, siendo 60 °C la temperatura recomendada para iniciar una búsqueda de genes. Como estos cebadores tienen un rango amplio de temperatura de alineamiento, se consideró preferentemente las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos de nuestro gen para las diferentes condiciones de PCR.

De forma general, las condiciones de temperaturas utilizadas en cada reacción de PCR consistieron en: una desnaturalización inicial con un ciclo de 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos para la amplificación, que comprende un ciclo de 94 °C por 30 segundos para la desnaturalización, las temperaturas de alineamiento en función de cada par de oligonucleótidos (ver tabla 3) por 30 segundos, y una extensión a 72 °C con un tiempo de 45 segundos, mismo tiempo que fue establecido por no conocerse el número de pares de bases de los fragmentos a amplificar. Finalmente, se aplicó un ciclo de 72 °C por 5 minutos como extensión final.

7.6.3 Amplificación rápida de los extremos de ADNc (siglas en inglés de RACE)

Como ya se comentó previamente, se utilizó el kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion), para aislar el gen completo de *cca/6.7*. Esta es una técnica basada en PCR que se conoce como amplificación rápida de los extremos de ADNc (o RACE) que permite la clonación de genes completos a partir de las secuencias parciales de ADNc mediante la identificación independiente de los extremos 5' y 3' del gen de interés. El procedimiento de la amplificación del extremo 5' RACE y 3' RACE se encuentra esquematizado en la figura 8.



Figura 8. Esquema generalizado del kit FirstChoice® RLM-RACE (Ambion). Obtención del ADNc en su extremo 5' y 3', y su conversión a ADN de doble cadena, donde se emplean cebadores específicos de la secuencia adaptadora, proporcionados por el kit, y también cebadores específicos del gen a amplificar (figura modificada del manual de usuario Ambion).

7.6.4 Manipulación enzimática del ARN para el 5' RACE

Inicialmente, se trabajó con el primer lote de ARN procesado, del cual fue tomado 1 μg de ARN total como molde. La muestra fue tratada con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (o CIP, por sus siglas en inglés). Esta reacción incluye 1 μg de ARN total, 2 μl de amortiguador CIP 10 X, 2 μl de enzima CIP y fue aforada a 20 μl con agua libre de nucleasas (al trabajar con 1 μg de ARN total, el kit nombra la muestra como “reacción pequeña”). La muestra fue mezclada e incubada a 37 °C / 1 hora. Terminada la reacción anterior, se adicionó una solución de acetato de amonio (15 μl), más 150 μl de la mezcla de fenol ácido: cloroformo y 115 μl de agua libre de nucleasas. La muestra fue mezclada en vortex y centrifugada 5 min / TA / 10,000 x g. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, donde se le adicionaron 150 μl de cloroformo (grado molecular, Sigma Aldrich) y se procedió a centrifugar con las mismas condiciones recién descritas. Nuevamente, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo para iniciar con la sedimentación del material genético. Para esto, se adicionaron 150 μl de isopropanol (grado molecular, Sigma Aldrich), se mantuvo en hielo por 10 min y se centrifugó por 20 min. El ARN sedimentado, fue lavado con 0.5 ml de etanol al 70 % (v/v) frío (4 °C), centrifugado 5 min, seguido de la remoción del etanol, para permitir el secado del botón de ARN. El material fue resuspendido en 4 μl de amortiguador TAP 1 X, para proceder al siguiente tratamiento enzimático. Esto se realizó empleando 4 μl de ARN tratado con CIP, más 1 μl de amortiguador TAP 10 X, más 2 μl enzima fosfatasa ácida de tabaco (o TAP) y 2 μl de agua libre de nucleasas. El material fue mezclado e incubado a 37 °C / 1 hora.

Nota: una variante de la manipulación del ARN total para el tratamiento enzimático fue trabajar con una “reacción estándar”, donde se emplean 10 μg de material genético. Esto se pudo realizar con el segundo material de ARN extraído, porque se tuvo el cuidado de mantener la muestra lo más concentrada posible. Por lo tanto, al realizar los tratamientos se hicieron los ajustes necesarios de los diferentes componentes (como lo indica el protocolo). Esta variación de utilizar mayor cantidad de ARN en la reacción enzimática fue con la idea de tener una mayor diversidad de ARNm, donde se pudiera incluir el de nuestro interés.

7.6.5 Síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN total para 5' RACE

Posteriormente al tratamiento enzimático, a la muestra se le realizó una ligación con la enzima ARN T4 Ligasa. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, se mezclaron los siguientes componentes: 5 μ l de ARN tratado con CIP/TAP, 1 μ l de adaptador 5' RACE (0.3 μ g/ μ l), 1 μ l de amortiguador 10X ARN Ligasa, 2 μ l de Ligasa ARN T4, más 1 μ l de agua libre de nucleasas. La reacción se mezcló y se incubó a 37 °C / 1 hora. Para la transcripción inversa, se utilizaron 2 μ l de ARN ligado, 4 μ l de mezcla de dNTPs (2.5 mM), 2 μ l de decámeros al azar, 2 μ l de amortiguador de RT 10 X, 1 μ l de inhibidor de ARNasa, 1 μ l de Transcriptasa Reversa M-MLV, lo anterior aforado para 20 μ l de reacción. La muestra fue homogenizada e incubada a 42 °C / 1 hora.

7.6.6 PCR 5' RACE externo

Para trabajar la región 5' externa de nuestro ADN, las reacciones de PCR se realizaron a partir de 1 μ l de reacción RT anterior, más 5 μ l de amortiguador de PCR 10 X, 4 μ l de mezcla de dNTPs (2.5 mM), 2 μ l de oligonucleótido 5' RACE (10 μ M), 2 μ l de oligonucleótido específico del gen (10 μ M) y 1.25 U de ADN polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega), lo anterior fue mezclado y aforado a 50 μ l de reacción final.

7.6.7 PCR 5' RACE interno

Los componentes necesarios para realizar nuestras reacciones de PCR 5' interno fueron: como molde se tomó 1 μ l de la reacción de PCR 5' externo (del paso anterior), 5 μ l de amortiguador de PCR 10 X, 4 μ l de mezcla de dNTPs (2.5 mM), 2 μ l de oligonucleótido 5' RACE (10 μ M), 2 μ l de oligonucleótido específico del gen (10 μ M) y 1.25 U de ADN polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polimerasa, Promega), lo anterior mezclado y aforado a 50 μ l de reacción final.

7.6.8 Síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN total para 3' RACE

Para obtener la primer cadena de ADNc, 1 µg de ARN total fue mezclado con 4 µl de dNTPs (2.5 mM), 2 µl de adaptador 3' RACE, 5 µl de amortiguador RT 10 X, 1 µl de inhibidor de ARNasas, 1 µl de reverso transcriptasa M-MLV más 8 µl de agua libre de nucleasas. La muestra fue homogenizada e incubada a 42 °C / 1 hr.

7.6.9 PCR 3' RACE externo

Los componentes utilizados para realizar los diferentes PCRs fueron: mezclar 1 µl de la reacción RT anterior, 5 µl de amortiguador de PCR 10 X, 4 µl de mezcla de dNTPs (2.5 mM), 2 µl de oligonucleótido 3' Externo RACE (10 µM), 2 µl de oligonucleótido sentido externo específico del gen, lo anterior aforado para una reacción de 50 µl. Por último, se adicionó 1.25 U de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega).

7.6.10 PCR 3' RACE interno

Los componentes necesarios para realizar las diferentes reacciones fueron las mismas que se describieron para el 3' externo RACE, solo que en este caso se tomó como molde 1 µl de la reacción anterior. Todos los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.0 %, teñidos con bromuro de etidio a 1 mg/ml.

7.6.11 Pureza de los productos de PCR

Este paso es importante para eliminar contaminantes que puedan reducir la calidad de la ligación de nuestro ADN al vector. Por lo tanto, la manipulación de los productos de PCR fue variable, dependiendo de los resultados obtenidos en los geles de agarosa. Si se observaba una sola banda, el producto de PCR era purificado mediante el kit PCR Purification QUIAquick (Quiagen), usando las especificaciones del fabricante. Si se observaban varias bandas, eran cortadas y purificadas con el mismo kit de Quiagen, empleando el protocolo QUIAquick gel extraction, donde las bandas eran procesadas de forma individual. Para el primer caso, en los datos del fabricante se reporta una recuperación de ADN del 90 al 95

%, lo que significa una pérdida mínima de ADN. Para el segundo caso, se reporta una recuperación entre el 70 y 80 % del ADN inicial. Dicho lo anterior, el ADN resultante fue cuantificado en nanodrop (Nanovue GE Systems 28923215).

7.6.12 Técnica T/A para clonar los productos de PCR

Para emplear la estrategia T/A es necesario que el vector presente extremos cohesivos 3' de una sola base (un residuo de timidina). De esta manera, se utilizó el vector linearizado pGEM®-T (Promega) de 3 kb para ligar nuestro ADN, figura 9. Este vector, derivado de pUC contiene precisamente esos extremos 3' de timidina en donde se clona directamente los productos de PCR, favoreciendo la clonación dado que la Taq polimerasa añade preferentemente residuos adenosina (A) en los extremos 3' de los productos de PCR. El origen de replicación de este vector, ori pMB1, es de alto número de copias debido a una mutación puntual en el ADN regulatorio del origen de replicación. Asimismo, el vector presenta resistencia a ampicilina (Amp^r) y cuenta con un sitio de clonación múltiple (o MCS del inglés Multiple Cloning Site) que está dentro del marco de lectura abierto (u ORF del inglés Open Reading Frame) de *lacZ*, el cual codifica el péptido alfa de β -galactosidasa (explicado más adelante).

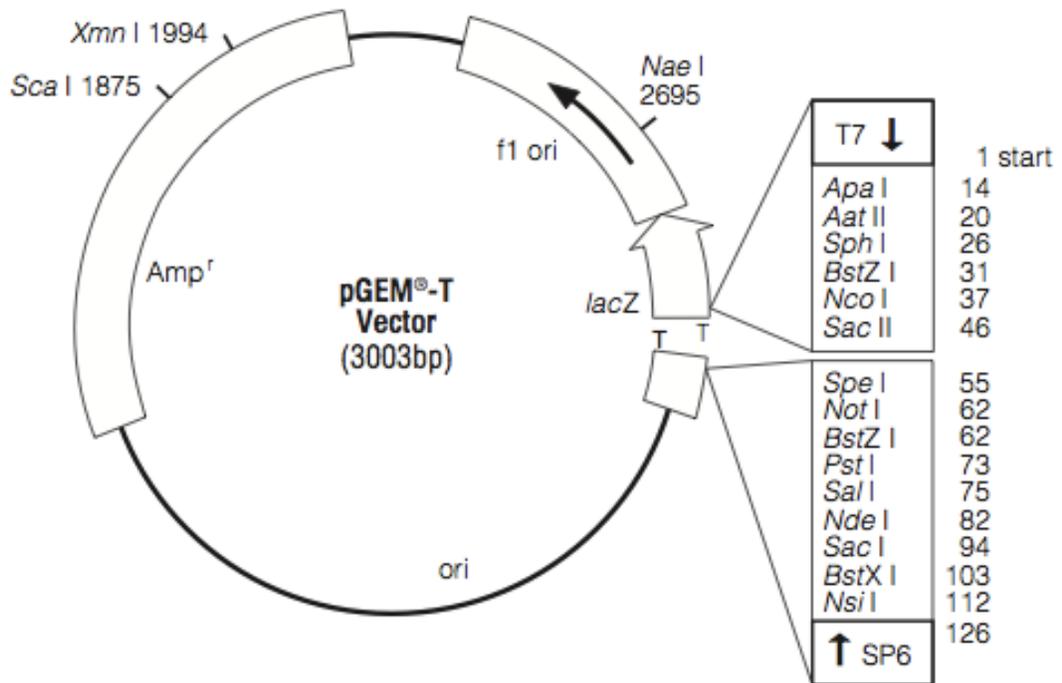


Figura 9. Mapa del vector linealizado pGEM®-T. El sitio de clonación se encuentra interpuesto en el gen de LacZ α , que codifica el fragmento N-terminal de la β -galactosidasa. También se muestra el origen de replicación ori pMB1 (indicado como ori), y la secuencia que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r). Tomado del manual de Promega.

Las reacciones de clonación se estandarizaron a una relación molar inserto:vector de 3:1. Los componentes de la reacción fueron: 5 μ l de amortiguador de ligación 2 X Rapid T4 ADN Ligasa, 1 μ l de vector pGEM-T, producto de PCR (volumen variable), y ADN Ligasa T4, aforado a 10 μ l de volumen final. La reacción fue incubada 12 horas a 4 °C. Tiempo transcurrido, la enzima ADN Ligasa T4 fue inactivada a 65 °C por 10 minutos.

7.6.13 Transformación de *E. coli* DH5 α

Para la transformación de las colonias son requeridas cajas preparadas con medio Luria Bertani (LB), suplementado con un antibiótico β -lactámico como carbencilina (100 μ g/ml). Una vez gelificadas las cajas, se le adicionaron 40 μ l de X-Gal (20 mg/ml) y 8 μ l de IPTG (200 mg/ml) (Sambrook *et al.*, 1989). Las características de la construcción del vector pGEM-T nos permiten hacer varias selecciones. Por

ejemplo, crecer únicamente las células de *E. coli* que sean resistentes al antibiótico, es decir, solo las células que contengan al vector. Por otro lado, el sistema nos facilita identificar las colonias que fueron transformadas correctamente. Esto se explica mediante la función de la enzima β -galactosidasa, que como se mencionó anteriormente es codificada por el gen *lacZ*. Es una enzima que se compone de 2 subunidades: una codificada por el vector, la ya descrita $LacZ\alpha$, y la otra es codificada por el cromosoma ($LacZ\Omega$). La enzima le permite a la bacteria hidrolizar la galactosa en monosacáridos, pero solo puede ser funcional si las dos subunidades están presentes. Por lo tanto, si se inserta el ADNc en el vector, se interrumpe al gen que codifica una subunidad, no lográndose obtener una proteína funcional. Por otro lado, X-Gal que es adicionado a las cajas con medio LB, es degradado por la β -galactosidasa (con IPTG como inductor) teniendo como resultado la galactosa y 5-bromo-4-cloro hidroxindol, donde el último es 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 hayan sido transformadas correctamente porque sus vectores no contienen la secuencia de interés, y por lo tanto, tienen un gen *lacZ* totalmente funcional (identificadas por su color azul), de aquellas colonias cuya β -galactosidasa no tiene las dos subunidades, y que por lo tanto han tenido una transformación exitosa (color blanco).

Para la transformación se utilizaron células electrocompetentes *E. coli* DH5 α , mismas que fueron manipuladas inmediatamente después de descongelarlas para no afectar la eficiencia de la electroporación. El ADN ligado al vector pGEM-T fue electroporado en 50 μ l de células DH5 α . Tanto el ADN, la cubeta de electroporación y las células fueron mantenidas dos minutos en hielo, previamente a su manipulación. Tiempo transcurrido, se adicionaron 3 μ l del producto de la ligación a los 50 μ l de células DH5 α , homogenizando la muestra y evitando la formación de burbujas. La mezcla fue incubada en hielo 2 minutos, antes y después de haberse pasado a la cubeta de electroporación. Posteriormente, la cubeta fue dispuesta en un electroporador (programa Ec2 del electroporador Micro Pulser TM; BioRad, No. Cat. 165-2100), donde se aplicó un pulso de 2.5 kV / 4

mseg, retirando inmediatamente las cubetas del electroporador. Se agregó 1 ml de medio SOC a cada cubeta y el volumen total fue transferido a tubos de 15 ml, mismos que contenían otros 4 ml de medio SOC. La muestra fue incubada a 37 °C por 1 hora, con agitación a 250 rpm. Después del periodo de incubación, se sembraron 100 μ l, 50 μ l y 10 μ l de bacterias transformadas a las cajas con medio LB con antibiótico. Las cajas se incubaron a 37 °C por 12 horas, para permitir el crecimiento de colonias. Después de ese tiempo, las colonias blancas fueron seleccionadas, para el siguiente paso.

7.6.14 Verificación del tamaño del inserto en las colonias

Para corroborar que las colonias contienen el plásmido del tamaño deseado, se realizaron PCR de colonias. Para esto, se sigue el mismo procedimiento de una PCR convencional aunque en vez de agregar ADNc como molde, se agrega una fracción de la colonia a la reacción usando la punta de un palillo de madera estéril. Las condiciones fueron las siguientes: 5 μ l de amortiguador 5 X Green GoTaq® Flexi, 3 μ l de MgCl₂ (25 mM), 2 μ l de oligonucleótido sentido M13F (10 μ M), 2 μ l de oligonucleótido anti sentido M13R (10 μ M), 2 μ l de dNTPs (2.5 mM), fracción de colonia bacteriana, 0.125 μ l de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) (1.25 U), 10.87 μ l de agua destilada y estéril, para obtener un volumen de 25 μ l. En todos los casos se usaron los cebadores M13F y M13R que tienen su secuencia de reconocimiento en el vector. El programa empleado para las reacciones de PCR fue: primer etapa a 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos, y finalmente, un ciclo de extensión a 72 °C por 5 minutos. Una vez concluidos los programas de PCR, 10 μ l de los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 2 %. Los marcadores de peso molecular con diferentes fragmentos de ADN fueron: 100 bp Ladder DNA marker (Axygen) ó 100 bp DNA Ladder (Promega), manipulados de forma indistinta. Los geles fueron corridos por 45 minutos a 100 V. Por no conocer el tamaño completo de nuestro gen, fueron analizados un gran número de bandas, donde se consideró el tamaño del vector involucrado entre los cebadores M13F y M13R, y el tamaño de la banda seleccionada para su clonación.

7.6.15 Extracción de plásmido mediante lisis alcalina

Las colonias que fueron marcadas como positivas, fueron dispuestas en 3 ml de medio LB con carbencilina (100 µg/ml) e incubadas 12 horas a 250 rpm a 37 °C. Después de la incubación, los inóculos fueron centrifugados 3 minutos a 13,000 rpm, a temperatura ambiente. La pastilla de bacterias fue resuspendida en 100 µl de GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8) y EDTA (10 mM, pH 8)); misma solución a la que se le adicionó RNAsa para una concentración final de 0.2 mg/ml. La muestra se agitó en vortex para facilitar la resuspensión de la pastilla, seguido de la adición de 200 µl de NaOH 0.2 N/ SDS 1 %, lo anterior mezclado por inversión (5 a 6 X). Posteriormente, se incubó 5 min. a TA y después otra incubación a 4 °C por 5 minutos. A la mezcla se le adicionaron 150 µl de acetato de potasio 3 M pH 4.8, y se mezcló por inversión para después incubarse a 4 °C por 10 minutos. Después se centrifugó a 13,000 rpm, por 15 minutos a TA. El sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo (1.5 ml) y se le adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. La muestra se mezcló e incubó a -20 °C por 30 minutos. Tiempo transcurrido, se centrifugó con las especificaciones recién descritas y se descartó el sobrenadante. Por último, el botón fue lavado con 1 ml de etanol frío al 70 % (v/v) y centrifugado de nuevo. Después de descartar el sobrenadante, el botón fue secado a temperatura ambiente. Las muestras fueron resuspendidas en 50 µl de agua estéril y cuantificadas en nanodrop.

7.6.16 Análisis de las secuencias obtenidas

Para analizar la secuencia de los clones obtenidos se siguió el siguiente procedimiento y bases de datos:

1. Se utilizó el programa Mac Vector versión 7.2.2 para revisar si existía un inserto en la secuencia obtenida, mediante análisis de las secuencias del sitio de inserción del plásmido así como los cebadores que se alinean en la secuencia de la toxina o en la región ligada adaptadora RACE.
2. Los insertos fueron traducidos en proteínas con el mismo programa para ver si lo obtenido era parecido a la secuencia de nuestra conotoxina de interés.

3. A las secuencias se le realizó un BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar si existía algo similar reportado en la base de datos.
4. Para el análisis del sitio de corte enzimático en la región pre del precursor peptídico, se requirió de la ayuda de la base de datos de SignalP-4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

El programa SignalP es usado para la identificación del péptido señal y su(s) sitio(s) de corte. El método se basa en 2 redes neuronales con un entrenamiento basado en filogenia, para grupos separados de eucariotas, Gram-negativas y Gram-positivas. Las redes se usan por separado para la predicción del péptido señal y para la predicción de la posición del sitio de corte. El programa da como resultado 3 puntajes, S, C e Y, donde el puntaje S para la predicción del péptido señal se reporta para cada posición de un único aminoácido en la secuencia presentada, con un puntaje alto indicando que el aminoácido correspondiente es parte de un péptido señal, y un puntaje bajo indicando que forma parte de una proteína madura. El puntaje C corresponde al sitio de corte, donde para cada posición en la secuencia presentada, es reportado un puntaje C, el cual solo debe ser significativamente alto en el sitio de corte. El puntaje para Y es derivado del puntaje C combinado con el puntaje S, resultando en una mejor predicción del sitio de corte que el puntaje C solo.

5. Para un análisis más exacto de la inclusión y exclusión del péptido señal obtenido en una superfamilia ya reportada se utilizó el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

El software agrupa a los aminoácidos en 4 grupos considerándolos como semejantes, es decir cuando 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. Se incluyen los aminoácidos ácidos, como Ácido aspártico (D) y Ácido glutámico (E).
- Grupo 3. Agrupa a los aminoácidos básicos: Arginina (R), Histidina (H) y Lisina (K).
- Grupo 4. Aquí se encuentra la Glicina (G) y aquellos aminoácidos con un hidroxilo en su cadena lateral, una amina o con cadenas laterales que presenten basicidad. Por ejemplo, la 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.

7.7 Evaluación de la toxina sintética xm1b, en un modelo murino de enfermedad progresiva de tuberculosis

El modelo experimental utilizado es el propuesto por el Dr. Hernández Pando en 1996 (Hernández-Pando *et al.*, 1996), que se basa en el uso de ratones machos singénicos Balb/c, susceptibles a tuberculosis. Considerando que la infección aérea es la más importante en la enfermedad humana, los ratones son inoculados por medio de una inyección intratraqueal (IT) con una carga bacilar alta (2.5×10^5 UFC) de la micobacteria prototipo H37Rv. La inyección intratraqueal permite controlar mejor la dosis y garantiza que la mayoría, si no todas, las bacterias realmente se depositen en el pulmón.

7.7.1 Procedimiento de infección intratraqueal

Los ratones machos BALB/c de 20 a 22 gramos, fueron anestesiados en una cámara de gas con sevoflurano, usando 0.1 ml por animal. Los ratones infectados fueron almacenados en cajas con microaisladores conectados a un sistema de presión negativa. Todo el procedimiento y los sacrificios, se realizaron en campanas de seguridad biológica P3.

Después de dos meses de infección, los animales fueron distribuidos al azar en grupos para recibir diferentes tratamientos. Los grupos experimentales fueron:

- 1.- Grupo control que solo recibió solución salina (50 μ l) vía SC
- 2.- Grupo tratado con la conotoxina sintética xm1b (50 μ g/50 μ l, vía IT)
- 3.- Grupo control tratado con nicotina (60 μ g/50 μ l, *ad libitum*)

La administración de los diferentes tratamientos se realizó cada tercer día por un periodo de 60 días. La figura 10 muestra un esquema general del tratamiento a seguir en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva.

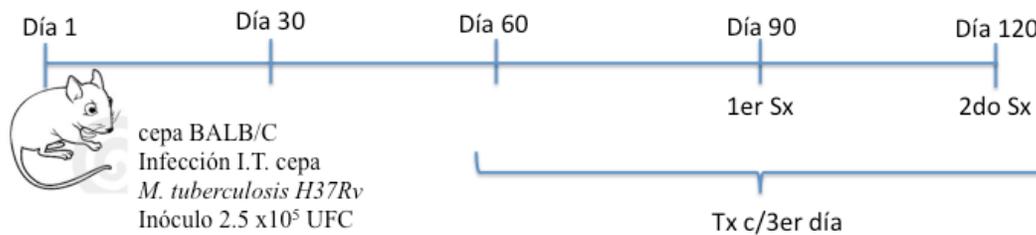


Figura 10. Esquema general del tratamiento en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva. Es indicado como día 1, la sensibilización de un ratón BALB/c a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. También se indica el día de inicio (día 60) de los diferentes retos o tratamientos (Tx) que son aplicados; así como los días (90 y 120) de evaluación o sacrificio (Sx).

7.7.2 Cuantificación de bacterias vivas en el pulmón por determinación de unidades formadoras de colonias (UFC)

Para cada sacrificio, los ratones fueron seleccionados al azar, dividiendo la mitad de cada grupo experimental para el primer y segundo mes de sacrificio. El pulmón derecho o izquierdo de cada animal, se utilizó para cuantificar el número de células viables. Después de realizar la disección de los pulmones, fueron colocados a -70 °C hasta su uso posterior.

Los pulmones fueron homogenizados con un polytrón en tubos Falcón estériles, con 3 ml de solución salina. Después se tomaron alícuotas de 450 μ l diluyendo 1:10 en forma seriada en tubos Eppendorf (cuatro diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). Se colocaron 20 μ l de las diluciones preparadas, por duplicado, en cajas Petri con medio de cultivo de agar Middlebrook 7H11 (Difco), enriquecido con OADC. Las

cajas fueron incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ por 21 días. Tiempo transcurrido, las colonias fueron cuantificadas considerándose a aquellas con características de color blanco, secas, planas y de bordes irregulares.

8. Resultados

8.1 Obtención de los especímenes

En junio del 2007 fueron colectados aproximadamente 800 caracoles de la especie *Conus californicus*, calendario de mareas recuperado de <http://predmar.cicese.mx/mensual/szl/szl0706.pdf>. Tanto el patrón de la concha, la coloración y su ubicación geográfica, permitió señalar que se trataba de la especie *C. californicus*. Los caracoles recolectados, presentaron las características descritas en la figura 11. Asimismo, en octubre del 2008 se realizó una colecta de 309 organismos de la especie *C. regularis*, calendario de mareas recuperado de <http://predmar.cicese.mx/mensual/bla/bla0810.pdf>. La figura 12 muestra las características morfológicas de estos especímenes. Por otro lado, el lote de caracoles de la especie *C. ximenes*, corresponde a 275 organismos colectados en octubre del 2008. En la figura 13, se describe las características morfológicas de las conchas.



Figura 11. Fotografía del caracol marino *Conus californicus*. Recuperado de http://www.gastropods.com/3/Shell_593.shtml. Las conchas de esta especie son de forma cónica, coloración marrón amarillento con superficies lisas y longitudes entre 2 a 4 cm. La parte anterior es angosta, casi puntiaguda mientras que la parte posterior suele ser amplia, con una espira muy baja y ligeramente puntiaguda. El canal donde se localiza el pie del animal presenta una abertura larga y estrecha. El pie y el sifón son de color blanco con pequeños puntos negros.



Figura 12. Fotografía del caracol marino *Conus regularis*. Recuperado de <http://www.elrincondelmalacologo.com/Web%20fotos%20gasteropodos%20marinos/Fotos%20coleccion/Conidae/Conus%20regularis.jpg>. Las conchas son delgadas de forma cónica, con superficies lisas, de 3.8-6.4 cm de longitud. El diseño muestra un color blanco con un patrón de líneas delgadas intermitentes y en algunos segmentos la presencia de bandas más amplias. Los colores presentados en estas líneas son variables, desde tonalidades anaranjado-marrón hasta caobas oscuros. En la parte posterior de la concha, se presenta una espira alta, semiescalonada y puntiaguda. El canal donde se localiza el pie del animal presenta una abertura larga y estrecha. Generalmente, el pie y el sifón son de color blanco, pero también se pueden encontrar de color rojo oscuro.



Figura 13. Fotografía del caracol marino *Conus ximenes*. Recuperado <http://www.elrincondelmalacologo.com/Web%20fotos%20gasteropodos%20marinos/Fotos%20coleccion/Conidae/Conus%20ximenes.jpg>. Las conchas son de forma cónica con relieves en la superficie, y longitudes de 3.8 a 5.0 cm. Algunos especímenes poseen el tinte rosáceo sobre toda la concha. En general, el patrón que presentan es de puntos finos, alineados, de color café (diferentes tonalidades), pero también se pueden encontrar conchas con diseños de bandas amplias del mismo color. En la parte posterior, se presenta una espira moderadamente cóncava. El canal donde se localiza el pie del animal presenta una abertura larga y estrecha. Generalmente, el pie y el sifón son de color blanco, con manchas oscuras.

8.2 Extracción del veneno

Con la finalidad de tener una muestra homogénea de los venenos, se prepararon lotes de extracto total que incluían a todos los caracoles procesados para cada especie. La extracción del veneno se realizó a partir de los ductos venenosos de cada uno de los caracoles. El lote obtenido para *C. californicus* fue de 400 mg de extracto total. Para *C. regularis*, se procesaron 133 mg de extracto total. Finalmente, para *C. ximenes* se obtuvieron 126 mg de material biológico. Para cada caso, el material fue cuantificado por peso seco y liofilizado para su uso posterior.

8.3 Purificación de los componentes del veneno

A continuación se presentan los perfiles cromatográficos y una descripción general de la separación analítica de los extractos totales para las tres especies, figura 14 (*C. regularis*), figura 15 (*C. californicus*) y figura 16 (*C. ximenes*).

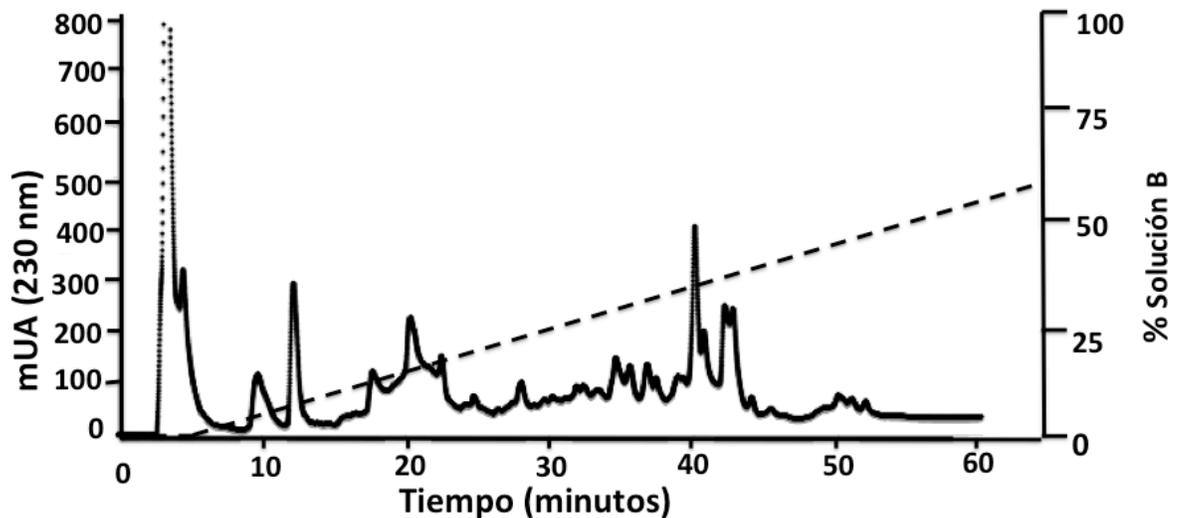


Figura 14. Perfil cromatográfico del extracto total del veneno de *C. regularis*, aislado de ductos venenosos. Gradiente: sln B 0 % (5 min), 1-60 % (5.1 - 65 min).

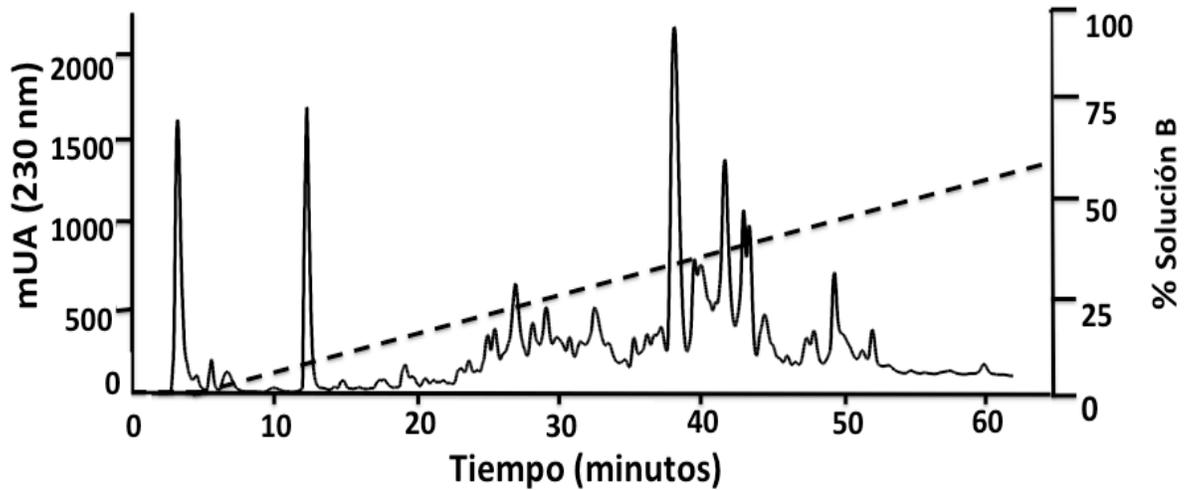


Figura 15. Perfil cromatográfico del extracto total del veneno de *C. californicus*, aislado de ductos venenosos. Gradiente: sln B 0 % (5 min), 1-60 % (5.1 - 65 min).

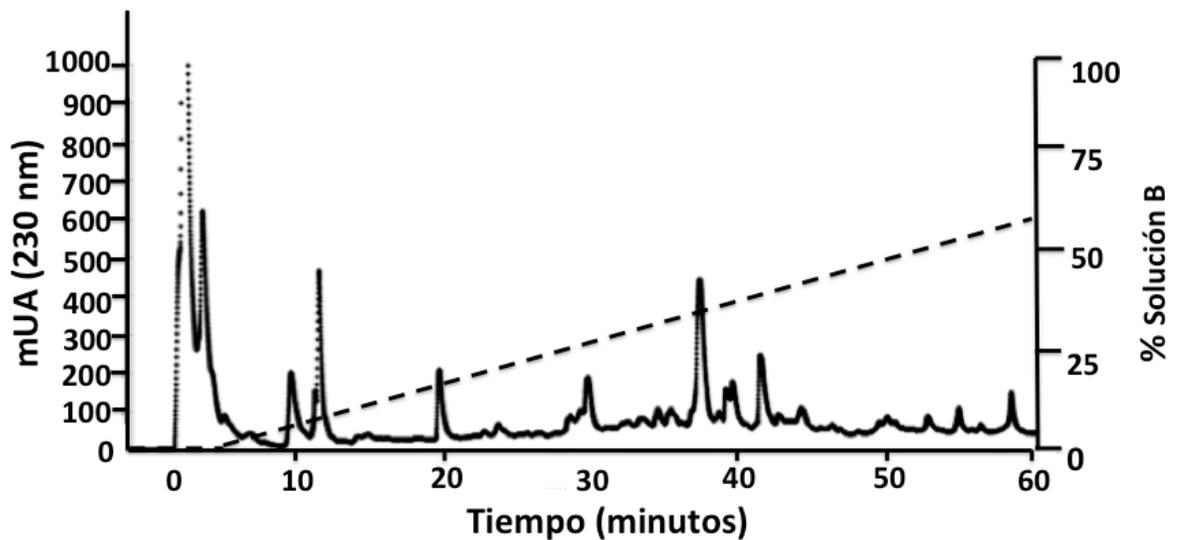


Figura 16. Perfil cromatográfico del extracto total del veneno de *C. ximenes*, aislado de ductos venenosos. Gradiente: sln B 0 % (5 min), 1-60 % (5.1 - 65 min).

Con el protocolo diseñado en los reportes cromatográficos, para *C. regularis* se registraron 60 componentes en promedio, con una longitud de onda de 230 nm. Para *C. californicus*, la figura 15 muestra ~70 componentes del veneno de esta especie, donde la mayor área bajo la curva (ABC) se concentró en los minutos 25 al 45, es decir, con 20 a 40 % de elusión de AcN. Por último, en la separación

analítica del extracto total de *C. ximenes*, se obtuvieron 60 componentes en promedio, figura 16.

La primer purificación de los venenos fue separada en 12 fracciones, donde cada una incluía cinco minutos de colecta. Por lo tanto, en la primera evaluación de la actividad antifúngica, se analizaron 12 muestras del veneno fraccionado. Fue necesario realizar varias corridas cromatográficas, con la intención de obtener las cantidades necesarias de cada una de las fracciones. Todas las muestras fueron liofilizadas hasta su uso posterior en los ensayos que se describen más adelante.

8.4 Caracterización bioquímica y biológica de las conotoxinas aisladas de las diferentes especies de trabajo

A partir de esta sección, todo el trabajo realizado se presenta dividido de acuerdo a los resultados obtenidos de las tres especies: *C. regularis*, *C. californicus*, y *C. ximenes*, en ese orden.

8.4.1 *Conus regularis*: fraccionamiento del veneno y evaluación *in vitro* de la actividad antimicobacteriana de sus componentes

En la primera etapa de la evaluación del veneno fueron analizadas 12 fracciones, mismas que se nombraron como F1 a F12 y los resultados se muestran en la figura 17.

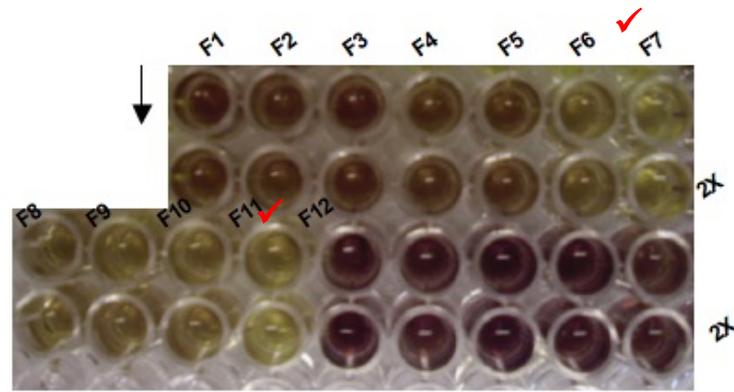


Figura 17. Fotografía de la microplaca que muestra la evaluación de las 12 fracciones del veneno de *C. regularis*. Se destacan a las fracciones marcadas como F7 y F12, porque mostraron inhibir el crecimiento de la cepa H37Rv. La fracción F7, incluye los minutos 35 al 40, y la fracción F12 abarca los minutos 55 al 60. La evaluación se realizó a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. Los controles empleados fueron: CM y CC (datos no mostrados*). La flecha indica la dirección de la disposición del duplicado (2X).

* **NOTA:** En algunas figuras no se muestran los controles CM y CC, por la disposición de la fotografía. En algunos casos, las figuras fueron fragmentadas para mostrar los resultados individuales de los venenos. Por lo que algunas figuras comparten el mismo control de medio y el mismo control de crecimiento.

El resultado muestra que las fracciones F7 y F12 tienen un efecto sobre la cepa H37Rv, a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. La interpretación se basó en que estas fracciones mostraron un color similar al reactivo de revelado MTT (dato no mostrado), en su estado oxidado (color amarillo). Basándonos en el principio del reactivo, se infiere que F7 y F12 tienen efecto inhibitorio al no ser evidente la actividad metabólica de la micobacteria.

El trabajo subsecuente consistió en el análisis de las subfracciones incluidas en los minutos 35 al 40 (fracción F7) y los minutos 55 al 60 (fracción F12). La figura 18 especifica las secciones cromatográficas que incluyen las muestras de interés.

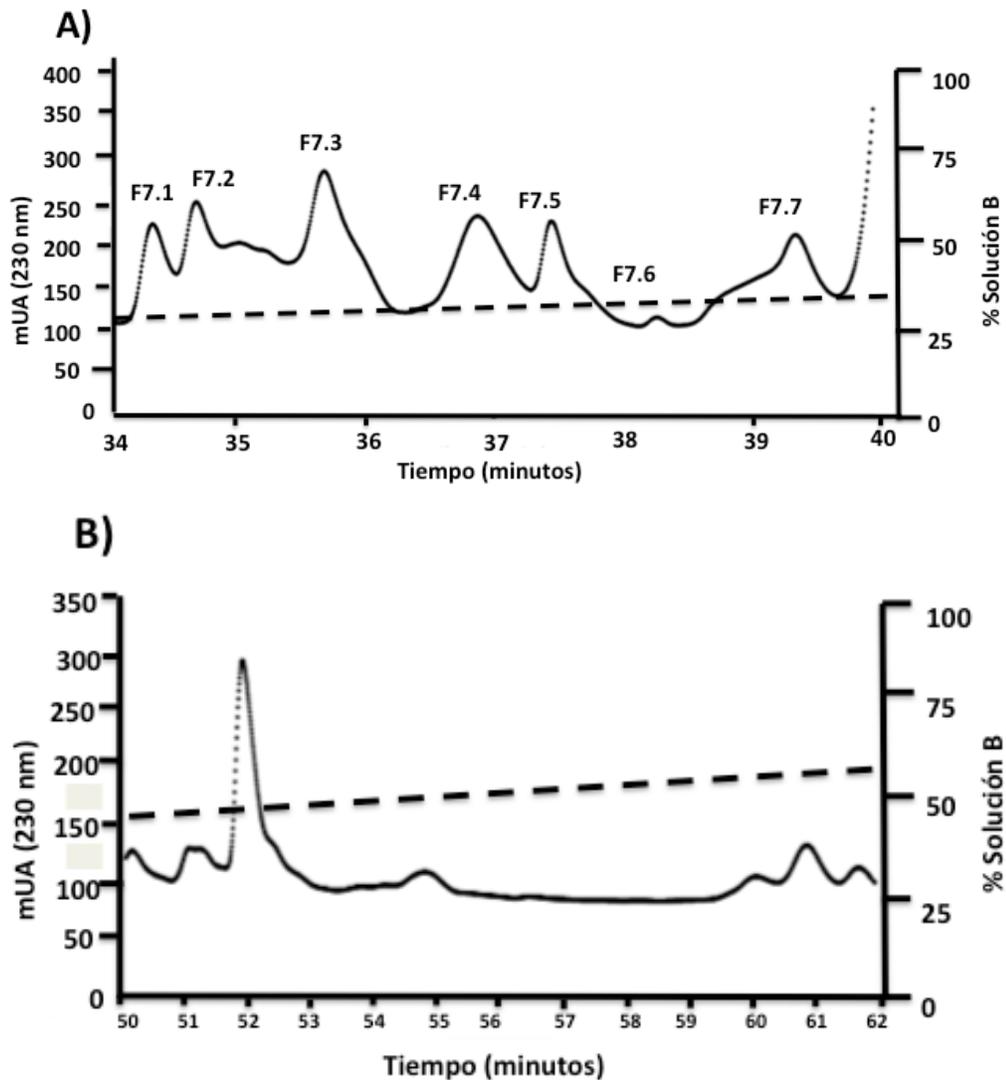


Figura 18. Fragmentos del perfil cromatográfico del veneno total de *C. regularis*. Se muestran las subfracciones incluidas en A) los minutos 35-40 y en B) los minutos 55-60.

La figura anterior indica que en los minutos 35 al 40 se involucran por lo menos siete subfracciones que podrían ser las responsables de la actividad, mismas que fueron codificadas como F7.1 a F7.7. Para el caso de los minutos 55 al 60, no se observan subfracciones aparentes en esa fracción, quizá la actividad observada corresponde a los picos que se observan al principio y al final de la colecta de esa fracción (minutos 54 y 61). Por ser picos de pequeña abundancia, y en ocasiones inapreciables en los perfiles cromatográficos, la muestra F12 fue descartada para los bioensayos subsecuentes. La figura 19 muestra la evaluación de la MIC de las siete subfracciones (F7.1 a F7.7).

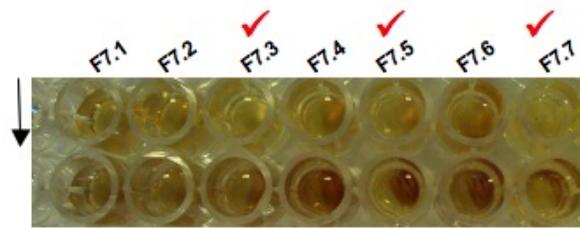


Figura 19. Sección de microplaca que muestra los resultados obtenidos al exponer a las subfracciones F7.1 - F7.7, contra la cepa H37Rv. El ensayo se inició a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, para cada fracción, excepto para la subfracción F7.6 (85 $\mu\text{g/ml}$) por contener picos poco abundantes. Con una flecha se indica la disposición de titulación de la microplaca. Los controles para el ensayo fueron: el CM y el CC (datos no mostrados).

La evaluación *in vitro* del material recién descrito nos indicó que en las subfracciones F7.3, F7.5 y F7.7 se encontraban las posibles toxinas de nuestro interés. Por lo tanto, se realizó un lote de 10 corridas (4.1 mg c/u) con la intención de aislar los picos individuales que nos interesaba repurificar; a continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos de este proceso, tabla 4.

Tabla 4. Características del lote generado para la repurificación de las fracciones F7.3, F7.5 y F7.7

Cantidad de corridas realizadas al veneno total de <i>C. regularis</i>	10
Cantidad total de veneno procesado	41 mg
Cantidad total de material obtenido de la fracción F7.3	1107 μg
Cantidad total de material obtenido de la fracción F7.5	974 μg
Cantidad total de material obtenido de la fracción F7.7	805 μg

De acuerdo al reporte cromatográfico, las subfracciones F7.3, F7.5 y F7.7 son eluidas en los minutos 35.6, 37.4 y 39.3 respectivamente, lo que nos sirvió para determinar el porcentaje de solución B al momento de sus elusiones y diseñar la estrategia de repurificación. Del área total que representa el veneno en el perfil cromatográfico, la subfracción F7.3 en promedio, comprende el 2.19 %, la subfracción F7.5 el 1.45 % y la subfracción F7.7 representa el 2.09 %.

A continuación se muestra el perfil cromatográfico que corresponde a 172 μg repurificados de la subfracción F7.3, 162 μg de la subfracción F7.5 repurificada, y 161 μg repurificados de la subfracción F7.7.

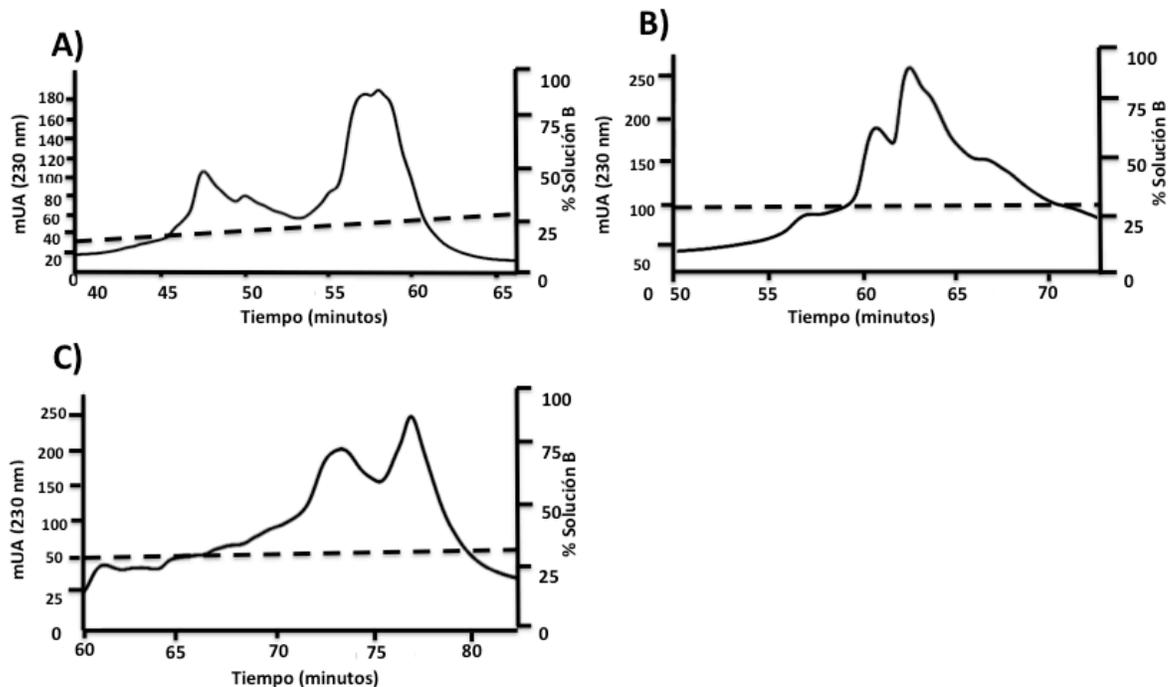


Figura 20. Perfil cromatográfico de la repurificación de: A) la subfracción F7.3; B) subfracción F7.5; y C) subfracción F7.7 del veneno de *C. regularis*.

En los tres casos anteriores, no se logró obtener la separación esperada de los picos individuales que están involucrados en las subfracciones. En éste caso, la cantidad de material biológico fue una limitante para continuar con el trabajo de identificación de las estructuras de las toxinas involucradas en la actividad antimicrobiana en *C. regularis*.

8.4.2 *Conus californicus*: fraccionamiento del veneno y evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de sus componentes

En el primer análisis del veneno de *C. californicus*, tres de las doce fracciones evaluadas, no alcanzaron la concentración inicial sugerida de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Éstas fueron las fracciones F1 (53 $\mu\text{g}/\text{ml}$), F3 (101 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y F4 (124 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La figura 21

muestra el resultado parcial donde se incluye la fracción con actividad y se omiten algunas fracciones sin efecto.

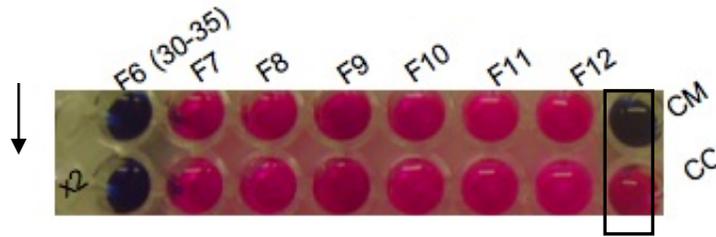


Figura 21. Sección de microplaca que muestra a la fracción F6, comprendida por los minutos 30 al 35. La fracción mostró inhibir el crecimiento de la cepa H37Rv, a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. En el extremo derecho se muestra, en un recuadro, a los controles de CM y CC. La flecha indica la dirección de la disposición del duplicado.

El revelado de las 12 fracciones, muestra que F6 conserva el color de CM, indicándonos la presencia de por lo menos un componente con capacidad de modular la actividad metabólica de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. El resto de las fracciones evaluadas F1 a F5 y F7 a F12 cambiaron de color, tornándose de color rosa igual al CC, sugiriendo la resistencia de la micobacteria al ser expuesta frente a esas fracciones.

El trabajo subsecuente consistió en evaluar las subfracciones incluidas en los minutos 30 a 35 (fracción F6), como se muestra en la figura 22. Fueron incluidos 2 picos después del minuto 35, por ser picos consistentes en el perfil cromatográfico y porque en corridas previas, estos picos estaban incluidos en F6.

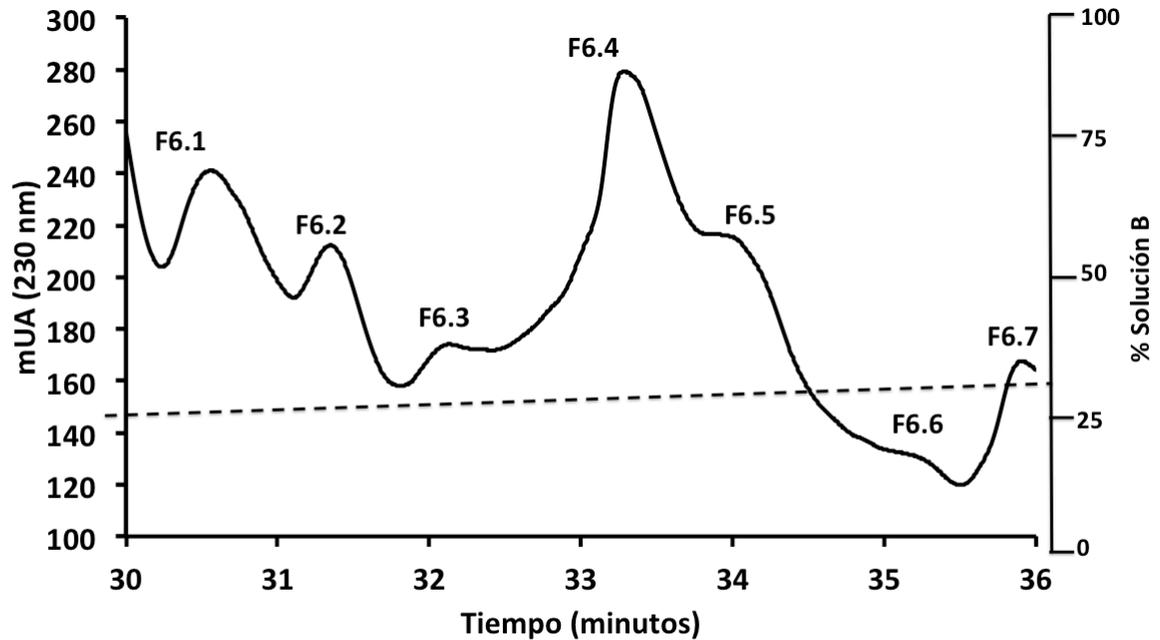


Figura 22. Sección de perfil cromatográfico del extracto total del veneno de *C. californicus* que muestra las siete subfracciones (F6.1 a F6.7) incluidas en los minutos 30 al 35.

De la evaluación correspondiente, el resultado indicó que en la titulación de F6.7 fue evidente la inhibición de *M. tuberculosis* a una concentración de 6.25 $\mu\text{g/ml}$, figura 23. En este ensayo, además del control CC7, se utilizó como control positivo la fracción F6, misma que permitió corroborar los resultados previamente observados, en esta ocasión a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

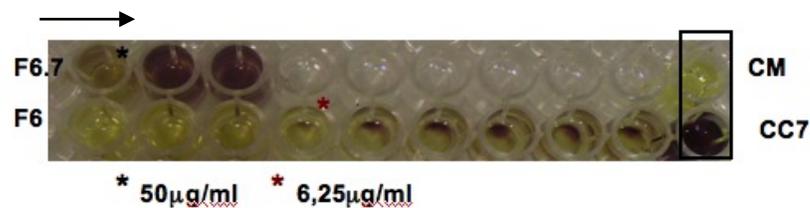


Figura 23. Sección de microplaca que muestra los resultados obtenidos al exponer a la fracción F6.7 y a la fracción control F6, contra la cepa H37Rv. El ensayo se inició a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Con un asterisco se indica el punto de corte (o valor de concentración que define como sensible o resistente a una cepa) de las fracciones evaluadas. Con una flecha se indica la orientación de la titulación en la microplaca. En el extremo derecho se muestra, en un recuadro, a los controles de CM y CC7.

La subfracción de nuestro interés (F6.7), fue eluida en el minuto 35.6 a 35.9. La muestra representó aproximadamente el 0.4 % de los componentes del veneno total. La estrategia de purificación se diseñó considerando que la subfracción eluye al 30 % de solución B. La figura 24 muestra el perfil cromatográfico que corresponde a 33 μg repurificados de esa subfracción.

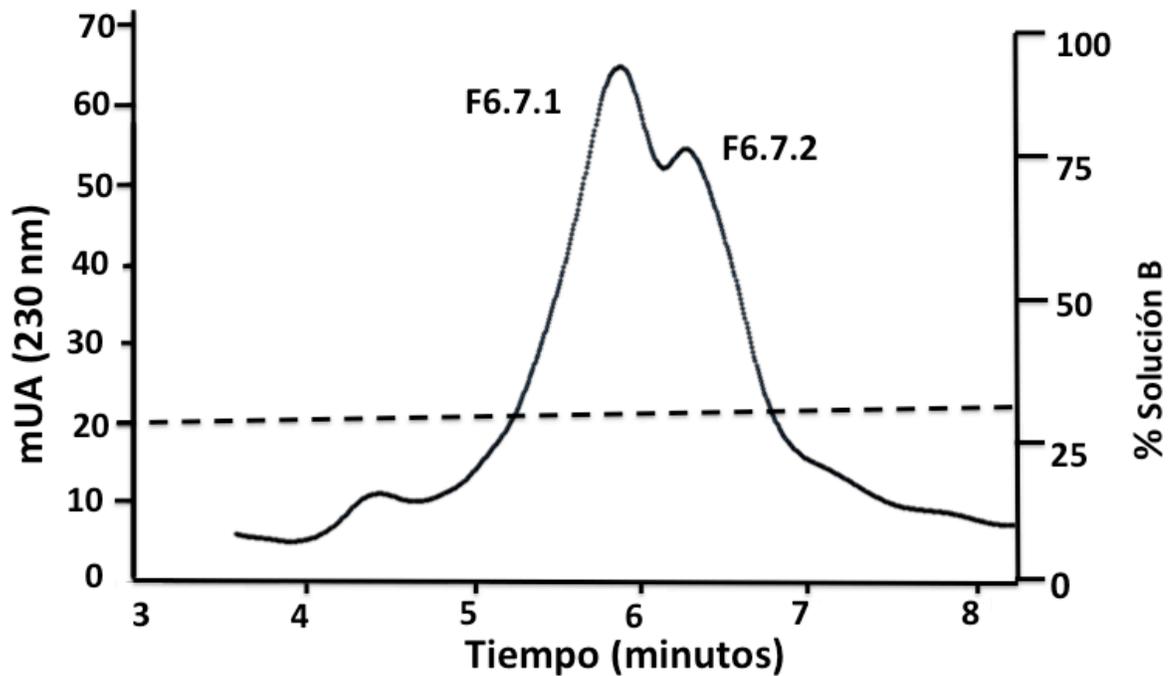


Figura 24. Perfil cromatográfico de la repurificación del minuto 35.6 al 35.9 del veneno de *C. californicus*.

La repurificación de la subfracción F6.7, mostró dos picos contiguos (F6.7.1 y F6.7.2) que no fue posible separar por la poca cantidad de material con que se contaba. La figura 25 muestra los resultados del análisis de los dos picos.

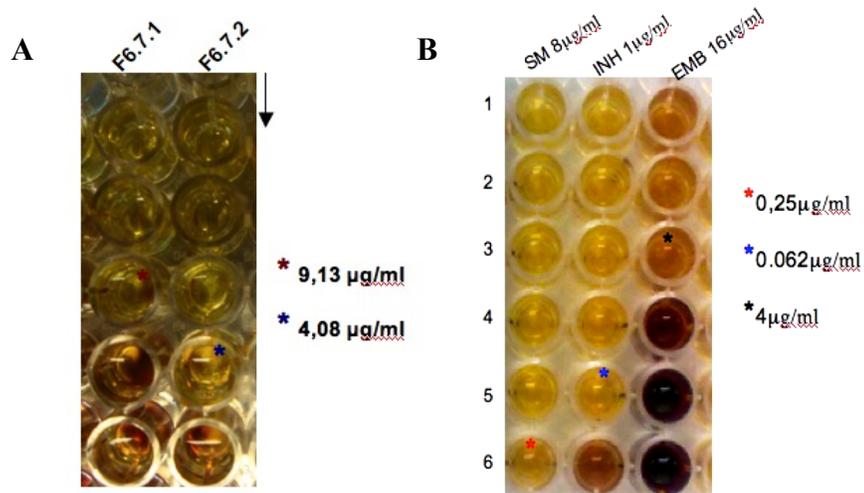


Figura 25. Evaluación de la MIC de: A) los picos F6.7.1 y F6.7.2; B) los fármacos Estreptomicina (SM), Isoniazida (INH) y Etambutol (EMB). Al lado derecho de cada una de las microplacas, se indicó con asterisco la MIC de los fármacos, y de los dos picos evaluados. Con una flecha se indica la dirección de la titulación en las microplacas.

De acuerdo a la figura anterior, inciso A), los dos picos evaluados mostraron tener actividad contra la cepa H37Rv. Sin embargo, el pico F6.7.2 mostró tener un efecto más potente contra la micobacteria que la fracción F6.7.1, logrando inhibir su crecimiento a 4.08 $\mu\text{g/ml}$. Una explicación de los resultados es que pudiera tratarse del mismo componente pero con alguna modificación que permite observarse como dos picos adyacentes, difícilmente separables y altamente contaminado uno con el otro, pero alcanzándose a percibir que la modificación compromete la potencia de la actividad observada. En la siguiente sección, estos resultados son discutidos ampliamente.

En la figura anterior, inciso B), también se incluye el ensayo donde fueron evaluadas las MICs de 3 fármacos de primera línea: estreptomicina, isoniazida y etambutol, con la finalidad de compararlas con las MICs de los picos de nuestro interés. Como se esperaba, la cepa H37Rv fue sensible a los fármacos de primera línea analizados. En nuestros ensayos, el punto de corte para INH fue 0.062 $\mu\text{g/ml}$; para SM fue 0.25 $\mu\text{g/ml}$; y para EMB fue 4 $\mu\text{g/ml}$, que está acorde a lo reportado en la literatura (Martin *et al.*, 2005). Con estos resultados consideramos adecuadas las concentraciones de nuestros picos no puros ya que son efectivos en el orden de

Se realizó una búsqueda de secuencias relacionadas a nuestra secuencia parcial, pero en la base de datos PubMed no se encontró ninguna similitud a las conotoxinas reportadas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Considerando que estamos trabajando con una especie con alta divergencia genética, se podría anticipar el encontrar toxinas nuevas no reportadas para otras especies. A la fecha, solo existen cuatro publicaciones que muestran secuencias de *C. californicus* y algunas no se encuentran registradas en la base de datos mencionada (Biggs *et al.*, 2010; Elliger *et al.*, 2011; Bernáldez *et al.*, 2011; Gilly *et al.*, 2011).

En la publicación de Biggs *et al.*, se reportó una toxina nombrada cl tx-4 que presenta fragmentos de secuencia con similitud al péptido F6.7. A continuación se presenta la secuencia de F6.7 alineada con la secuencia de la toxina cl tx-4, figura 27.

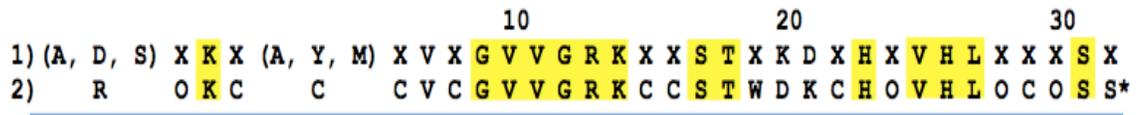


Figura 27. Secuencia primaria parcial del péptido F6.7 (1) alineada con la secuencia de la toxina cl tx-4 (2), descrita por Biggs *et al.*, 2010. Las secciones marcadas en amarillo, son idénticas entre ambas secuencias. O, hidroxiprolina; * amidación del C-terminal.

Como se muestra en la figura anterior, cl tx-4 presenta 3 tipos de modificaciones postraduccionales: 1) 4 enlaces disulfuro, 2) 4 prolina hidroxiladas, y 3) el C-terminal amidado. Se puede observar que todas las modificaciones postraduccionales de cl tx-4 corresponden a una "X" o a un aminoácido no especificado en la secuencia de F6.7. Para sustentar la hipótesis de que se trata de la misma toxina, se hizo un análisis en la base de datos Peptide Synthetics (2012) de la masa molecular monoisotópica experimental de F6.7 con la masa molecular monoisotópica teórica de cl tx-4 (<http://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>), resultando en un peso molecular de 3542.50 Da para ambos casos. De esta

manera, se puede sugerir que la secuencia de nuestra conotoxina con actividad anti-tuberculosis es: R O K C C C V C G V V G R K C C S T W D K C H O V H L O C O S S, donde se incluyen 8 cisteínas comprometidas en enlaces disulfuro, 4 prolinas hidroxiladas y el C-terminal amidado.

Para asignar el nombre al péptido F6.7, fue considerada la nomenclatura convencional para las conotoxinas con mecanismo de acción no identificado: donde “cal” corresponde a la especie *C. californicus*, el número arábigo “26” para asignar el último patrón de cisteínas reportado; y la letra “a” para indicar a la conotoxina como la primera variante de una posible familia (Olivera *et al.*, 2001; Terlau & Olivera, 2004). De esta forma, estaremos nombrando a nuestra conotoxina: cal26a.

8.4.2.2 Clonación del gen cal26a correspondiente a una conotoxina nativa de *C. californicus*

8.4.2.2.1 Extracción e integridad del ARN

Para la especie *C. californicus* se realizaron dos extracciones de ARN total. Para el primer caso se manipularon 5 ductos, se extrajeron 20 μg de ARN total y se obtuvieron 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disuelto en agua con DEPC. El valor de la relación A260/A280 fue de 1.88 y el grado de pureza fue considerado aceptable, de acuerdo con lo reportado por el proveedor del reactivo (Sigma-Aldrich), donde el valor esperado debe ser ≥ 1.7 .

Para la segunda extracción de ARN total, se planteó mejorar nuestra manipulación de los ductos venenosos y obtener las muestras de ARN más concentradas. Por lo tanto, al realizar la disección de los aparatos venenosos, se trabajó con los organismos vivos y una vez aislados los ductos venenosos, inmediatamente fueron dispuestos en solución ARNlater®, para lograr una inmediata inactivación de enzimas RNAsas. El resultado de esta segunda extracción fue de aprox. 200 μg de ARN total, dispuestos en alícuotas de 4.49 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (nombrada M1) y 3.56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (nombrada M2). La relación A260/A280 para ambas alícuotas fue de 1.95. La figura

28 muestra el resultado de la migración de las dos alicuotas (M1 y M2) del ARN total, obtenido de la segunda extracción.

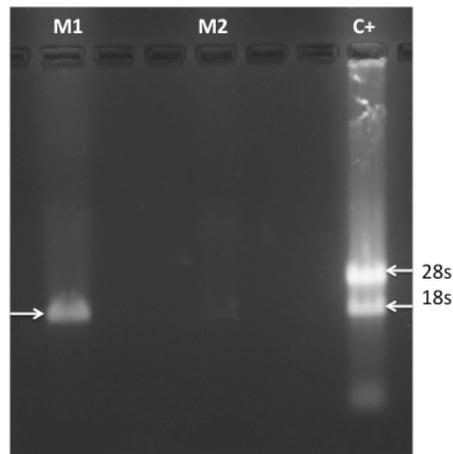


Figura 28. Electroforesis de ARN de ductos venenosos de *C. californicus*, en amortiguador TAE 1X, para evaluar la integridad del material biológico. En M1: se cargaron 3 μl del ARN (4.49 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En M2: se cargó 1 μl del ARN (3.56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En C+ se muestra el ARN que se utilizó como control positivo (extracción de ARN del bazo del tiburón *Heterodontus francisci*), donde se observan 2 bandas abundantes, que corresponden a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal (ARNr).

La figura anterior muestra que en M1 y M2 migró solo una banda, que es de tamaño similar a la banda 18S de nuestro control. En relación al ARN de moluscos, se han evidenciado resultados similares a los nuestros, donde se ha indicado que el ARN ribosomal de mayor peso molecular sufre un corte enzimático y da como resultado 2 bandas de tamaño similar, y a la vez parecido al de la banda de ARNr de menor peso. Este fenómeno que ocurre en el ARNr 28S se ha reportado previamente como “gap deletion” (nombre en inglés) para algunas especies de crustáceos e insectos (Wink, 1984; Winnebeck *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012). Así, nuestros resultados sugieren un evento de esa naturaleza al observarse una sola banda a la altura de la banda 18S pero de mayor grosor. Por lo tanto, consideramos que nuestro material biológico, era apto para realizar los siguientes ensayos.

8.4.2.2.2 Optimización del diseño y uso de oligonucleótidos

8.4.2.2.2.1 Amplificación del extremo 5' usando oligonucleótidos CcalR y Ccal2R

Después de obtener el ADNc mediante retrotranscripción se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos externos 5' RACE y CcalR. Como se observa en la figura 29A, en el producto de PCR se obtuvieron tres bandas principales con los tamaños aproximados de 420 pb, 550 pb y 650 pb. Con el resultado anterior se decidió hacer un PCR anidado, es decir, tomando como molde el producto de la primera PCR. Para la reacción se usó el cebador interno 5' RACE y el externo CcalR previamente usado, ya que en ese momento no se contaba con el cebador interno de la secuencia peptídica.

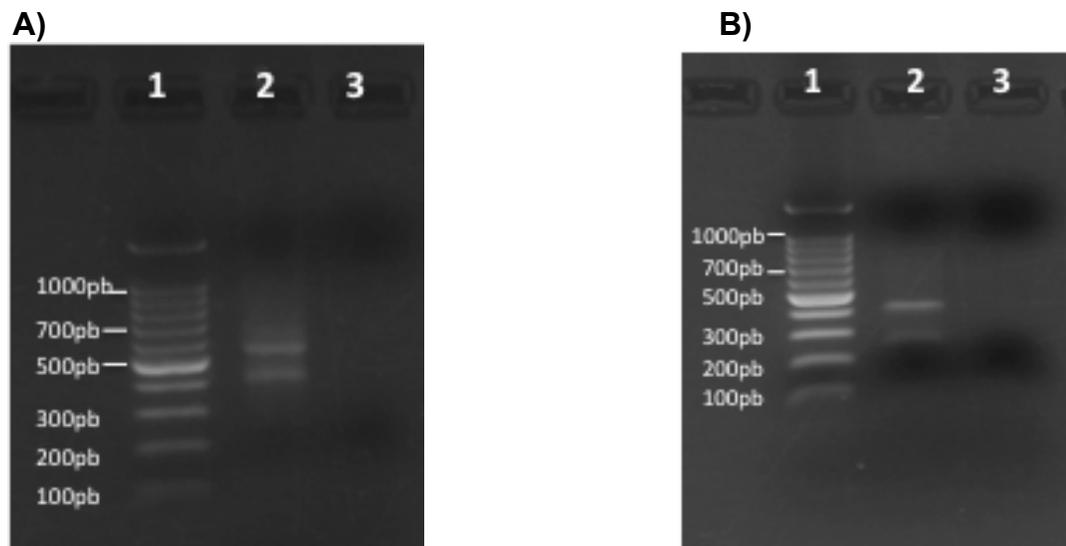


Figura 29. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se ve la migración de varias bandas amplificadas. En A) carril 1: se observa el marcador de peso molecular. En carril 2: se destacan las bandas a 420 pb, 550 pb y 650 pb como resultado del uso de los cebadores 5' RACE externo y CcalR; el carril 3: corresponde al control negativo donde se incluyen todos los componentes de la PCR menos ADN. En B) carril 1: marcadores de peso molecular; en carril 2: se observan las bandas a 280 pb y 420 pb obtenidas de la amplificación con los cebadores 5' RACE interno y CcalR; en el carril 3: migró el control negativo. El marcador de peso molecular en ambos geles fue el 100 bp Ladder Marker de Promega.

La razón de realizar la segunda PCR fue obtener un menor número de bandas, más específicas. De acuerdo con la figura 29B, en el producto de PCR se

obtuvieron dos fragmentos, uno a 420 pb que podría corresponder a la banda obtenida en el PCR previo por tener un peso molecular similar; el segundo fragmento se observó a 280 pb. Por lo tanto, la banda con mayor peso molecular fue cortada y purificada. Previamente a la clonación fue necesario obtener mayor concentración del fragmento, por lo que se realizaron 2 reacciones de 50 μ l para concentrar el material. Después se realizó el trabajo de clonación de la banda en el vector pGEM-T, seguido de la transformación de los plásmidos en las células DH5 α . Como variación a la metodología general, no se adicionó X-Gal ni IPTG a las cajas de medio LB, por lo que la selección de las colonias positivas se basó en los resultados de las PCR de colonia. Se analizaron 35 colonias por PCR donde 23 tenían el tamaño de inserto esperado. Los plásmidos que contienen los fragmentos de tamaño \geq 650 pb fueron preparados para su secuenciación. Fueron descartadas aquellas colonias con dobles insertos.

Para la siguiente prueba de cebadores ya se contaba con el oligo Ccal2R que corresponde a la secuencia 3' interna de nuestro gen. Para este análisis, se tomó como ADN molde el producto de la primera PCR descrita (donde se usaron los cebadores 5' RACE externo y CcalR). Las condiciones y programa de PCR empleado corresponde a lo descrito previamente y enlistado en tabla 3. A continuación se muestra el resultado de PCR obtenido con los oligonucleótidos 5' RACE interno y Ccal2R.

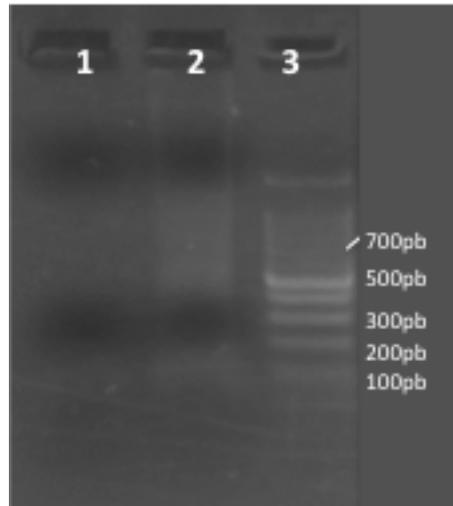


Figura 30. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (1 mg/ml) que muestra el producto de la PCR con los cebadores 5' RACE interno y Ccal2R. En carril 1: el control negativo, en carril 2: el producto de la PCR con los cebadores 5' RACE interno y Ccal2R donde no se observan bandas definidas; y carril 3: marcador de peso molecular de Promega 100 bp Ladder Marker.

El resultado anterior nos indicó que el producto de PCR presentaba gran inespecificidad con los cebadores ya mencionados. Por lo tanto, se decidió trabajar la amplificación del extremo 3' RACE.

8.4.2.2.2 Amplificación del extremo 3' usando oligonucleótidos CcalF y Ccal2F

En el primer acercamiento para amplificar la región 3', se usaron los cebadores externos: CcalF (sentido) y 3' RACE (antisentido). El resultado indica que se amplificaron numerosas bandas donde destacan las de peso aproximado a 380 pb, 450 pb y 580 pb, figura 31A. Por lo tanto, se siguió la estrategia de PCR anidado esperando una disminución del número de bandas.

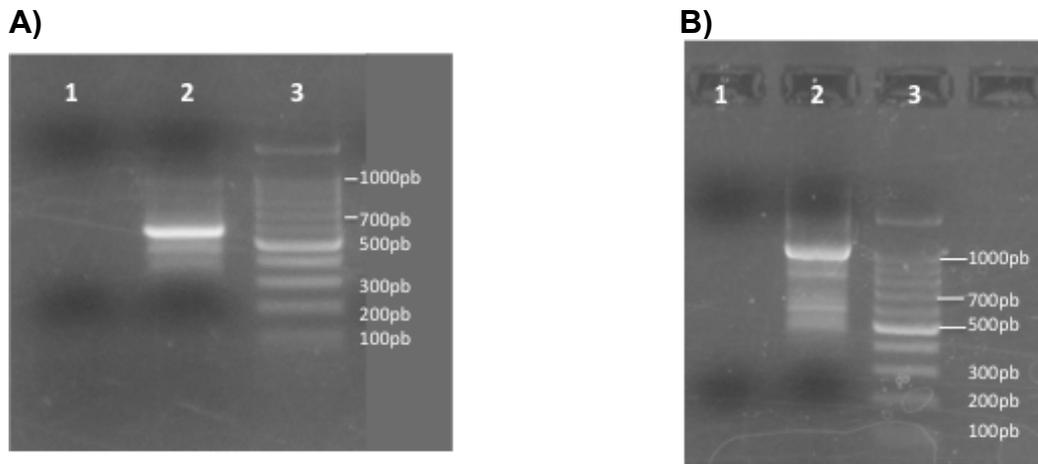


Figura 31. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (1 mg/ml), donde se muestran los productos de PCR usando los cebadores CcalF y 3' RACE externo; y los cebadores Ccal2F y 3' RACE interno. La figura 31A muestra en carril 1: el control negativo, en carril 2: la amplificación de varias bandas donde destacan la de 380 pb, 450 pb y 580 pb, usando los cebadores CcalF y 3' RACE externo; en carril 3: se muestra el marcador de peso molecular de Promega 100 bp Ladder Marker. Para la figura 31B se presenta en el carril 1: el control negativo, en carril 2: se observa gran número de fragmentos amplificados con los cebadores Ccal2F y 3' RACE interno; y en carril 3: se corrió el mismo marcador de peso molecular que en el gel anterior.

La figura 31B, muestra el resultado de la anidación con los cebadores Ccal2F y 3' RACE interno, que se alinean en la región interna de la toxina. Se observó que el producto de PCR presenta un patrón complicado de numerosas bandas ya que el utilizar cebadores con alta inespecificidad, incrementa exponencialmente el número de posibles blancos para su alineamiento.

Para la optimización de los cebadores usados se trabajaron las siguientes temperaturas de alineamiento: 62 °C, 64 °C y 66 °C. En los resultados que se muestran en la figura 32 se observa que la reacción de la variable de 62 °C mostró mayor número de bandas al igual que lo observado a 60 °C (figura 31), pero con mejor definición, por lo que fueron cortadas para proceder con la clonación.

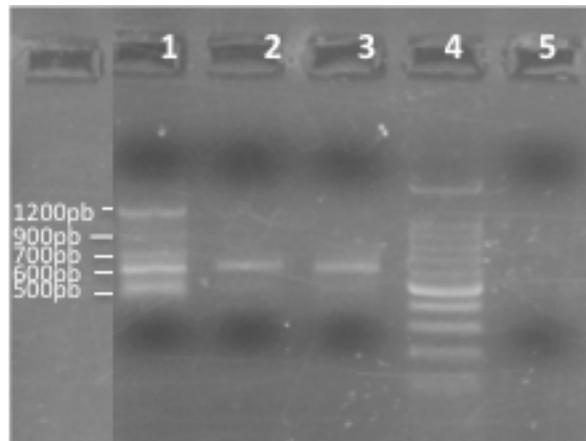


Figura 32. Gel de agarosa que muestra los productos de PCR donde se usaron los cebadores Ccal2F y 3' RACE interno a diferentes temperaturas de alineamiento. En carril 1: se muestran 5 bandas de 500 pb, 600 pb, 700 pb, 900 pb y 1200 pb amplificadas a una Ta de 62 °C; en carril 2: se muestra la conservación de la banda a 600 pb y la de 500 pb con menor intensidad, resultado de una Ta de 64 °C; en carril 3: se observa un resultado similar que lo observado en carril anterior, a una Ta de 66 °C; en carril 4: se corrió el marcador de peso molecular de Promega 100 bp Ladder Marker; finalmente en carril 5: el control negativo.

De la reacción de PCR con Ta: 62 °C (carril 1), se cortaron 4 bandas de pesos aproximados a: 500 pb, 600 pb, 900 pb y 1200 pb, mismos que después de ser purificados fueron clonados en el vector pGEM-T (descrito en metodología). Previamente a cada clonación, para concentrar el material se realizaron 2 reacciones de 50 μ l y se procedió a la purificación. Como se desconocía el tamaño de banda de nuestro gen, fue necesario analizar un gran número de bandas con diferente peso molecular. En total fueron analizados 50 clones a partir de las 4 bandas cortadas. Del material anterior, 34 clones presentaron el tamaño de inserto esperado, mismos que se prepararon para analizar su secuencia.

El resultado final de esta sección de trabajo se resume de la siguiente manera: a partir del uso de los cebadores 3' RACE interno y Ccal2F, fueron analizados 34 clones de los cuales se obtuvieron 13 secuencias que presentan un porcentaje de identidad bajo a: precursores de conotoxinas, o bien a las toxinas maduras. Según su análisis, se obtuvieron clones con bajo porcentaje de identidad a secuencias de miembros de la superfamilia O. Se obtuvieron secuencias con escaso porcentaje que pertenecen parcialmente a la superfamilia M; así como a los precursores de las

κ -conotoxinas y μ -conotoxinas. Por último, también se encontró la secuencia completa (el 100 % de 69 aminoácidos) del precursor peptídico de la conotoxina Cal6.2, reportada por Biggs *et al.*, 2010. Esta conotoxina corresponde al patrón de cisteínas VI/VII de la Superfamilia O. Pero por no formar parte de este trabajo y debido a que no se encontró ninguna secuencia similar a lo que es nuestro interés, no se incluyeron esos resultados.

Por otro lado, y continuando con nuestro objetivo, se planeó el diseño de otros cebadores considerando la frecuencia relativa de codones que han sido reportados para las especies de caracoles marinos *Conus quercinus* y *Conus regius*, por lo que el grado de degeneración se vio reducido.

8.4.2.2.3 Amplificación del extremo 5' usando oligonucleótidos CcalER y CcallR

En el segundo intento por amplificar el extremo 5' se emplearon cebadores con menor grado de degeneración. Sin embargo, en el producto de PCR amplificado con los cebadores externos 5' RACE y CcalER (figura 33, carril 2), no se apreció ninguna banda que fuera de interés aparente; más bien por el tamaño del fragmento amplificado se considera que pudiera corresponder a los cebadores dimerizados.

En base a los resultados anteriores, se realizó el PCR anidado utilizando los cebadores internos 5' RACE y CcallR. Sin embargo, tampoco se identificó claramente alguna banda amplificada (figura 33, carril 3), por lo que se decidió iniciar nuevamente nuestra búsqueda del gen *cal26a* desde una segunda extracción de ARN total de ductos venenosos.

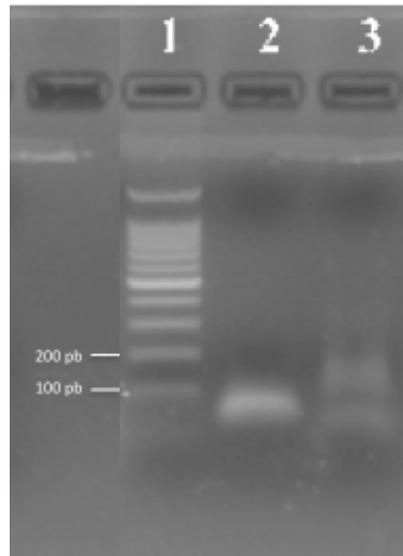


Figura 33. Gel de agarosa con la PCR usando los cebadores externos 5' RACE y CcalER; y el uso de los cebadores internos 5' RACE y CcalIR. En carril 2: productos de PCR usando los cebadores externos 5' RACE y CcalER. En carril 3: uso de los cebadores internos 5' RACE y CcalIR. El marcador de peso molecular migró en el carril 1 y fue 100 bp Ladder Marker de Promega. En ambas PCRs no se obtuvieron bandas de interés para su clonación.

8.4.2.2.4 Amplificación del extremo 3' usando oligonucleótidos CcalEF y CcalIF

Para iniciar la segunda búsqueda del extremo 3', se trabajó con nuevo material de ARN total (mencionado previamente). En este caso, fueron manipulados un mayor número de organismos, intentando obtener una mayor diversidad de ARNm que codifiquen para diversas toxinas, donde se incluya la de nuestro interés. Además, el material fue dispuesto en ARN later, solución que garantiza una inhibición rápida y eficiente de enzimas ARNsas que pudieran degradar el material biológico.

El producto de PCR empleando los cebadores externos 3' RACE y CcalEF se muestra en la figura 34A, donde se obtuvieron de 5 a 6 bandas amplificadas, por lo que se planteó el segundo PCR utilizando los cebadores internos 3' RACE y CcalIF, figura 34B. El resultado nos indica una banda única a 150 pb, que si bien, es de tamaño pequeño debemos recordar que estamos trabajando con un cebador que se alinea en la parte interna de nuestra toxina y que desconocemos la región 3' no traducida. Considerando lo reportado para las regiones 3' no traducidas

(UTR, por sus siglas en inglés) de diferentes genes que codifican conotoxinas, el rango puede ser muy amplio, varía desde 56 pb reportado para la conotoxina Mal51P, aislada de *C. marmoratus*, hasta 770 pb que contiene la región 3'-UTR de la conotoxina α -S II aislada de *C. striatus* (Luo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003). Dicho lo anterior, la banda de 150 pb fue reservada para su clonación.

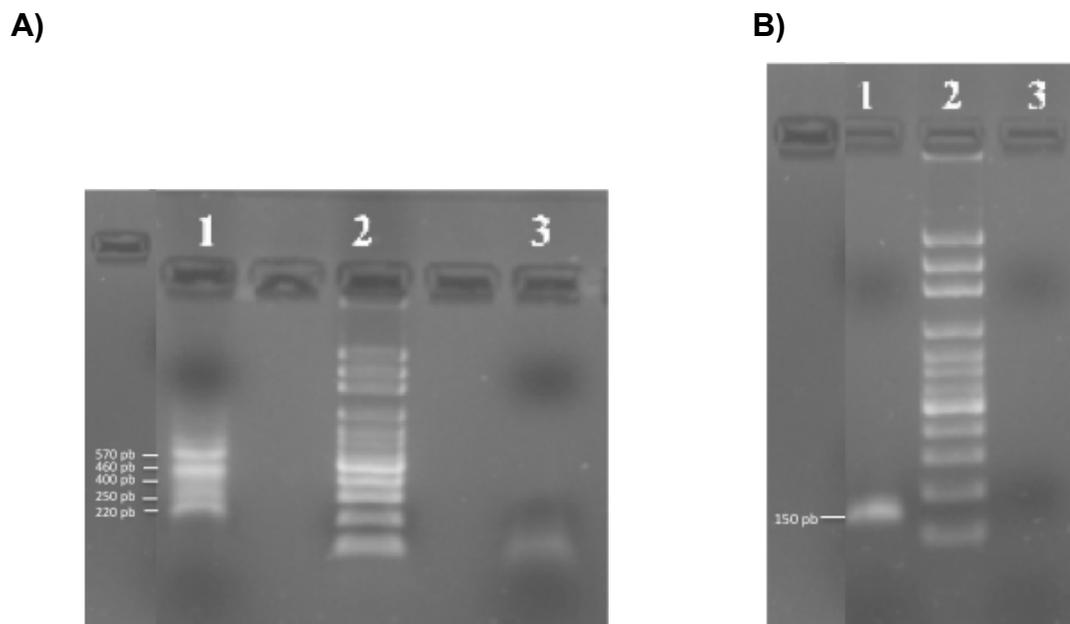


Figura 34. Geles de agarosa que muestran los resultados de las PCRs donde se usaron dos juegos de cebadores. En A), carril 1, se muestra la amplificación de 5 ó 6 bandas como producto de la alineación de los cebadores externos 3' RACE y CcalEF; carril 2, muestra el marcador de peso molecular de ADN; y en carril 3 se presenta el control negativo. En B), carril 1, se observa la alineación de los cebadores internos 3' RACE y CcalIR donde el producto resultó en la amplificación de una banda de 150 pb; en carril 2, se muestra el marcador de peso molecular; y en carril 3 se presenta el control negativo. Las bandas obtenidas fueron de interés para purificarlas y clonarlas posteriormente. En ambos geles se usó el marcador de peso molecular 100 bp Ladder Marker (Axygen).

Como parte de la estandarización se realizó un gradiente de $MgCl_2$ al primer producto de PCR que presentó varias bandas con poca definición. La finalidad era conocer la concentración ideal de ese cofactor para lograr la definición de las bandas. Se realizaron cinco reacciones de PCR con las concentraciones desde 1.5 mM hasta 5.5 mM de $MgCl_2$, con un incremento de 1 mM, por reacción. El resultado de la amplificación se muestra en la figura 35.

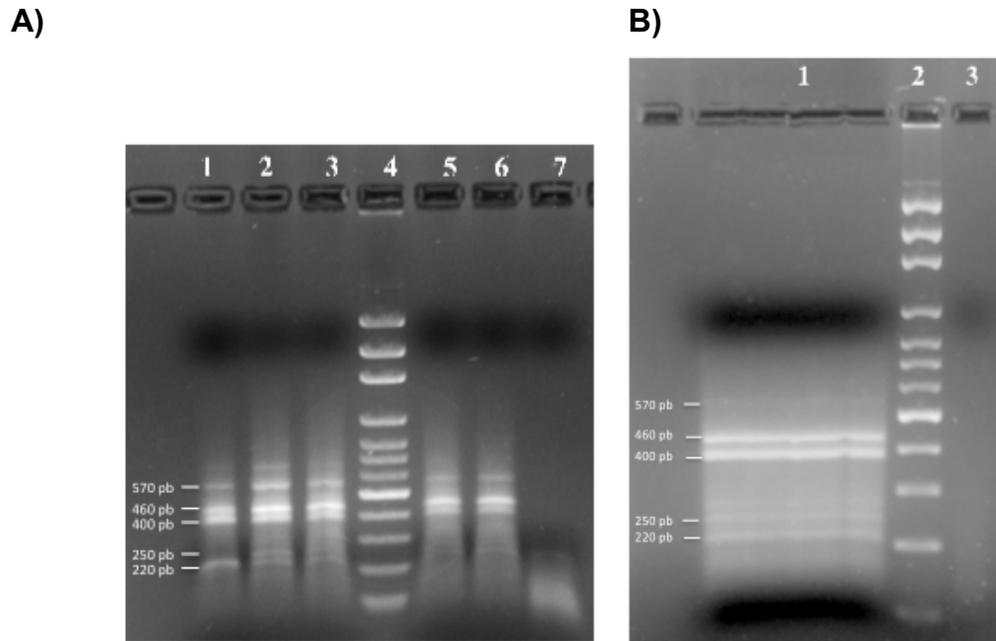


Figura 35. Geles de agarosa con los productos de PCR que muestran, en inciso A) el gradiente de concentración de MgCl₂. En carril 1 se trabajó con 1.5 mM de MgCl₂, en carril 2 con 2.5 mM, en carril 3 con 3.5 mM, en carril 4 se corrió el marcador de peso molecular, en carril 5 con 4.5 mM, en carril 6 con 5.5 mM de MgCl₂ y finalmente, en carril 7 se presenta el control negativo. Para el inciso B) carril 1, se observa el corrimiento de 100 µl de producto de PCR a 2.5 mM de MgCl₂; en carril 2, se observa el marcador de peso molecular, y en carril 3, el control negativo. Los marcadores de peso molecular fueron: 100 bp Ladder Marker (Axygen).

En la figura anterior se puede observar que la reacción con mejor definición de bandas corresponde a la concentración de 2.5 mM de MgCl₂ (carril 2). Por lo tanto, esas condiciones fueron empleadas para recuperar cinco bandas de tamaño aproximado a: 570 pb, 460 pb, 400 pb, 250 pb y 220 pb, mostradas en la figura 35B. La banda amplificada a 680 pb aproximadamente resultó difícil de recuperar por lo que fue descartada. El producto de la purificación de cada banda fue cuantificado y reamplificado de forma individual en una PCR, con las condiciones descritas. El resultado de la reamplificación se muestra en la figura 36:

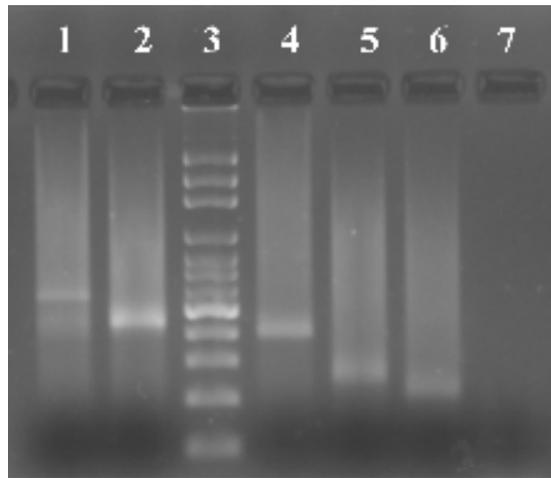


Figura 36. Reamplificación de 5 fragmentos de PCR elegidos para ser clonados. En carril 1 se observa a la banda de 570 pb, en carril 2 la banda de 460 pb, en carril 3 el marcador de peso molecular, en carril 4 la banda de 400 pb, en carril 5 la banda de 250 pb, en carril 6 la banda de 220 pb y finalmente en carril 7 el control negativo. El marcador de peso molecular fue 100 bp Ladder Marker (Axygen).

Los productos de las PCRs anteriores fueron purificados individualmente, incluyendo la banda de 150 pb obtenida de la PCR anidada, y cuantificados para determinar la relación molar inserto: vector, y finalmente realizar su clonación en el vector pGEM-T. De lo anterior, se clonaron seis bandas y se analizaron las secuencias de diez a veinte clones por banda.

El resultado del análisis de la banda amplificada a 250 pb, nos llevó a encontrar la región 3' de nuestro gen de interés, *ca/26a*. La secuencia nucleotídica obtenida corresponde a la región de la toxina madura, la cual incluye un codón que codifica el aminoácido glicina (GGC), esto previo al codón de paro (TGA). La figura 37 muestra la secuencia parcial nucleotídica y secuencia parcial deducida de aminoácidos del ADNc de nuestro gen.

```

AGG CCT AAA TGC TGT TGT GTC TGC GGT GTG GTG GGT CGT AAA TGC TGC AGT
R   P   K   C   C   C   V   C   G   V   V   G   R   K   C   C   S

ACC TGG AAG GAT TGT CAT CCT GTT CAC CTT CCT TGC CCC AGC AGT GGC TGA
T   W   K   D   C   H   P   V   H   L   P   C   P   S   S   G   *

CCT TCT TCC TAT CCG TCC TTC TTC TGA TAG CTG CAG AGA GTG ATG AAT CAC
TGT AAC ATG TAG CGA TCT CAG GCA CAG GAG GGC CAG CTT GAT ATT AAA GAC
CAG ACC GCA ATG ACC AGC AAAAAAAAAA

```

Figura 37. Secuencia parcial nucleotídica y secuencia parcial deducida de aminoácidos del ADNc del gen *cal26a*. El codón de paro (TGA), está indicado con el asterisco. Esta secuencia es el resultado de la traducción del clon codificado como C29 (250pb).

Con la obtención de la secuencia de la región 3' de nuestro gen se abrió la posibilidad de diseñar cebadores específicos que nos permitieran amplificar de forma rápida y eficiente la región del péptido señal.

8.4.2.2.5 Amplificación del extremo 5' usando oligonucleótidos Ccal3ER y Ccal3IR

Los cebadores específicos del gen *cal26a* se nombraron Ccal3ER y Ccal3IR, donde el primero se alinea en la secuencia de la región 3' no traducida (o 3' UTR por sus siglas en inglés), y el cebador interno en la secuencia 3' de la toxina, incluyendo solo hasta la glicina (secuencia LPCPSSG).

La primera PCR se realizó empleando el cebador externo Ccal3ER y el producto de esa reacción resultó en la amplificación de una banda a 420 pb, como se muestra en la figura 38A. El resultado de la anidación del producto anterior, se procesó con el cebador interno Ccal3IR, donde se obtuvo una banda prominente a 380 pb, pero con bandas accesorias de mayor y menor peso molecular (figura 38B).

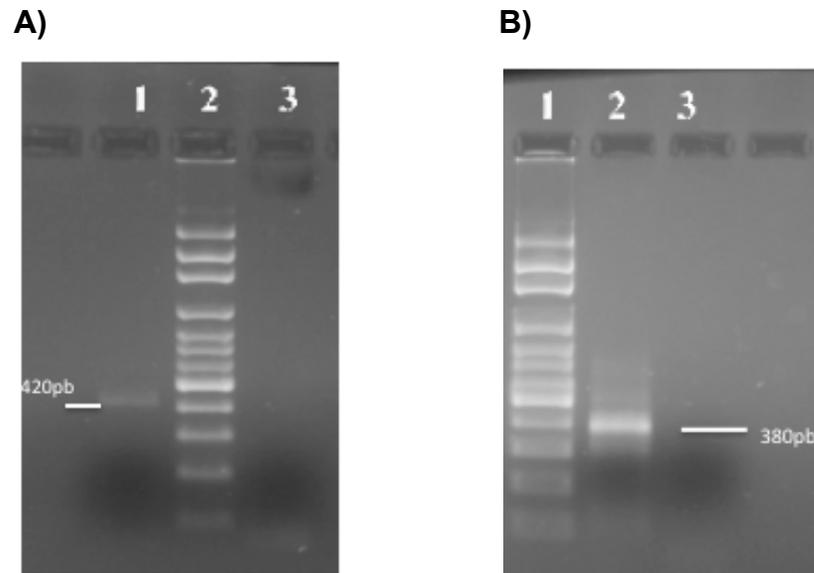


Figura 38. Geles de agarosa que muestran los productos de PCR, A) usando los cebadores 5' RACE externo y Ccal3ER; B) los cebadores internos 5' RACE y Ccal3IR. En inciso A) carril 1, se muestra la banda obtenida a 420 pb, en carril 2 el marcador de peso molecular de fragmentos de ADN, y en carril 3 el control negativo. En inciso B) carril 1, se observa el marcador de peso molecular de ADN, en carril 2 se muestran varias bandas donde se obtuvo una banda prominente a 380 pb, en carril 3 se muestra el control negativo. El marcador de peso molecular usado en ambos casos fue 100 bp Ladder Marker (Axygen).

Con los resultados anteriores, se planteó realizar una reacción de 100 μ l igual a la indicada en la figura 38B, para contar con material suficiente para su purificación. Debido a que la banda mostrada a 380 pb tiene otra banda cercana a 350 pb, se realizó el corte de ambas y se manipularon por separado, figura 39A. El inciso B, presenta el producto de PCR de las bandas 380 pb y 350 pb reamplificadas por separado.

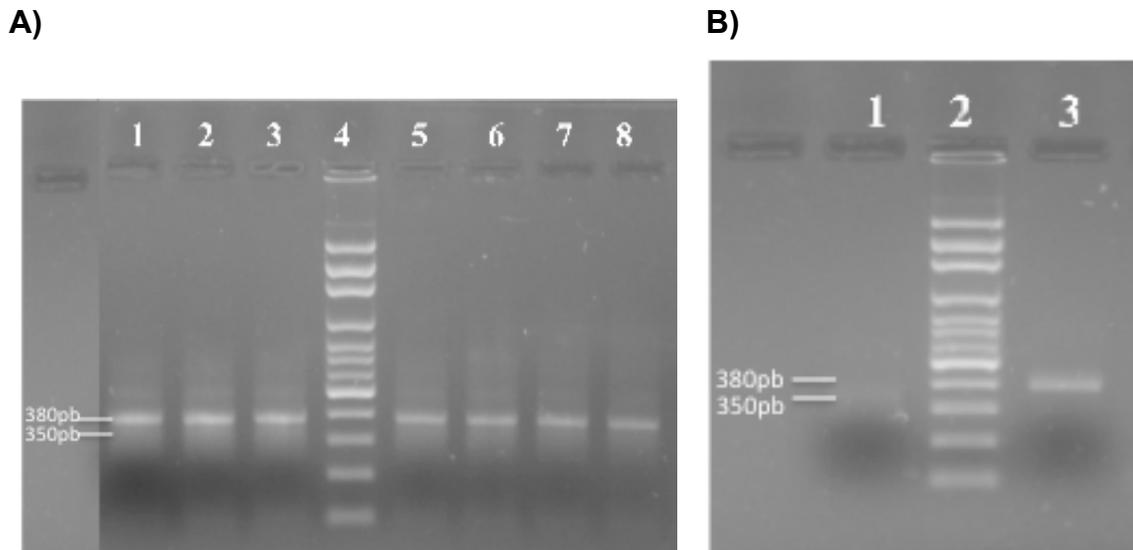


Figura 39. Geles de agarosa que muestran los productos de las PCRs usando los cebadores 5' RACE externo y Ccal3ER. En el inciso A) carriles 1-3 y 5-8 se observa el producto de una reacción de 100 μ l para concentrar la muestra y purificarla, donde se exceptúa al carril 4 que corresponde al marcador de peso molecular. El resultado de las bandas cortadas y reamplificadas se observa en el inciso B) carril 1 banda de 350 pb, y carril 3, banda de 380 pb. En carril 2, migró el marcador de peso molecular 100 bp Ladder Marker (AXYGEN).

El material de la figura 39B fue purificado y cuantificado para determinar la relación molar inserto: vector, y finalmente realizar su clonación en el vector pGEM-T. Para cada caso, se analizó el tamaño de inserto de 12 colonias, donde solo se enviaron a secuenciar los plásmidos con tamaños de 620 pb para la banda de mayor peso y 590 pb para la banda menor, figura 40.

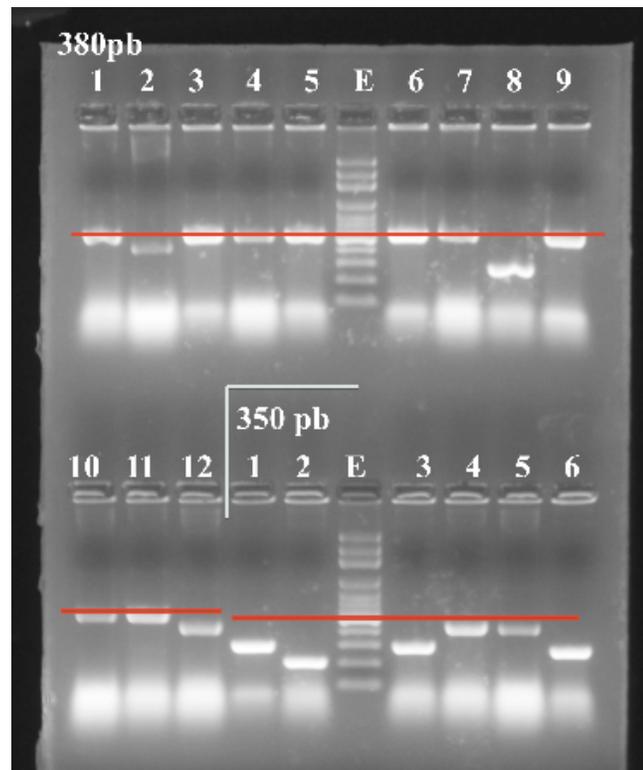


Figura 40. Productos de PCR de las colonias utilizando oligonucleótidos específicos M13F y M13R. La línea roja indica la posición donde se encuentra el tamaño de banda esperado a 620 pb (esto para la clonación de la banda de 380 pb), y 590 pb (para la clonación de la banda de 350 pb). Los carriles E corresponden a al marcador de peso molecular de 100 bp Ladder Marker (Axygen), y los carriles enumerados pertenecen a los productos de PCR de colonia.

Una vez analizadas las secuencias obtenidas, se encontró que la banda a 380 pb corresponde al gen buscado. En la figura 41, se presenta la secuencia resultante que incluye el péptido señal, la región del propéptido y la secuencia de la toxina madura que presenta el patrón de cisteínas CCC-C-CC-C-C, mismo que corresponde a nuestra toxina cal26a.

```

ATG AAA CTG ACG TGC GTG TTG ATT GTG GCT GTG CTG ATC TTG GCT GCC TGC CAG TTC ACC
M K L T C V L I V A V L I L A A C Q F T

GCA GCT AAC ATG GCG AGA TAT GGC AAG ACT CAG ATA GCA AGA AGT GAT GTC AAG TCG ATT
A A N M A R Y G K T Q I A R S D V K S I

GAC GCG AGG AGG CCA AAG TGT TGT TGC GTT TGC GGT GTG GTG GGT CGT AAA TGC TGC AGT
D A R R P K C C C V C G V V G R K C C S

```

```

ACT TGG AAG GAT TGT CAT CCT GTT CAC CTT CCT TGC CCC AGC AGT GGC TGA
T W K D C H P V H L P C P S S G *

```

```

cct tct tcc tat ccg tcc ttc ttc tga tag ctg cag aga gtg atg aat cac tgt aac atg tag cga tct cag gca cag
gag ggc cag ctt gat att aaa gac cag acc gca atg acc agc aaaaaaaaaa

```

Figura 41. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos que corresponden al precursor peptídico de cal26a, donde también se incluye la región 3' hasta su poliadenilación. La secuencia subrayada es nuestra conotoxina; el codón de paro (TGA), está indicado con el asterisco. Esta secuencia es el resultado de la traducción del clon de 380 pb.

La parte final de la transcripción del gen se consideró como la base situada inmediatamente anterior a la cola poliA en la secuencia del ARN mensajero. La cola poliA está constituida por 10 nucleótidos adenina y su señal de adición de poliA (PAS por sus siglas en inglés) quizá pudo ser modificada por error de la PCR, ya que una señal de adición corresponde a la secuencia aataaa, mientras que en este caso la secuencia es atattaa.

Con la información obtenida se realizó la predicción del corte enzimático del péptido señal con el programa SignalP-4.0 del Center for Biological Sequence analysis (2012)., figura 42.

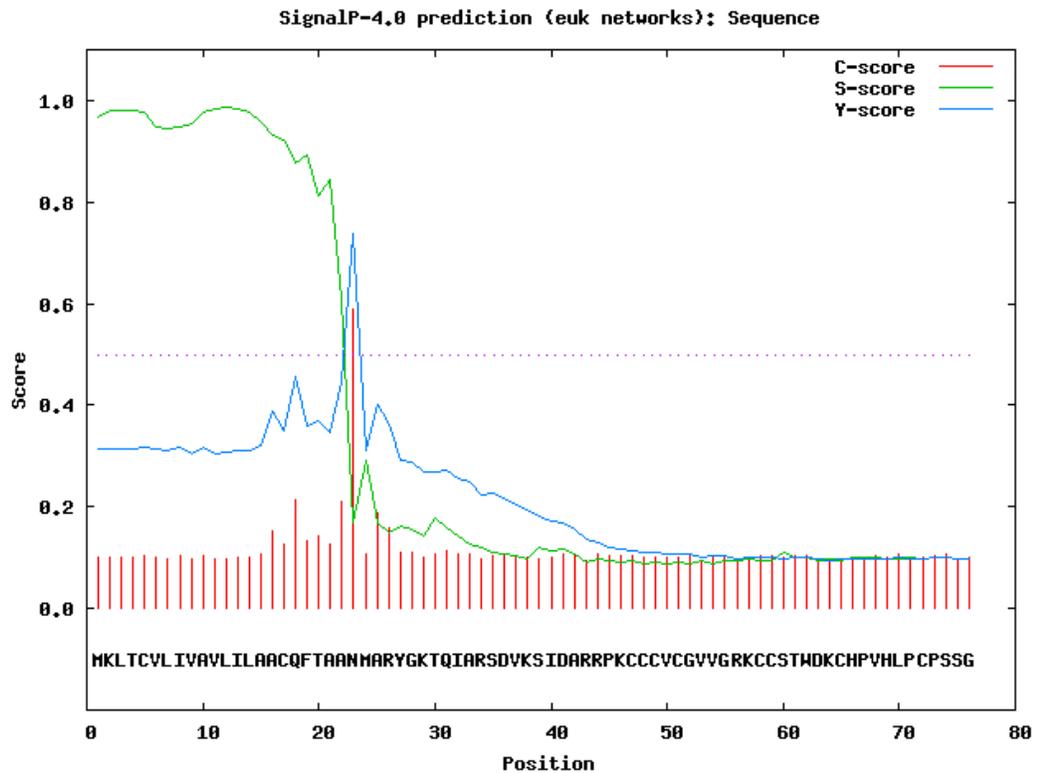


Figura 42. Predicción del péptido señal de cal26a empleando el programa SignalP-4.0. Recuperado de Center for Biological Sequence analysis (2012). Valor-C máx. en posición 23 de 0.588; valor-Y máx. en posición 23 de 0.739; valor-S máx. en posición 23 de 0.986. Donde C= valor del sitio de corte, S= valor del péptido señal; Y= valor combinado.

El análisis anterior predice un péptido señal de 23 aminoácidos con un sitio de corte en el lado carboxilo terminal de la N²³, lo que podría resultar en un péptido de 54 residuos con procesamiento postransduccional para ser secretado. Los aminoácidos que pertenecen a la región pro y la toxina madura fueron determinados por el inicio ya conocido de nuestra toxina, por lo tanto se infiere que la generación de la toxina madura cal26a requiere de corte proteolítico (R-R) en el C-terminal de la región pro. Lo anterior resulta en una región pro de 20 residuos, y una toxina madura de 32 residuos, así como la inclusión del aminoácido glicina y el codón de terminación. La inclusión del aminoácido glicina en el extremo carboxilo

de nuestra toxina cal26a nos sugiere la idea de una amidación, lo mismo fue reportado para la toxina cl tx-4 por Biggs *et al.*, en 2010.

La figura 43 muestra la forma esquemática del análisis completo realizado a la secuencia nucleotídica y traducida de nuestro gen. Comprende la secuencia del precursor peptídico, la toxina madura y su región 3' UTR.

```

ATG AAA CTG ACG TGC GTG TTG ATT GTG GCT GTG CTG ATC TTG GCT GCC TGC CAG TTC ACC
M K L T C V L I V A V L I L A A C Q F T

GCA GCT AAC ATG GCG AGA TAT GGC AAG ACT CAG ATA GCA AGA AGT GAT GTC AAG TCG ATT
A A N M A R Y G K T Q I A R S D V K S I

GAC GCG AGG AGG CCA AAG TGT TGT TGC GTT TGC GGT GTG GTG GGT CGT AAA TGC TGC AGT
D A R R P K C C C V C G V V G R K C C S

ACT TGG AAG GAT TGT CAT CCT GTT CAC CTT CCT TGC CCC AGC AGT GGC TGA
T W K D C H P V H L P C P S S G *

cct tct tcc tat ccg tcc ttc ttc tga tag ctg cag aga gtg atg aat cac tgt aac atg tag cga tct cag gca cag
gag ggc cag ctt gat att aaa gac cag acc gca atg acc agc aaaaaaaaaa

```

Figura 43. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos que corresponden al precursor peptídico de cal26a, donde también se incluye la región 3' hasta su poliadenilación. La región sombreada pertenece a la región pre del precursor, la flecha roja indica el sitio de corte enzimático que podría ocurrir al momento de la maduración de cal26a. Por último, la región subrayada corresponde a la región de la toxina madura, seguido del aminoácido glicina, como indicio de una posible amidación en el extremo carboxilo. Por último, el codón de paro y la región 3' UTR.

Por otro lado, con la obtención del péptido señal, nos surgió la pregunta: ¿La toxina cal26a pertenece o no a una superfamilia nueva? Para responder esto se realizó un análisis utilizando la base de datos BLAST de National Center for Biotechnology Information (2011). donde los precursores que resultaron con mayor identidad con el precursor de cal26a, fueron miembros de las superfamilia O.

La información anterior nos sirvió para realizar un segundo análisis utilizando el programa ClustalW, The European Bioinformatics Institute (2012). Donde la

alineación se realizó con los siguientes precursores peptídicos, mencionados tal como se enumeraron en el análisis: 1) precursor de cal26a; 2) precursor de conotoxina Cal 6.4 [*Conus californicus*]; 3) precursor de conotoxina Cl6.2 [*Conus californicus*]; 4) precursor de conotoxina Cl6.5 [*Conus californicus*]; 5) precursor de conotoxina Cal 6.2 [*Conus californicus*]; 6) precursor de conotoxina con patrón VI/VII [*Conus ventricosus*] y finalmente, 7) precursor de conotoxina tipo Delta Ac6.2. La figura 44 muestra los resultados de dichas las alineaciones.

```

1           MKLTCVLIVAVLILAACQFTAANMARYGKTQ---IARSDVKSIDAR 43
5           MKLTCVLI IAVLILTACQFIAADNTEYRK----- 29
2           MKLTCVLIVAVLILTACQFTAADDMEYPK----- 29
6           MKLTCVLIVAVLFLTACQLTTA--ASYARSE---REHPDLGSSD-- 39
3           MKLTCVLIVAVLVLTACQFTAIDSRRGGQE-----NPA-- 33
4           MKLTCVLIVAVLVLTACQFTAIDSRRDGD-----NPA-- 33
7           MKLTCVVIVAVLFLTAWTFVTADDSRYGLKNLFPKARHEMKNPEA- 45
          *****:*:***.*:* : :*
```

Figura 44. Alineación de 7 precursores peptídicos con el programa ClustalW, The European Bioinformatics Institute (2012). Se observan los aminoácidos incluidos en la región pre- de todos los casos, casi en su totalidad son idénticos “*”, otros más con cambios conservados “:” y en pocos casos son cambios semiconservados “.” o diferentes.

El análisis anterior nos indica que el precursor peptídico encontrado para la conotoxina cal26a presenta 59 % de aminoácidos idénticos en la secuencia de la región pre, el 23 % de aminoácidos con cambios conservados, y 1 % de cambios semiconservados. Por lo tanto, se considera que el precursor peptídico de la conotoxina anti-TB tiene un 83 % de similitud con la superfamilia –O.

Por último se realizó un alineamiento entre los precursores de cal26a y cal12.1.1a, debido a que ambas conotoxinas pertenecen a la superfamilia –O, tienen ocho cisteínas en sus secuencias del péptido maduro y fueron aisladas de la misma especie, figura 45. Resultando en un porcentaje de identidad muy bajo para considerarse miembros de la misma familia.

```

cal26a      MKLTCVLIVAVLILAACQFTAANMARYGKTQIA--RSDVKSIDARR----PKCC---CVC 51
cal12.1.1a  MKLTCVLVLLLLLPPYGDITNNYIRGAARKVTPWRRNLKTRDVCDLVLGGHCHNGCWC 60
            *****:* :*:*. :: : * * . ::: * :*: *.      :*  * *

cal26a      GVVG--RKCCSTWDKCHPVHLPCSSG-- 76
cal12.1.1a  DQEAPHGNCCDT-DGCTAAWW-CPGTKWD 87
            . . :**.* * * .. **.:

```

Figura 45. Alineamiento de los precursores peptídicos cal26a y cal12.1.1a. Ambas conotoxinas aisladas de la especie *C. californicus*, miembros de la superfamilia -O y con ocho cisteínas ambas conotoxinas maduras. Recuperado del programa ClustalW, The European Bioinformatics Institute (2012).

Con este resultado, se concluye el trabajo realizado en la identificación de la conotoxina cal26a, misma que será discutida en la siguiente sección.

8.4.3 *Conus ximenes*: fraccionamiento del veneno y evaluación *in vitro* de la actividad antimicobacteriana de sus componentes

En la primera fase de la evaluación del veneno de *C. ximenes* se analizaron 12 fracciones cromatográficas, donde la concentración para todos los casos fue de 200 µg/ml. En la figura 46 se evidencia la presencia de seis fracciones (F5 a F9 y F11) que inhibieron el crecimiento de la cepa de MTB. En cinco de los casos (F6 a F9 y F11) se observó la misma intensidad del cambio de color que nuestro CM. En el revelado de F5 se observó el color amarillo más oscuro, lo que sugiere la idea de una inhibición parcial a la concentración aplicada.

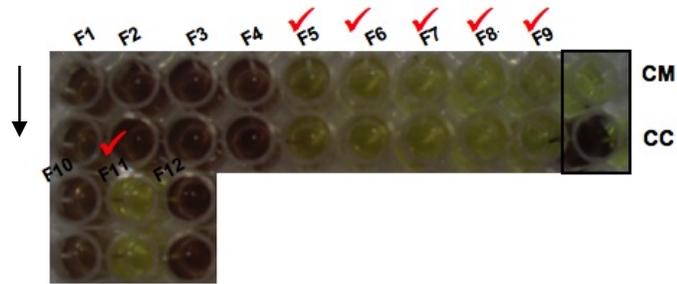


Figura 46. Sección de microplaca que incluye a las 6 fracciones que mostraron inhibir el crecimiento de la cepa H37Rv. Las fracciones F5-F9 comprenden los minutos 25-50 y la fracción F11 incluye los minutos 55-60. Los controles empleados fueron: CM y CC, mostrados en el recuadro. La flecha indica la dirección de la disposición del duplicado.

Para la segunda etapa de evaluación resultó práctico analizar todos los picos involucrados del minuto 25 hasta el minuto 60. Para el ensayo fueron considerados 24 picos (figura 47) a una concentración inicial de 200 $\mu\text{g/ml}$, exceptuando los picos: 1 (100 $\mu\text{g/ml}$), 2 (105 $\mu\text{g/ml}$), 3 (185 $\mu\text{g/ml}$), y 18 (70 $\mu\text{g/ml}$), de los cuales no logramos alcanzar la concentración sugerida.

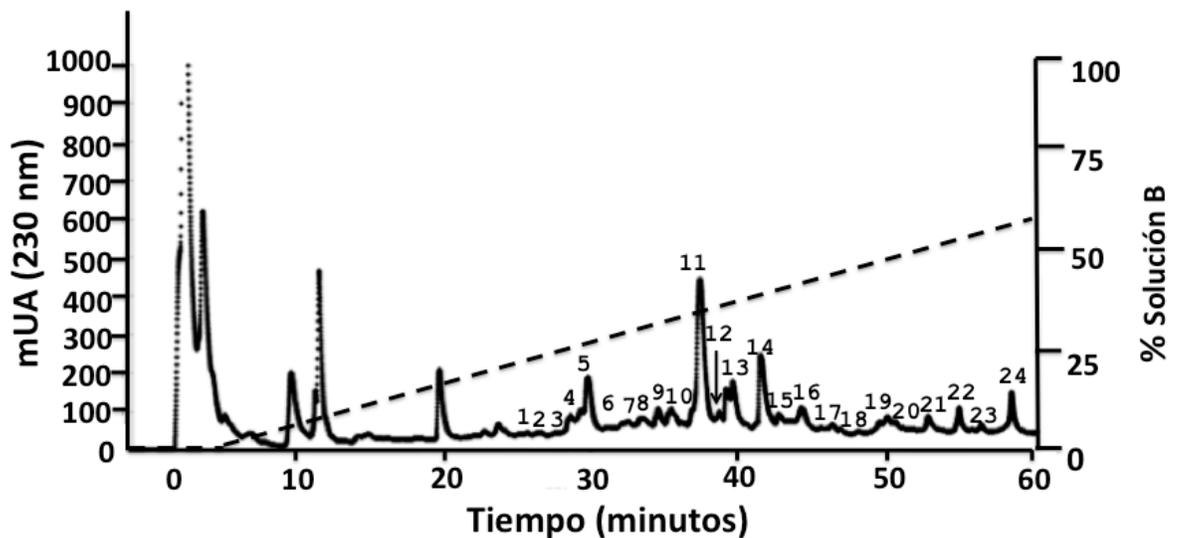


Figura 47. Perfil cromatográfico del veneno total de *C. ximenes*, donde se muestran las subfracciones incluidas en los minutos 25 al 60.

En la figura 48 se observa una sección de ocho picos evaluados, donde los picos 3 al 6 mantienen un estado oxidado del reactivo revelador. El pico 3 tuvo su actividad a 185 $\mu\text{g/ml}$, los picos 5 y 6 mostraron una inhibición a 100 $\mu\text{g/ml}$, mientras que el pico 4 mantuvo el color esperado a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

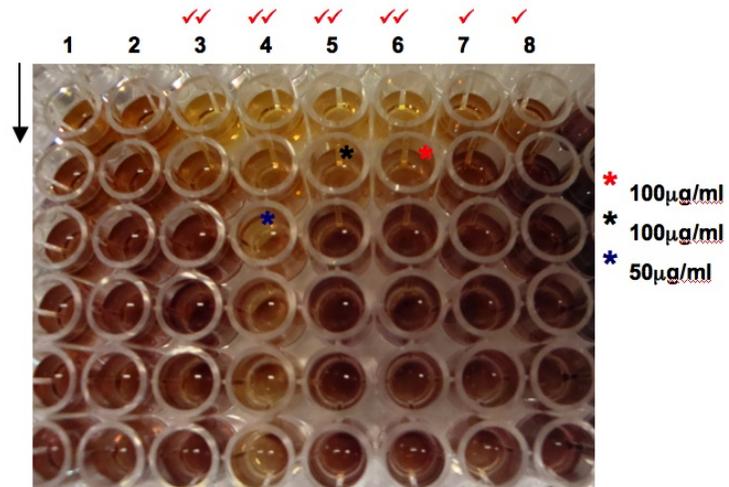


Figura 48. Sección de microplaca que muestra las MICs de 8 subfracciones evaluadas frente a la cepa H37Rv. El ensayo se inició a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, para cada fracción, excepto para las fracciones 1, 2, 3 y 18. Con una flecha se indica la disposición de titulación de la microplaca. Los controles para el ensayo fueron: CM y CC (datos no mostrados).

Del ensayo anterior, la tabla 5 resume el resultado completo obtenido para los picos con actividad, en base a la concentración o rango de concentración al que mostraron actividad.

Tabla 5. Descripción del código empleado para cada una de las subfracciones y la concentración o rango de concentración al que la fracción mostró actividad.

Subfracción	Concentración o rango de concentración al que mostró actividad ($\mu\text{g/ml}$)
3	185
4	200-50
5	200-100
6	200-100
7	200
8	200
10	200
11	200
12	200
13	200
14	200
15	200
16	200
19	200-50
20	200
21	200-50
22	200
24	200-100

Para darle dirección a nuestro trabajo, nos enfocamos en siete picos que presentaban una MIC inferior a 200 $\mu\text{g/ml}$. Los picos son: F3 - F6, F19, F21 y F24. También se consideraron los picos F11 y F14, que aunque presentaron una MIC de 200 $\mu\text{g/ml}$, son picos con apreciable absorbancia para ser analizados (ver figura 47). La siguiente descripción corresponde al análisis de los picos 3 al 6 y 14.

La idea de trabajar con las subfracciones F3-F6 en conjunto, fue porque en algunas corridas no se logró definir las subfracciones F4 de la F5. Después de procesar 10 corridas de veneno total (51.8 mg), para la subfracción F3-F6 se obtuvieron 2.14 mg. Este material nos permitió evaluar los picos con actividad y la masa molecular de ellos. La siguiente figura muestra el perfil cromatográfico y el protocolo aplicado en la repurificación, figura 49.

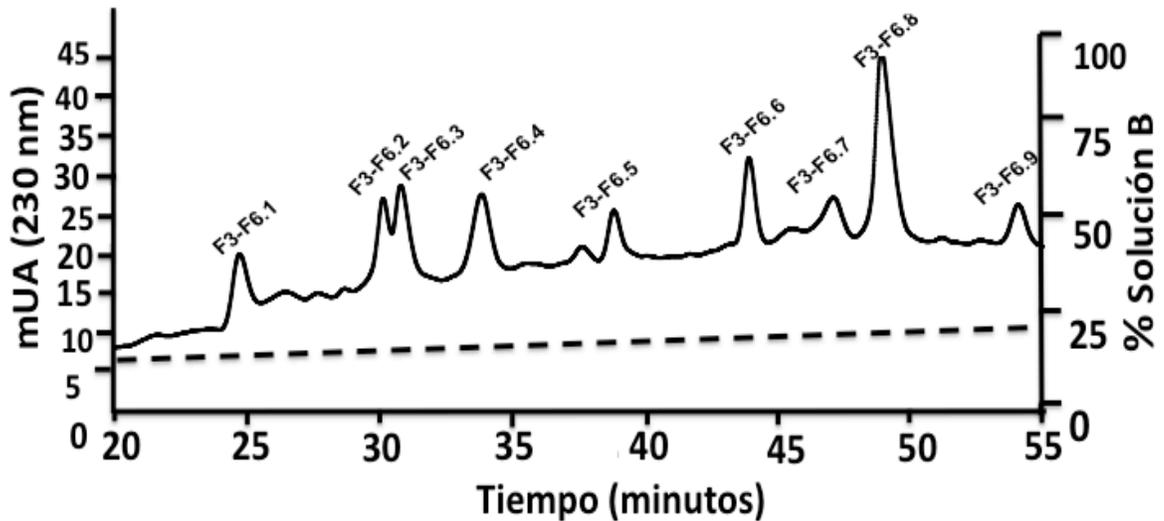


Figura 49. Repurificación cromatográfica de las fracciones F3-F6, donde se obtuvieron 9 subfracciones. El protocolo inicia con 10 % B hasta 35 % B en 60 min, considerando que las fracciones de interés eluyen a partir de 20 % B.

En el diseño del siguiente bioensayo se consideró la MIC de las fracciones F3, F4, F5 y F6, las cuales estaban en el rango de 50 a 186 $\mu\text{g/ml}$, por lo que se intentó emplear una concentración inicial de 100 $\mu\text{g/ml}$ para los nueve picos (F3-F6.1 a F3-F6.9). Como se muestra en la tabla 6, solo 5 fracciones alcanzaron dicha concentración, a pesar de haber procesado 18 corridas.

Tabla 6. Concentración empleada en el bioensayo de las fracciones F3-F6.1 a F3-F6.9.

Código	Concentración inicial ($\mu\text{g/ml}$)
F3-F6.1	77.25
F3-F6.2	96.5
F3-F6.3	100
F3-F6.4	100
F3-F6.5	100
F3-F6.6	100
F3-F6.7	88.25
F3-F6.8	100
F3-F6.9	94

Los resultados del bioensayo son mostrados en la figura 50, donde se observa que el pico F3-6.3 inhibió el crecimiento de *M. tuberculosis* en su concentración inicial de 100 µg/ml, mientras que los picos F3-F6.4 y F3-F6.7 inhibieron a una concentración de 50 y 44.12 µg/ml, respectivamente. Para el caso de F3-F6.9 se consideró que su efecto sobre la cepa H37Rv fue de 11.75 µg/ml, con una posible contaminación en la segunda titulación.

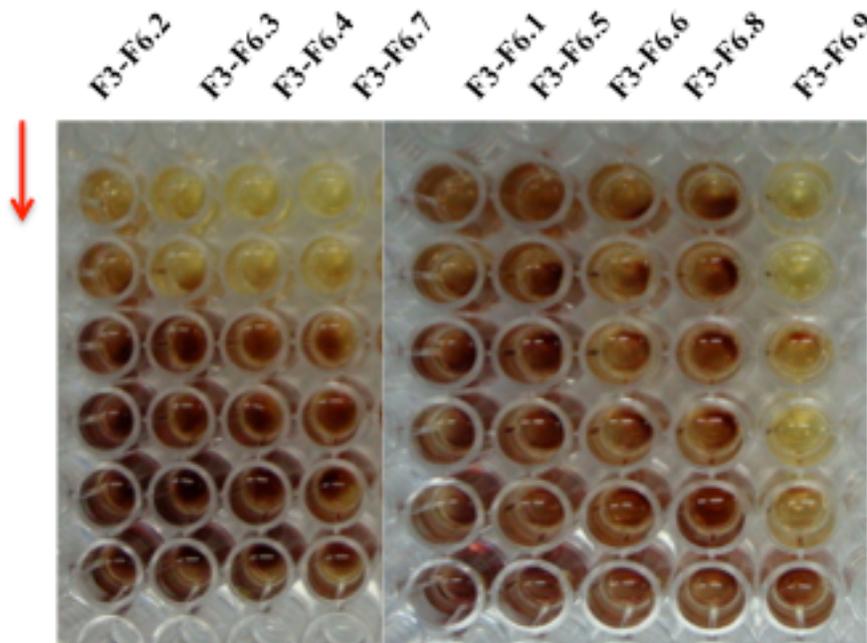


Figura 50. Bioensayo para determinar la MIC de las fracciones F3-F6.1 a F3-F6.9, expuestas a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. La flecha indica la dirección en que se realizó la titulación de los picos. El control positivo empleado fue un control de crecimiento y como control negativo se utilizó un control de medio Middlebrook (datos no mostrados).

El primer análisis de las masas moleculares de nuestras muestras de interés se realizó en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los resultados indicaron que F3-F6.3 tiene una masa molecular de 3399 Da, la subfracción F3-F6.4 de 2217 Da, y para F3-F6.7 de 1519 Da (espectros no mostrados). En el caso de F3-F6.9, se reportaron varios iones de bajo peso molecular (m/z 33.6, 409.8 y 485.7), que no corresponden a ninguna serie iónica para determinar la masa molecular que tienen. De esta manera, se puede inferir

que la última subfracción no es una molécula de origen proteico. Como se comentó, el pico F3-F6.9, presentó la mejor actividad en el ensayo anterior (MIC de 11.75 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, como este trabajo se dirige principalmente a la búsqueda de conotoxinas, la molécula encontrada en la muestra F3-F6.9 fue reservada para otros estudios paralelos a esta tesis.

La confirmación de las masas moleculares fue realizada por el laboratorio Atheris, en Suiza. El material enviado fue: F3-6.3 (80 μg), F3-6.4 (80 μg) y F3-6.7 (45 μg), figura 51.

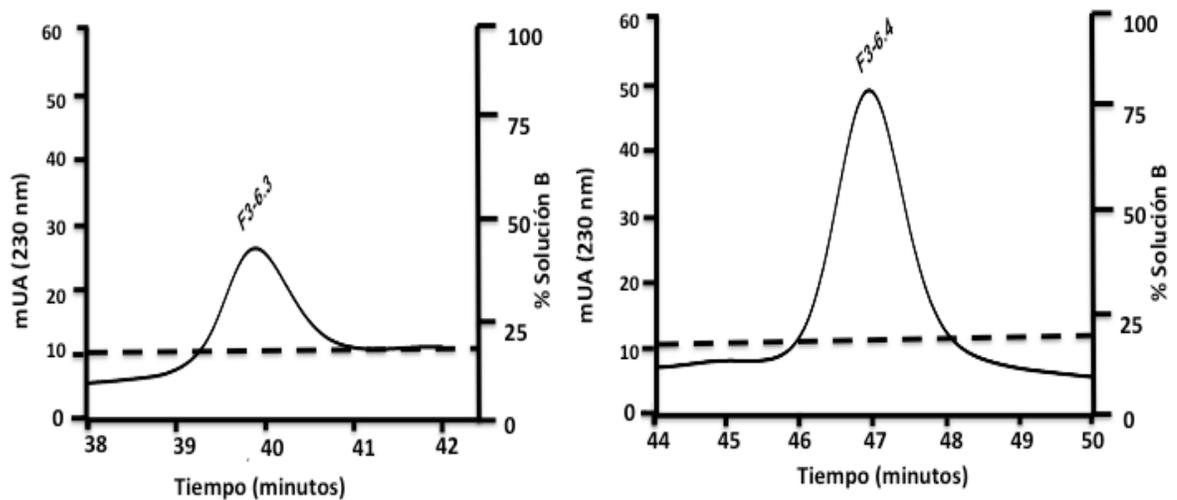


Figura 51. Perfil cromatográfico obtenido para F3-6.3 y F3-6.4. La purificación se realizó empleando un gradiente lineal de 10 % B hasta 35 % B en 120 min.

El resultado del laboratorio Atheris indicó que el pico F3-F6.7 de 1519.60 Da, comprende una estructura primaria de 14 aminoácidos, que sólo presenta como modificación postraduccional, los residuos de cisteínas comprometidos en enlaces disulfuro, figura 52.

10
DGCCRDPRCAINCV

Figura 52. Secuencia primaria del péptido F3-F6.7, obtenida en el análisis de espectrometría de masas con ionización por electroespray (ESI-MS por sus siglas en inglés) y confirmado por degradación de Edman. La estructura primaria está compuesta de 14 residuos con cuatro cisteínas comprometidas en enlaces disulfuros.

Con la secuencia obtenida, conocimos que nuestra conotoxina presenta un patrón de cisteínas **CC-C-C**, reportado previamente para las familias α - y χ -conotoxinas, y que concuerda con el tamaño esperado para estas familias, (Dutton & Craik, 2001). El análisis en la base de datos de PubMed, mostró que el péptido F3-F6.7 presenta similitudes con la toxina ImI nativa de *C. imperialis* (McIntosh *et al.*, 1994). Con la ayuda del programa ClustalW, la alineación de ambas secuencias indicó que mantienen un 83 % de identidad, **figura 53**.

F3-F6.7	DGCCRDPRCAINCV	14
ImI	-GCCSDPRCAWRC-	12
	*** ***** .*	

Figura 53. Alineamiento de la secuencia F3-F6.7 y la α -CTX ImI, empleando el programa ClustalW, The European Bioinformatics Institute (2012).

Las características bioquímicas de la conotoxina ImI la colocan como una conotoxina 4/3 de acuerdo a los espacios intercisteínas que presenta. Es reconocida como antagonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), teniendo como aminoácido clave a la prolina, en la posición 6 de la secuencia. Lo anterior le brinda especificidad hacia las subunidades $\alpha 7$ de estos receptores. Considerando el 83% de identidad entre ambas conotoxinas, los espacios intercisteínas (4/3) y la presencia de la prolina mencionada en nuestra toxina, podemos clasificar a F3-6.7 como miembro de la familia de las α -conotoxinas y que

su blanco molecular más probable es el nAChR. Esto solo se podrá aseverar hasta su corroboración con los ensayos pertinentes.

Para clasificar la conotoxina, con nombre provisional F3-6.7, se consideró nuevamente las referencias de Olivera *et al.*, 2001 y Terlau & Olivera, 2004. Por ser una toxina nativa de la especie *C. ximenes*, se asignaron las letras, “xm”; el número arábigo “1” por pertenecer al patrón de cisteínas CC-C-C descrito para las α -conotoxinas; y la letra minúscula “a” por ser la primera conotoxina de una familia de conotoxinas similares (datos no mostrados). Hasta corroborar el blanco molecular específico de xm1a, deberá ser nombrada de esta forma.

Por otro lado, además de los picos F3 a F6, se comentó el análisis de otra fracción (F14) que por ser abundante en el veneno de *C. regularis*, se decidió realizar su repurificación y evaluación. Para esto, se procesaron 28 corridas de veneno total, y se generó un lote de 3.6 mg de F14, que fue utilizado en 12 corridas posteriores para su repurificación y así separar a los 12 picos involucrados, figura 54.

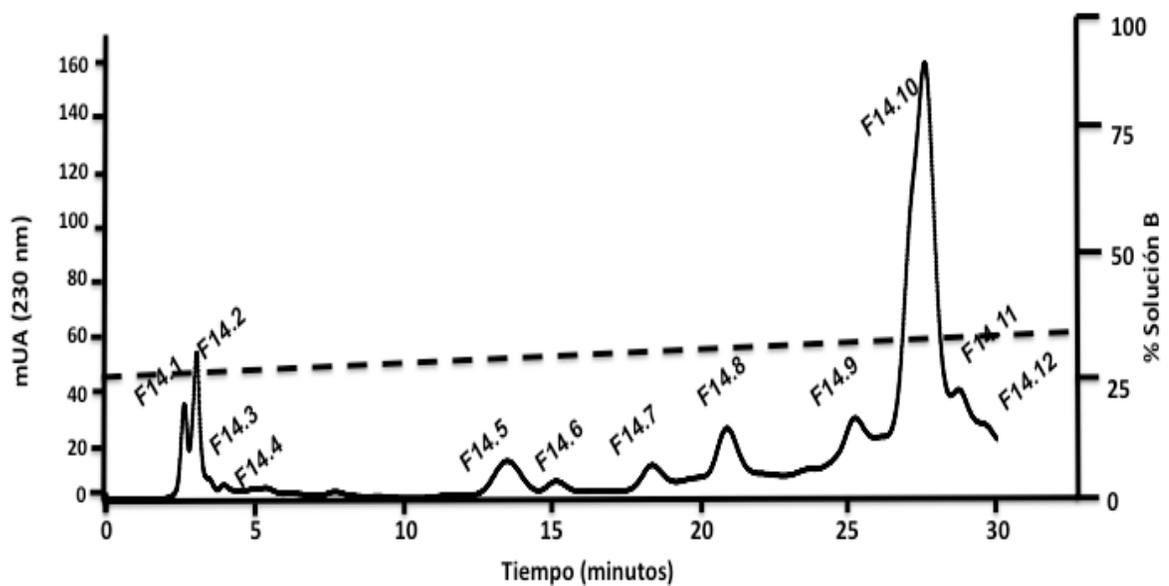


Figura 54. Perfil cromatográfico obtenido de la fracción F14, donde se reportaron 12 subfracciones. El protocolo inicia con 26 % B hasta 46 % B en 60 min, considerando que las fracciones de interés eluyen a partir de 36 % B.

El bioensayo donde se evaluó la actividad de F14 (datos previamente mostrados), demostró que este pico tiene efecto inhibitorio a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, en su subfraccionamiento se muestran numerosos picos (F14.1-F14.12) con escasa abundancia, que difícilmente alcanzarían una concentración inicial de 200 $\mu\text{g/ml}$, por lo que se decidió considerar a los picos de mayor absorbancia iniciando a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones obtenidas para los 12 picos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Concentración empleada en el bioensayo de los picos F14.1 a F14.12.

Código	Concentración inicial ($\mu\text{g/ml}$)
F14.1	47.25
F14.2	87.75
F14.3	8.75
F14.4	12.75
F14.5	54.25
F14.6	21.25
F14.7	54
F14.8	100
F14.9	82
F14.10	100
F14.11	73
F14.12	50

En el ensayo de viabilidad celular, solo las muestras F14.1 y F14.2 presentaron efecto sobre *M. tuberculosis*, inhibiendo a la cepa H37Rv con una MIC de 23.62 $\mu\text{g/ml}$ y 5.48 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La figura siguiente muestra el resultado de los picos con actividad, figura 55.

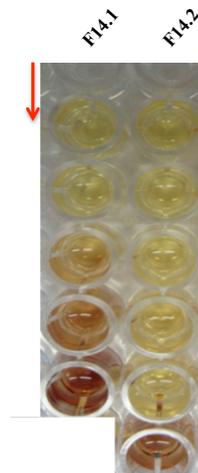


Figura 55. Bioensayo para evaluar la MIC de los picos F14.1 y F14.2, expuestas a la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Las fracciones que no mostraron actividad, no son presentadas en la figura. La flecha indica la dirección en que se realizó la titulación de las fracciones. El control positivo empleado fue CC, y como control negativo se utilizó a CM (datos no mostrados).

Al analizar el perfil cromatográfico, se puede observar que las muestras F14.1 y F14.2 eluyen al inicio de la corrida, con 26.9 % de solución B, lo que no concuerda con el porcentaje de elusión de F14 (con 36 % de solución B). De ser péptidos F14.1 y F14.2, lo que pudiera estar ocurriendo en el perfil cromatográfico son cambios en las estructuras de las moléculas, lo que estaría provocando la exposición de residuos más hidrofílicos en sus estructuras.

El trabajo para los picos F14.1 y F14.2 actualmente sigue su curso. Sin embargo, como estrategia para avanzar en esta tesis, se decidió enfocarnos en la conotoxina xm1a, para los ensayos subsecuentes. A continuación se muestra un esquema del trabajo global realizado en el análisis del veneno de *C. ximenes*, figura 56.

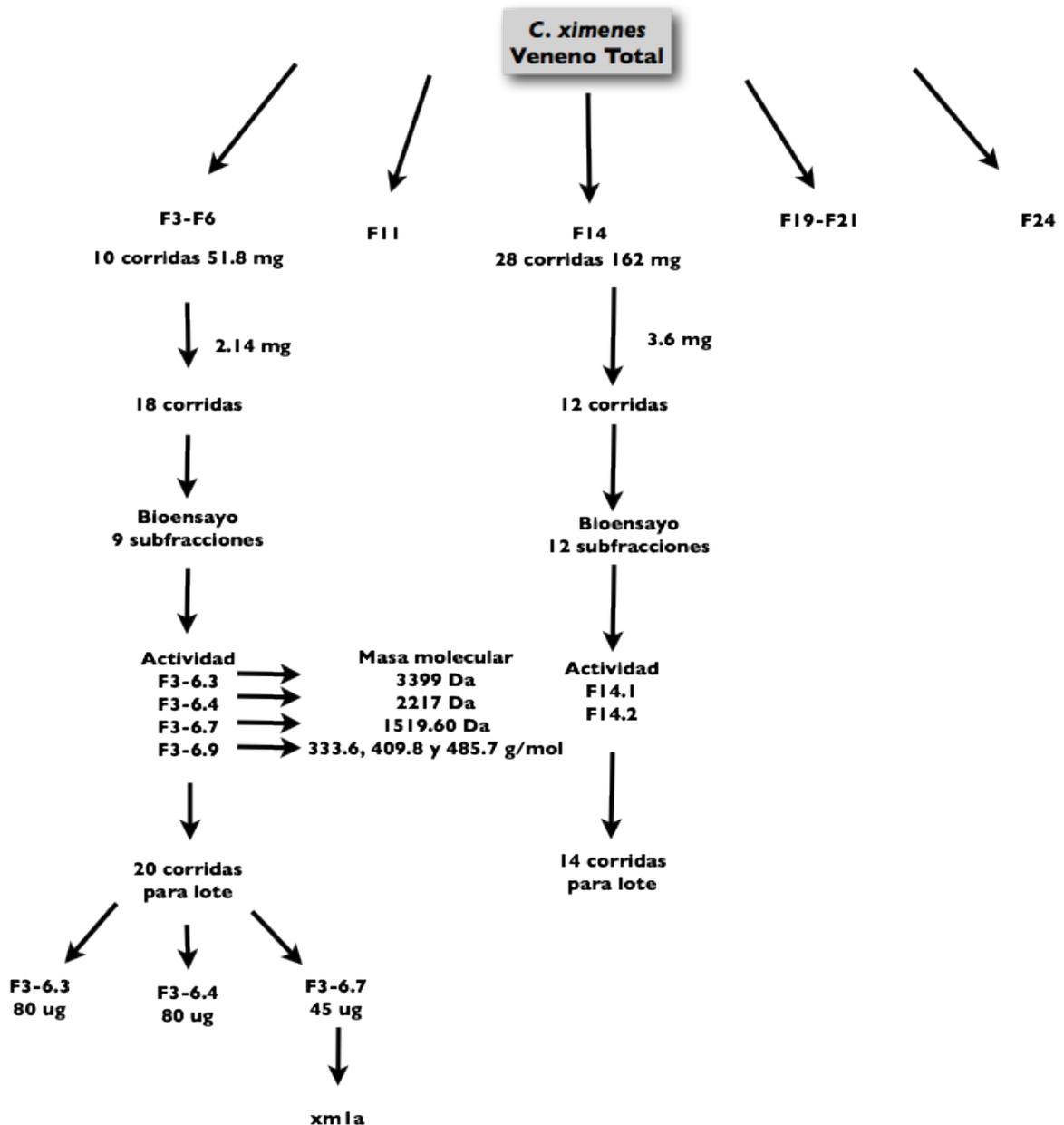


Figura 56. Diagrama que resume el trabajo realizado para las fracciones F3-F6 y F14 de *C. ximenes*. El esquema es descrito en el texto.

Por lo tanto, la sección de análisis del veneno de *C. ximenes*, se resume en el hallazgo de la conotoxina xm1a, de 14 aminoácidos y que por su fácil estructura primaria nos permitió obtenerla de forma sintética para realizar su evaluación en un modelo murino de enfermedad progresiva de tuberculosis.

8.4.3.1 Evaluación de la toxina sintética xm1b mediante cuantificación de bacterias vivas en el pulmón del modelo murino

Como se señaló anteriormente, la conotoxina con actividad antimicobacteriana aislada de *C. ximenes* presenta características que la incluyen en la familia de las α -conotoxinas, y que éstas tienen como blanco molecular los nAChR. Por otro lado, *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular que infecta principalmente a macrófagos; asimismo, se ha descrito que estas células fagocíticas expresan mayormente el homopentámero $\alpha 7$ nAChR, mismo receptor que hemos venido sugiriendo como blanco molecular de nuestra conotoxina. De esta manera, un trabajo de tesis paralelo al nuestro (Cervantes, 2013), evaluó a nuestra conotoxina y el impacto de la presencia (xm1b) o ausencia (xm1a) de la amidación en el carboxilo terminal, en la respuesta de activación del macrófago en relación con la presencia del agonista nicotina y el estímulo de lipopolisacárido (LPS).

Los resultados de ese trabajo, serán retomados en la siguiente sección; solo para introducir a nuestro siguiente bioensayo, es importante mencionar que la conotoxina que mostró mejor efecto en la expresión de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias, fue la versión amidada de nuestra conotoxina, es decir, xm1b. La implicación de la conotoxina como inmunomodulador, favoreciendo una respuesta pro-inflamatoria en ensayos *in vitro*, sustentó su empleo en el modelo murino de tuberculosis progresiva. Esta situación es importante porque en el bioensayo, al iniciar el tratamiento los animales experimentales se encuentran en una etapa avanzada de la enfermedad, que se caracteriza por el incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones. Y desde el punto de vista inmunológico, durante esta fase, se incrementa significativamente la presencia de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2), que se caracterizan por producir citocinas anti-inflamatorias, siendo eficientes antagonistas de las células Th-1. Como consecuencia, esto contribuye a desviar la acción protectora de las células Th-1, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Hernández-Pando *et al.*, 1996). Por lo tanto, el delicado balance de las respuestas Th1/Th2, sin duda es esencial en la involución de la enfermedad.

Por tratarse de un bioensayo preliminar, solo se analizó la conotoxina que presentó la respuesta inmunomoduladora más significativa en el ensayo *in vitro*, es decir, la versión amidada xm1b. Entonces, los animales de experimentación fueron tratados con la toxina sintética xm1b, solución salina o nicotina, donde la administración se realizó cada tercer día. El pulmón derecho o izquierdo de cada ratón, en cada tiempo de sacrificio (1 y 2 meses de tratamiento) fueron usados para cuantificar el número de bacterias viables. La figura 57 muestra los resultados de la cuantificación de UFC en los pulmones de ratones al primer y segundo mes de tratamiento.

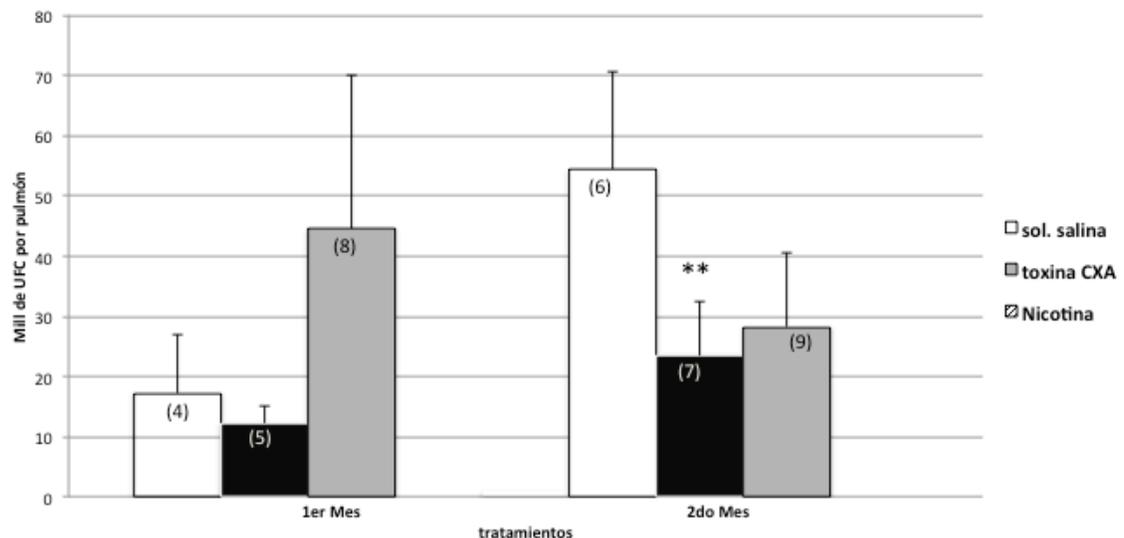


Figura 57. Evaluación de la cepa H37Rv *in vivo*, retada con la conotoxina xm1b. Se muestra el gráfico de la cuantificación de UFC, al primer y segundo mes de la administración de los tratamientos. Valores comparados con el control de solución salina. Se realizó una prueba t de student donde * $p < 0.05$, ** $p = 0.006$

La evaluación de la conotoxina xm1b mostró una tendencia a disminuir la carga bacilar de los pulmones de los ratones en su comparación con el control de solución salina al primer mes de tratamiento, pero es hasta el segundo mes que se observó una diferencia significativa de la carga bacilar. Lo anterior nos sugiere que nuestra conotoxina tiene efecto esterilizante en el tejido pulmonar infectado con *M. tuberculosis*. Caso contrario se observa en nuestro control negativo al presentar una cinética de progresión en la proliferación de bacterias viables. Del grupo experimental tratado con nicotina, varios reportes han revelado que el alcaloide ejerce un efecto anti-inflamatorio en muchos procesos fisiológicos (Zhou *et al.*,

2012; Hamano *et al.*, 2006). Por tal motivo es de esperarse el aumento de la carga bacilar en los pulmones tratados con este compuesto, así como lo podemos observar en el primer mes de la evaluación. La ambigüedad observada en el segundo mes de tratamiento con nicotina, será discutida en la siguiente sección.

9. Discusión

9.1 Caracterización bioquímica y biológica de la conotoxina cal26a

Trabajar con la especie *Conus californicus* conlleva involucrarse en la complejidad de los componentes venenosos que emplea el caracol para cazar, depredar y/o defenderse en su hábitat. Hasta la fecha han sido pocas las publicaciones que han descrito las conotoxinas del veneno de esta especie. Sin embargo, queda claro que *C. californicus* es una especie atípica que diverge del resto de los miembros del género, al habitar climas fríos y presentar una conducta alimenticia diferente. Como consecuencia, los caracoles expresan una variedad de conotoxinas que divergen de la clasificación convencional.

Un ejemplo de lo recién mencionado es la conotoxina cl tx-4 (reportada por Biggs *et al.*, 2010) y renombrada en este trabajo como cal26a. La conotoxina presenta un patrón de cisteínas no descrito previamente, CCC-C-CC-C-C. Y es en este trabajo de tesis que se le clasifica como miembro de una superfamilia de conotoxinas, así como se habla de su participación como inhibidor del crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

De lo descrito por Biggs sobre la conotoxina cl tx-4, reportan la secuencia con el ácido aspártico (D) y la lisina (K), en la posición 20 y 21, respectivamente. Sin embargo, nuestro análisis del péptido por degradación de Edman y la obtención del ADNc de nuestro gen, indican que la conotoxina cal26a contiene esos aminoácidos en posición inversa, es decir, la lisina en posición 20 y el ácido aspártico en posición 21. Y en ninguno de los clones obtenidos se observó la distribución DK en vez de KD. Por lo que consideramos que existe error en la conotoxina cl tx-4 (cal26a) publicada por Biggs, o bien, encontramos una divergencia de esta misma toxina.

Por otro lado, la masa molecular monoisotópica teórica y experimental concuerdan, lo que indica que cal26a contiene una amidación en el carboxilo terminal, ocho cisteínas comprometidas en enlaces disulfuros, y cuatro prolinas hidroxiladas. De esto último, las conotoxinas han sido descritas ampliamente con numerosas

modificaciones postraduccionales; los residuos de prolina hidroxilados, se han reportado en por lo menos 10 familias de conotoxinas; como las μ -CTx, κ M-CTx, ψ -CTx, ω -CTx, δ -CTx, y algunas subfamilias de las α -CTx, entre otras (López-Vera *et al.*, 2008).

Desde una perspectiva evolutiva, se ha observado que las ventajas y desventajas de las prolinas (Pro) versus hidroxiprolinas (Hyp), son consideradas cuidadosamente en cada una de las familias. Por ejemplo, en algunos miembros de la familia de las omega conotoxinas, como ω -MVIIC y ω -GVIA se ha mostrado que la sustitución de Hyp no afecta la actividad de la conotoxina hacia su blanco molecular pero sí parece afectar el plegamiento de la molécula. Por otro lado, en la familia de las α -CTxs, estudios realizados a la α -GI, α -Iml y α -PnlB, que tienen como característica común la conservación de la prolina en el primer bucle, han demostrado que su reemplazo por Hyp tiene un impacto negativo de forma significativa en sus actividades; donde α -Iml [P6O] se encontró inactiva contra los α 7 nAChRs, y α -GI [P5O], se disoció mucho más rápido de los α 1 β 1 δ ϵ nAChRs (López-Vera *et al.*, 2008). En estudios *in vitro*, se ha concluido que dicha modificación está involucrada en el plegamiento oxidativo y/o en la actividad de las conotoxinas; se ha especulado que los caracoles “emplean” la hidroxilación de las prolinas para mejorar la bioactividad de las conotoxinas (López-Vera *et al.*, 2008).

Para cal26a, se asume que la versión de las cuatro prolinas modificadas es la implicada en la actividad contra la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, porque en ninguno de los análisis de espectrometría de masas realizados se mostró alguna masa monoisotópica diferente a la obtenida de 3542.5 Da. Esto permite suponer que al purificar por HPLC y siempre observar dos picos consecutivos en nuestra muestra, podría tratarse del mismo compuesto con dos conformaciones y diferentes interacciones hidrofóbicas en la columna de HPLC. La complejidad asociada a la presencia de prolinas en péptidos pequeños con numerosos enlaces disulfuro ha sido reportada para la conotoxina MI, en la α -conotoxina BuIA, y en Leu-contrifano-P aislado de *C. purpurascens* (Gray *et al.*, 1983; Jin *et al.*, 2007; Jacobsen *et al.*, 1999). El estudio de prolinas y/o hidroxiprolinas, revela que sus

isomerías geométricas *cis/trans* provocan una dinámica conformacional, que en algunos casos puede ser detectada por HPLC (Jacobsen *et al.*, 1999; López-Vera *et al.*, 2008). Esto pudiera explicar la presencia de los dos picos observados en nuestros perfiles cromatográficos, aunque no se descarta la posibilidad de la existencia de dos o más conotoxinas con diferentes versiones Pro y/o Hyp. Para el veneno de *C. regius*, se reportó la presencia de dos péptidos idénticos, RglB y RglC que contienen tanto la versión Hyp como Pro (Franco *et al.*, 2006).

En relación a la amidación del carboxilo terminal, es sugerida esta modificación para cal26a por presentar en su secuencia el residuo de Gly en su extremo carboxilo, como posible señal de una amidación potencial del residuo Ser; esto sumado a lo ya comentado, sobre las masas moleculares teórica y experimental, nos permite considerar la amidación como parte de nuestra conotoxina. El proceso que ocurre en la modificación postraducciona de la glicina en un péptido implica el procesamiento del C-terminal de la secuencia -XG que es removido por la monooxigenasa para producir un C-terminal amidado (-X-NH₂) en la toxina madura. La amidación del extremo carboxilo para la conotoxina ω -MVIIA, parece ser un factor de gran importancia en el plegamiento de esta omega conotoxina, a diferencia de lo que se pensaba para el propéptido y la disulfuro isomerasa (o PDI por sus siglas en inglés) (Buczek *et al.*, 2005).

De la longitud de las colas poliA, se ha publicado que el número de señales es inverso a la longitud de colas poliA, pero esto es contrario a lo observado en nuestro caso, ya que la longitud de la cola poliA es de 10 nucleótidos, cuando podría alcanzarse una longitud de mas de 70 adenosinas al tener una sola señal de adición de poliA (Luo *et al.*, 2006).

Por otro lado, sobre las conotoxinas con ocho cisteínas es poco lo que se ha descrito. Se han reportado ocho patrones diferentes, incluyendo el descrito por Biggs y en nuestro trabajo. Pero solo para el caso del patrón XI (C-C-CC-CC-C-C) es que se conoce la conectividad de las cisteínas, tabla 8.

Tabla 8. Lista de patrones de cisteínas encontrados en las conotoxinas y lo reportado de sus conectividades y blancos moleculares.

Patrón	S-S	Conectividad	Conotoxina	Blanco molecular	Bibliografía
XI	C-C-CC-CC-C- C	I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII	Superfamilia I	VGSC	Buczek <i>et al.</i> , 2007
XII	C-C-C-C-CC-C-C		TxX y Cal12.11		Brown <i>et al.</i> , 2005; Gilly <i>et al.</i> , 2011
XIII	C-C-C-CC-C-C-C		De13a		Aguilar <i>et al.</i> , 2005
XV	C-C-CC-C-C-C-C		Superfamilia V		Peng <i>et al.</i> , 2008
XVI	C-C-CC-C-CC- C		ca16a		Yuan <i>et al.</i> , 2008
XXI	C-C-C-C-C-C-C-C		Cal22a		Elliger <i>et al.</i> , 2011
XXIV	C-C-C-C-CC-CC		RsXXIVa	VGCC	Bernáldez <i>et al.</i> , 2013
XXVI	CCC-C-CC-C-C		cal26a		Biggs <i>et al.</i> , 2010 Trabajo de tesis/ Bernáldez

La descripción de patrones de ocho cisteínas, mostrada en la tabla anterior, no permite clasificar a cal26a dentro de alguna familia y/o superfamilia de conotoxinas reportadas. Sin embargo, para nuestro estudio era importante conocer la secuencia amino terminal de la toxina, que incluye la región del propéptido, por ser parte fundamental en el plegamiento correcto de las conotoxinas. El método RACE empleado para clonar el ADNc de *cal26a*, permitió identificar la superfamilia a la que pertenece nuestra conotoxina y conocer la extensión del prepropéptido. De esta manera, el precursor de cal26a al presentar 83 % de similitud con la superfamilia –O, nos permite aseverar que nuestra conotoxina pertenece a esa superfamilia, la cual conserva la secuencia del péptido señal MKLCT, considerada como la secuencia canónica para la superfamilia –O (Duda & Palumbi, 2004).

Para *C. californicus* ya se habían reportado conotoxinas con ocho cisteínas, que fueron clasificadas como miembros de la superfamilia –O. Gilly y cols., describieron una familia de conotoxinas nombrada cal12, que bloquean canales iónicos de sodio y que presentan el patrón de cisteínas: C-C-C-C-CC-C-C (tabla 8). Basados en la homología del péptido señal en esa nueva familia, se les asoció a la superfamilia –O. Ellos describen que seis de los ocho residuos de cisteínas, constituyen el patrón

canónico de los miembros de la superfamilia –O; y por la adición de dos cisteínas en el amino terminal, la conotoxina fue subclasificada como O + 2, como parte de la superfamilia –O (Gilly *et al.*, 2011). Esa conclusión se justificó analizando la estructura genérica de los miembros de la superfamilia; se ha descrito que los residuos intermedios intercisteínas son: $C_1(3-6)C_2(5-10)C_3C_4(2-8)C_5(3-10)C_6$, donde C_i indica los residuos de cisteínas conservados y su posición ($i=1-6$), el número entre paréntesis indica el número de aminoácidos que intervienen (Gracy *et al.*, 2008). De esta manera, proponen que la familia cal12 podría quedar embebida en la estructura básica de los miembros de la superfamilia-O $C(6-7)C(4)-C_1(1)C_2(4-8)C_3C_4(4)C_5(4-5)C_6$, exceptuando a C_1-C_2 . Al aplicar el mismo criterio a cal26a (CCC-C-CC-C-C), encontramos que la longitud de los segmentos intercisteínas también puede incluirse en esa estructura básica $CC-C_1(1)C_2(6)C_3C_4(5)C_5(6)C_6$, solo excluyéndose a C_1 . Sin embargo, la divergencia entre cal26a y cal12.1.1a es evidente en la figura 45, donde resultó que el porcentaje de identidad era muy bajo para considerarse miembros de una misma familia, sumado a la diferencia de patrones de cisteínas. Por lo tanto, estos resultados indican que ambos genes divergen de forma independiente y probablemente están dirigidos a diferente blanco molecular.

Lo anterior, apoya lo mencionado previamente por varios autores donde el aparente desajuste entre los patrones de cisteínas podría involucrar la presencia de un intrón en la región –pro de los genes de conotoxinas que separan el exón I (que codifica la secuencia señal) de la porción remanente del gen (Yuan *et al.*, 2007; Elliger *et al.*, 2011).

En relación a las superfamilias expresadas en la especie *C. californicus*, se ha descrito la conservación de algunos genes de superfamilias comunes para el género. Se tiene evidencia de que *C. californicus* comparte el 50 % de las superfamilias más conservadas entre los miembros del género *Conus*. Lo anterior, excluye a las superfamilias –A y –M; mismas que junto a la superfamilia -O son consideradas como los genes dominantes en la mayoría de los venenos de *Conus* y miembros del clado mayor en la evolución de las superfamilias (Biggs *et al.*, 2010).

Aun de las superfamilias que comparte *C. californicus* con el resto de las especies se han reportado diferencias considerables. Por ejemplo, la superfamilia –S se caracteriza por incluir en sus conotoxinas estructuras de 10 cisteínas, pero en *C. californicus* se reportaron miembros de 8 cisteínas, pero con clara evidencia de la conservación del péptido señal como requisito para su inclusión en esta clasificación. Por lo tanto, la presencia de un miembro de la superfamilia -O, con ocho cisteínas en vez de las seis clásicas, no resulta tan sorprendente; solo hace evidente la clara divergencia evolutiva que ha experimentado nuestra especie de trabajo.

La suma de resultados sugieren que la superfamilia –O y su compleja diversidad de familias, son de gran relevancia en las interacciones bióticas de la especie *C. californicus* a lo largo de la historia. De hecho, el estudio de Biggs y colaboradores describe que el patrón de cisteínas #VI/VII (característico de la superfamilia -O) es el grupo más prevalente en la biblioteca de ADNc que ellos generaron; y que, según su estudio, el mayor número de conotoxinas encontradas en el veneno correspondía a miembros de la superfamilia -O. Se ha evidenciado en el veneno de este caracol la presencia de miembros de las familias δ -CTxs y ω -CTxs, asignados por la conservación del péptido señal y las características particulares que permiten asignarlas como miembros de esas familia. Así mismo, Biggs *et al.*, y Elliger *et al.*, reportaron conotoxinas que pertenecen a la superfamilia –O, que conservan el patrón C-C-CC-C-C, pero la longitud y variabilidad intercisteínas no permiten clasificarlas dentro de las familias reportadas. Lo anterior, sumado a la familia de conotoxinas O + 2, reportada por Gilly *et al.*, que tienen el patrón C-C-C-C-CC-C-C y que presentan actividad aparente sobre diversos subtipos de canales de sodio. Y finalmente la conotoxina cal26a asignada en este trabajo como miembro de esta superfamilia, y que presenta otro patrón diferente a los anteriores CCC-C-CC-C-C, fortalecen la hipótesis de que la diversificación de las conotoxinas en *C. californicus* es el resultado de la adaptación evolutiva en relación al amplio rango de presas donde consideramos que, la superfamilia –O juega un papel fundamental en este proceso.

A pesar de la asignación de la conotoxina cal26a como miembro de la superfamilia ω , la información bibliográfica actual dista mucho de orientar o sugerir el posible blanco molecular de la familia a la que pertenece la conotoxina. Sin embargo, sí se puede considerar su interacción con algún canal o proteína transportadora de la membrana en la micobacteria. Considerando el perfil hidropático de cal26a, determinado por la tendencia hidrofóbica de los residuos implicados en su estructura primaria, se podría excluir de interactuar directamente sobre la membrana como se ha descrito para los péptidos antimicrobianos, como las defensinas. Éstos son ampliamente distribuidos en el reino animal y vegetal, incluyendo su descripción en moluscos, pero sus características fisicoquímicas, de alto contenido de residuos hidrofóbicos, los hace diferentes a la conotoxina cal26a. Estos péptidos con patrones de cisteínas C-C-C-C-CC, producen daño en la membrana celular bacteriana al penetrarla y causar la lisis celular (Rivas *et al.*, 2005). Por la misma razón, tampoco podríamos asociarla al mecanismo de acción de la toxina GsMTx4 de 34 residuos, de patrón de cisteínas C-C-CC-C-C y aislada de la tarántula *Grammostola spatulata*. Hasta el momento, es la única toxina descrita que modula el MscL mostrado en un modelo de esferoplastos gigantes de *E. coli*; mismo canal que ha sido descrito en *M. tuberculosis*. La toxina mostró unirse a la interfase lipídica del canal, incrementando el estrés local que es detectado por el canal, estabilizando un estado abierto del mismo (Kamaraju *et al.*, 2010).

En esta misma línea de investigación, para sugerir el posible blanco molecular de cal26a como agente antimicobacteriano, sabemos que son pocos los reportes que asocian a las conotoxinas con la actividad antimicrobiana, tal como suponemos está ocurriendo con nuestra conotoxina. De lo poco que se conoce, la ω -CTX GVIA, descrita por ser un bloqueador de canal de calcio, mostró inhibir la quimiotaxis de *Escherichia coli*. La conotoxina actúa en la membrana citoplasmática de la bacteria, y se han sugerido dos proteínas (de 50 kDa y 65 kDa), como posibles blancos moleculares (Tisa, 2000). Resulta difícil relacionar a GVIA y cal26a, excepto por la

conservación del residuo lisina al inicio de las secuencias, que es de gran importancia para GVIA en la interacción con el canal (Brady *et al.*, 2013).

Sin embargo, en *M. tuberculosis* se ha descrito que las bombas de salida presentes en la membrana del bacilo actúan en el mecanismo de resistencia a fármacos. Se ha descrito que la micobacteria expresa un gen que codifica una bomba de eflujo para sacar al fármaco RIF, como mecanismo para generar resistencia. De esto, se ha mencionado que la inhibición de las bombas de salida por verapamilo, un fármaco descrito por ser bloqueador de canales de calcio, reduce la tolerancia a fármacos y aumenta la eficacia de los mismos. En nuestro caso, no estuvimos trabajando con una cepa que fuera resistente a RIF, pero se ha descrito que la cepa H37Rv expresa múltiples proteínas de eflujo, en mayor o menor grado, considerando que estas bombas probablemente tengan un papel fisiológico preexistente, para protección del bacilo contra moléculas tóxicas a nivel intracelular, en la línea de conservación de la homeostasis (Lounn *et al.*, 2009).

Evidentemente, con la falta de estudios que sustenten la idea anterior, lo recién mencionado solo es elucubración de un posible blanco molecular de cal26a al contactarse con el bacilo. Solo la continuación de nuestro trabajo nos permitirá identificar y relacionar a cal26a con su blanco en *M. tuberculosis*.

9.2 Caracterización bioquímica y biológica de la conotoxina xm1b

La caracterización de los componentes del veneno de *C. ximenes* no ha sido descrita previamente. Por lo tanto, nuestro trabajo reporta la primera conotoxina nativa, aislada del veneno de esta especie. El análisis del péptido por degradación de Edman y ESI-MS, indicaron que la conotoxina con actividad en la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* es: **DGCCRDPKAINCV**, con una masa molecular monoisotópica experimental de 1519.60 Da.

La conotoxina xm1a presenta características estructurales y alta similitud con la conotoxina α -lml, lo que permitió fácilmente clasificarla como miembro de la familia de las α -CTxs (figura 53). En esta familia existe una sub-clasificación basada en el

número de residuos en los espacios intercisteínas. En este caso, xm1a pertenece a la sub-clasificación $\alpha 4/3$, subfamilia que se caracteriza por presentar la siguiente distribución **CC-C(X4)-C(X3)** y por ser bloqueadores selectivos de los nAChRs neuronales (Azam y McIntosh, 2009).

Otra conotoxina $\alpha 4/3$ muy similar a la lml fue también aislada de la misma especie *C. imperialis*, y nombrada α -CTx lmlI. Aunque también es altamente homóloga a lml, por conservar 9 de los 12 residuos presentes en lml, la α -CTx lmlI, no compite con la α -bungarotoxina por el sitio de unión del $\alpha 7$ nAChR. La razón está relacionada con la ausencia de la Pro6 en lmlI, y la presencia de una Arg en esa posición. La Pro6 en la α -CTx lml, ha sido considerada como el aminoácido crítico en determinar la ubicación de la unión de la toxina con el receptor $\alpha 7$ (Ellison *et al.*, 2003). Nuestra conotoxina conserva en su estructura primaria este aminoácido clave para la afinidad sumado a otros residuos importantes en la interacción como Asp5 y Arg7, solo exceptuando al Trp10, que ha sido involucrado en menor grado; estos mismos residuos han sido asociados en la interacción de la conotoxina α -CTx RglA con los $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. En este caso, está involucrada adicionalmente la Arg9, por participar de forma importante en la interacción con los residuos de carga negativa presentes en el receptor. Este mismo residuo Arg9, se encuentra presente en lmlI, pero las interacciones dadas por Asp5 y Arg7, participan en su afinidad hacia los receptores $\alpha 7$. Solo que la ausencia de Pro6 en lmlI dirige a unirse a un sitio diferente de lml (que se caracteriza por unirse en el “binding pot”). Por lo tanto, la presencia de Asp5, Pro6 y Arg7 en el primer bucle de xm1a es indicio fuerte de una posible unión similar a la α -CTx lml con el $\alpha 7$ nAChR (Arias & Blanton 2000; Azam & McIntosh 2009).

De las diferencias entre ambas conotoxinas, es de mencionarse la presencia de un residuo adicional en el extremo amino y carboxilo, presente en xm1a. La extensión del N-terminal con la presencia de la carga negativa dada por el Asp se ha reportado para tres conotoxinas α -CTx PIA, α -CTx ArIA y α -CTx GIA, donde para esta última se evidenció que el residuo era importante en la afinidad hacia el receptor $\alpha 7$ (Dowell *et al.*, 2003; Whteaaker *et al.*, 2007; Millard *et al.*, 2009). Otra

diferencia en xm1a es el residuo con carga positiva Arg5 (Ser4 en ImI), que es de resaltar por ubicarse en el bucle que incluye los residuos más importantes para la interacción con el receptor. La inclusión de residuos cargados en la estructura de xm1a evidentemente altera sus propiedades fisicoquímicas, lo que pudiera traducirse en una cinética y potencia diferente al unirse a su blanco molecular. Solo estudios de estructura-actividad podrán indicar los aminoácidos más importantes para la interacción con el receptor.

La asignación del patrón de enlaces disulfuro se infirió porque la familia de las α -CTxs conserva el arreglo C1-C3, C2-C4. Mientras que el patrón de lazos (C1-C4, C2-C3) corresponde a la familia de las χ -CTx. Sin embargo, se ha sugerido la presencia de la conotoxina α -GI con el patrón de lazos de forma nativa, sumada a la conformación globular convencional (Safavi-Hemami *et al.*, 2012). La posibilidad de que exista la conformación C1-C2 y C3-C4 en la naturaleza es remota por ser un arreglo energéticamente desfavorable.

Para las α -CTxs se ha reportado algunas modificaciones postransduccionales, donde destaca la amidación del carboxilo terminal. Para xm1a nos resultó difícil asignar esa modificación porque la masa monoisotópica teórica (sin amidación) y experimental fue de 1519.60 Da (análisis en www.peptidesynthetics.co.uk), pero no se descarta la posibilidad de que la modificación esté presente. Además, de acuerdo con los resultados de Cervantes (2013). quién evaluó las dos versiones, se demostró que ambas secuencias presentan la misma actividad inmunomoduladora pero variando la potencia, siendo más efectiva la versión amidada. Entre las α -CTxs reportadas sin amidación se encuentra la α -CTx RglA, que se dirige a los receptores α 9/ α 10 (Ellison *et al.*, 2006).

En relación al posible blanco molecular de xm1a y/o xm1b en *M. tuberculosis*, sabemos que nuestra conotoxina logra inhibir el crecimiento del bacilo pero es poco lo que se conoce de canales expresados en la micobacteria. Se ha descrito un canal mecanosensible MscL (figura 3) que por ser ubicuo, se ha demostrado en *E. coli* y *B. subtilis* que está involucrado en la viabilidad celular, participando en la

osmorregulación de la bacteria para evitar la lisis celular o implicado al inicio de la fase estacionaria anticipando cambios osmóticos (Haswell *et al.*, 2011). Por otro lado, Chan y colaboradores, determinaron por cristalografía la estructura del MscL presente en *M. tuberculosis* (MscL-TB), y lo asemejan al nAChR, no solo por ser un homopentámero sino también por presentar similitudes en la estructura del poro, así como la orientación, empaquetamiento de la hélice y ángulo de inclinación (Chang *et al.*, 1998). En este trabajo se menciona que las hélices de ambas proteínas, en la constricción del poro, se encuentran alineadas con residuos polares como treoninas o serinas y residuos hidrofóbicos. El alineamiento de la α hélice transmembranal (TM2) del MscL-TB y la α -hélice M2 del nAChR distan mucho de presentar un porcentaje de identidad que las relacione (análisis no mostrado). Entonces, a pesar de las similitudes mencionadas por estos autores, no hay evidencia que nos acerque a considerar este canal como blanco de nuestra conotoxina en *M. tuberculosis*.

A pesar de que con esta información carecemos de herramientas para asignar a xm1a y/o xm1b hacia un blanco molecular en *M. tuberculosis*, sí podemos asociarlas a una posible participación en la modulación de los receptores nicotínicos, con la ayuda del trabajo de tesis realizado por Cervantes, donde se evaluó el papel de ambas secuencias como antagonistas nicotínicos en la activación de macrófagos, en presencia del agonista nicotina y el estímulo de LPS (Cervantes, 2013). Se ha descrito que los receptores nicotínicos se encuentran presentes en numerosas poblaciones celulares, lo que incluye su participación en la modulación de la respuesta inflamatoria. Así, los receptores nicotínicos de tipo neuronal se encuentran expresados en la membrana de macrófagos, linfocitos T y B, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos y células asesinas naturales (Ulloa & Jonge, 2007). Lo anterior es importante para nuestro trabajo porque, como se comentó previamente, *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular que infecta principalmente a macrófagos para protegerse de la respuesta inmune del hospedero y de la acción de fármacos antifímicos, reduciendo la activación del macrófago y su capacidad citolítica y microbicida (Kaufmann, 2002). Por lo tanto, el papel de los agonistas nicotínicos es el de favorecer la reducción de citocinas pro-

inflamatorias y reducir la capacidad microbicida, alterando la capacidad de las células infectadas de eliminar patógenos intracelulares. Lo contrario se esperaría al evaluar a un antagonista nicotínico como creemos es xm1b, al suponer una competencia por el sitio de unión del agonista.

En el trabajo de Cervantes, se demostró que la versión amidada favorece mayormente la transcripción de genes pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF- α , en comparación con el control de exposición a nicotina ($p < 0.05$ respecto al control LPS + NIC). La capacidad de xm1b de potenciar citocinas de la respuesta pro-inflamatoria, en presencia de un agonista de los receptores nicotínicos, sustenta la capacidad competitiva de nuestra conotoxina por el sitio de unión de la nicotina, así como su potencial inmunoestimulante.

Sumado a la capacidad de favorecer la transcripción de genes pro-inflamatorios *in vitro*, la conotoxina xm1b en el modelo murino se comportó con una tendencia similar a la actividad bactericida observada en los ensayos *in vitro*, donde la carga bacilar disminuyó significativamente en el segundo mes de tratamiento, en comparación con el control de solución salina. Queda claro, que la evaluación completa comprende el análisis histopatológico de los pulmones enfermos y la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias para descartar la posibilidad de una inflamación excesiva del tejido que conlleve a daño tisular, y de esta manera, dar un diagnóstico preciso de la evolución de la enfermedad en los ratones infectados.

El empleo de nicotina en diferentes estudios ha evidenciado su papel como fármaco anti-inflamatorio. Sin embargo, la exposición prolongada al alcaloide ha demostrado efectos opuestos. A diferencia de los ligandos como colina o acetilcolina, la nicotina no es removida del sitio de unión rápidamente, provocando una desestabilización del receptor, lo que introduce el concepto de que la nicotina también puede actuar como antagonista del receptor, dependiente de la administración extendida. Este resultado ha dado respuesta a preguntas sobre diferentes padecimientos que involucran a la nicotina con el efecto pro-inflamatorio como la aterosclerosis. En este caso, ocurre una reactivación del factor NF- κ B en

el ambiente que conlleva la sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias como la osteopontina (OPN), IL-6 y proteína quimioatrayente de monocito (MCP-1) (Gahring *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012). Esto mismo pudiera explicar nuestros resultados, donde vía NF- κ B/OPN, la administración prolongada de la nicotina, pudiera estar desviándose hacia una respuesta pro-inflamatoria en los pulmones enfermos. Por lo tanto, el uso de este fármaco en experimentos de exposición prolongada es algo que debe reconsiderarse.

Conclusiones

Los venenos de los caracoles marinos del género *Conus* contienen moléculas con gran potencial biomédico. Sin embargo la actividad antibacteriana no es una línea de investigación muy explorada para las conotoxinas. En este trabajo fue demostrado que en las tres especies evaluadas *C. californicus*, *C. regularis* y *C. ximenes*, existen componentes en sus venenos con actividad sobre *M. tuberculosis*. Se logró identificar dos secuencias de conotoxinas que son las responsables de la actividad: xm1a y cal26a, aisladas de *C. ximenes* y *C. californicus*, respectivamente.

El trabajar con conotoxinas resulta en un reto por las características que las definen. Como se observó en nuestro trabajo, la cantidad de material biológico nativo que resultó disponible fue una limitante para continuar con la investigación. Para obtener grandes cantidades de material existen dos enfoques básicos: la síntesis química y la producción recombinante en un sistema de expresión heteróloga. Una vez conociendo la estructura primaria de la conotoxina de interés y lo compleja que ésta resulte, eso definirá la dirección del trabajo. En nuestro caso, hicimos uso de la síntesis química para xm1a por ser una conotoxina pequeña, sin mayor complicación en las modificaciones postraduccionales que presenta (pocos enlaces disulfuro y amidación de C-terminal). Pero para el caso de cal26a, fue necesario clonar el gen, considerando como opción más viable su producción recombinante por la longitud, la complejidad en las modificaciones postraduccionales que presenta (4 enlaces disulfuro, 4 hidroxiprolinas, amidación de C-terminal) y el desconocimiento del patrón de enlaces entre cisteínas.

La identificación de los blancos moleculares no fue posible en este trabajo. Sin duda, el acercamiento más tangible fue la evidencia de que xm1a es miembro de las alfa conotoxinas y que los resultados sugieren que puede tener su actividad sobre los $\alpha 7$ nAChR.

La dualidad en el efecto de esta conotoxina, que actúa como inmunomodulador favoreciendo la respuesta pro-inflamatoria y la actividad que tiene sobre la micobacteria inhibiendo su crecimiento, podría extrapolarse a una situación de enfermedad avanzada, donde la conotoxina es capaz de disminuir la carga bacilar de los pulmones en ratones infectados e inhibir el crecimiento de los bacilos no fagocitados. Estos resultados colocan a xm1b como nuestro mejor candidato para futuros estudios, enfocados en su incorporación al tratamiento con antibióticos convencionales para evaluar su actividad sinérgica y su comportamiento en cepas MDR.

Referencias bibliográficas

Abdallah A. M., Gey van Pittius N. C., DiGiuseppe P. A., Cox J., Luirink J., Vandenbroucke-Grauls C. M., Appelmek B. J., & Bitter W. (2007). **Type VII secretion-mycobacteria show the way.** *Nature Reviews Microbiology*. 5: 883-891.

Aguilar M. B., López-Vera E., Ortiz E., Becerril B., Possani L. D., Olivera B. M., & Heimer de la Cotera E. P. (2005). **A novel conotoxin from *Conus delessertii* with postranslationally modified lysine residues.** *Biochemistry*. 44: 11130-11136.

Ajouz B., Berrier C., Besnard M., Martinac B., & Ghazi A. (2000). **Contributions of the different extramembranous domains of the mechanosensitive ion channel MscL to its response to membrane tension.** *Journal of Biological Chemistry*. 275: 1015-1022.

Ajouz B., Berrier C., Garrigues A., Besnard M., & Ghazi A. (1998). **Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel mscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells.** *Journal of Biological Chemistry*. 273: 26670-26674.

Arias H., & Blanton M. P. (2000). **Alpha-conotoxins.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 32: 1017-1028.

Azam L., & McIntosh J. M. (2009). **Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors.** *Acta Pharmacologica Sinica*. 30: 771-773.

Bernáldez J., López O., Licea A., Salceda E., Arellano R. O., Vega R., & Soto E. (2011). **Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca²⁺ channels.** *Toxicon*. 57: 60-67.

Bernáldez J., Román-González S.A., Martínez O., Jiménez S., Vivas O., Arenas I., Corzo G., Arreguín R., García D.E., Possani L. D., & Licea A. **A conus regularis conotoxin with a novel eight-cysteine framework inhibits CaV2.2 channels and displays an anti-nociceptive activity.** *Marine Drugs*. 11:1188-1202.

Borwn M. A. Begley G. S., Czerwiec E., Stenberg L.M., Jacobs M., Kalume D. E., Roepstorff P., Stenflo J., Furie B. C., & Furie B. (2005). **Precursors of novel Gla-containing conotoxins contain a carboxy-terminal recognition site that directs γ -carboxylation.** *Biochemistry*. 44: 9150-9159.

Buczek O., Bulaj G., & Olivera B. M. (2005). **Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products.** *Cellular and Molecular Life Science*. 62: 3067-3079.

Buczek O., Wei D., Babon J., Yang X., Fiedler B., Chen P., Yoshikami D., Olivera B. M., Bulaj G., & Norton R.S. **Structure and sodium channel activity of an excitatory I1-superfamily conotoxin.** *Biochemistry*. 46: 9929-9940.

Biggs J. S., Watkins M., Puillandre N., Ownby J-P., Lopez-Vera E., Christensen S., Juarez K. M. Bernaldez J., Licea-Navarro A., Showers P. C., & Olivera B. M. (2010). **Evolution of Conus peptide toxins: analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844.** *Molecular phylogenetics and evolution*. 56: 1-12.

Blount P., Schroeder M. J., & Kung C. (1997). **Mutations in a bacterial mechanosensitive channel change the cellular response to osmotic stress.** *Journal of Biological Chemistry*. 272: 32150-32157.

Brady R. M., Baell J. B., & Norton R. S. (2013). **Strategies for the development of conotoxins as new therapeutic leads.** *Marine Drugs* 11: 2293-2313.

Brennan P. J., & Nikaido H. (1995). **The envelope of mycobacteria.** *Annual Review of Biochemistry*. 64: 29-63.

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Gobierno Federal (2012). Recuperado el 22 de octubre de 2012 de www.programassociales.org.mx/sustentos/Veracruz834/archivos/Situacion-de-la-TBenVeracruz.pdf

Cervantes K. L., (2013). **Aislamiento y caracterización del péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género *Conus*.** Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B. C. México. Recuperada de www.biblioteca.uabc.mx

Chang G., Spencer R. H., Lee A. T., Barclay M. T., & Rees D. C. (1998). **Structure of MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel.** *Science*. 282: 2220-2226.

Chartterjee D. (1997). **The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action.** *Current Opinion in Chemical Biology*. 1: 579-588

Center for Biological Sequence Analysis (2012). Technical University of Denmark DTU. Programa SignalP 4.1. Recuperado el 10 de Mayo del 2012 de www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/.

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. (2007). Predicción de mareas. Recuperado en junio de 2007 de <http://predmar.cicese.mx/mensual/szl/szl0706.pdf>.

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. (2008). Predicción de mareas. Recuperado en octubre de 2008 de <http://predmar.cicese.mx/mensual/bla/bla0810.pdf>

Dowell C., Olivera B. M., Garrett J. E., Staheli S. T., Watkins M., Kuryatov A., Yoshikami D., Lindstrom J. M., & McIntosh J. M. (2003). **Alpha-conotoxin PIA is selective for alpha6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors.** *The Journal of Neuroscience*. 23: 8445-8452.

Duda T. F. Jr., & Palumbi S. R. (2004). **Genes expression and feeding ecology: evolution of piscivory in the venomous gastropod genus *Conus*.** *Proceedings of the Royal Society*. 271: 1165-1174.

Dutton J. L., & Craik D. J. (2001). **alpha-Conotoxins: nicotinic acetylcholine receptor antagonist as pharmacological tools and potential drug leads.** *Current medicinal chemistry*. 8: 327-344.

El rincón de malacólogo por José Liétor Gallego (2013). Recuperado el 11 de octubre de 2013 en <http://www.elrincondelmalacologo.com/Web%20fotos%20gasteropodos%20marinos/Fotos%20coleccion/Conidae/Conus%20regularis.jpg>.

El rincón de malacólogo por José Liétor Gallego (2013) . Recuperado el 11 de octubre de 2013 en <http://www.elrincondelmalacologo.com/Web%20fotos%20gasteropodos%20marinos/Fotos%20coleccion/Conidae/Conus%20ximenes.jpg>.

Elliger C. A., Richmond T. A., Lebaric Z. N., Pierce N. T., Sweedler J. V., & Gilly W. F. (2011). **Diversity of conotoxin types from *Conus californicus* reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history.** *Toxicon*. 57: 311-322.

Ellison M., Haberlandt C., Gomez-Casati M. E., Watkins M., Elgoyhen A. B., McIntosh J. M., & Olivera B. M. (2006). **α -RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR.** *Biochemistry*. 45: 1511-1517.

Ellison M., McIntosh J. M., & Olivera B. M. (2003). **α -conotoxins Iml and ImlI. Similar alpha 7 nicotinic receptor antagonists act at different sites.** *Journal of Biological Chemistry*. 278: 757-7764.

Finney A. B., Meng-Chiang M. K., Yoshimura K. & Kung C. (2001). **Gating the bacterial mechanosensitive channel MscL *in vivo***. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 5643-5648.

Franco A., Pisarewicz K., Moller C., Mora D., Fields G. B., & Mari F. (2006) **Hyperhydroxylation: A new strategy for neuronal targeting by venomous marine molluscs**. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 43: 83-103.

Frieden T. R., Sterling T. R., Munsiff S. S., Watt C. J., & Dye C. (2003). **Tuberculosis**. *Lancet*. 362: 887-899.

Gahring L. C. & Scott W. R. (2006). **Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneural cells**. *The AAPS Journal*. 86: 885-894.

Gilly W. F., Richmond T. A., Duda T. F., Elliger C., Lebaric Z., Schulz J., Bingham J. P., & Sweedler J. V. (2011). **A diverse family of novel peptide toxins from an unusual cone snail, *Conus californicus***. *The Journal of experimental biology*. 214: 147-161.

Gracy J., Le-Nguyen D., Gelly J. C., Kaas Q., Heitz A., & Chiche L. (2008). **KNOTTIN: the knottin or inhibitor cysteine knot scaffold in 2007**. *Nucleic Acids Research*. 36: D314-D319.

Gray W.R., Rivier J. E., Galyean R., Cruz L. J., & Olivera B. M. (1983). **Conotoxin MI. Disulfide bonding and conformational states**. *The Journal of Biological Chemistry*. 258: 12247-12251.

Gullingsrud J., Kosztin D., & Schulten K. (2001). **Structural determination of MscL gating studied by molecular dynamics simulation**. *The Biophysical Journal*. 80: 2074-2081.

Guy E. S. & Mallampari A. (2008). **Review: Managing TB in the 21st Century: Existing and Novel Drug Therapies**. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2: 401-408.

Hamano R., Takahashi H. K., Iwagaki H., Yoshino T., Nishibori M., & Tanaka N., (2006). **Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the Toll-like receptor 4 expression in human monocytes**. *Shock*. 26: 358-364.

Hardy Eddi. Hardy's Internet guide to marine gastropods. (2013). Recuperado el 11 de octubre de 2013 de <http://www.gastropods.com/3/Shell593.shtml>.

Haswell E. S., Phillips R., & Rees D. C. (2011). **Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it?**. *Structure*. 19: 1356-1369.

Heinz C., Engelhardt H., & Niederweis M. (2003). **The core of the tetrameric mycobacterial porin MspA is an extremely stable beta-sheet domain**. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 8678-8685.

Hernández-Pando R., Orozco H. E., Sampieri A., Pavón L., Velasquillo C., Larriva-Sahd J., Alcocer M. M. & Madrid M. V. (1996). **Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis**. *Immunology*. 89: 26-33.

Instituto de Servicios de Salud Pública de Baja California (2011). Recuperado de http://www.saludbc.gob.mx/wp-content/uploads/2011/02/IMSS_070_08_EyR.pdf

Jacobsen R. B., Jimenez E. C., De la Cruz R. G. C., Gray W. R., & Olivera B. M. (1999). **A novel D-leucine-containing Conus peptide: diverse conformational dynamics in the contryphan family**. *The Journal of Peptide Research*. 54: 93-99.

Jin A-H., Brandstaetter H., Nevin S. T., Tan C. C., Clark R. J., Adams D. J., Alewood P. F., Craik D. J., & Daly. (2007). **Structure of α -conotoxin BulA: influences of disulfide connectivity on structural dynamics**. *BMC Structural Biology* 7:28.

Kamaraju K., Gottlieb P.A., Sachs F., & Sukharev S. (2010). **Effects of GsMTx4 on bacterial mechanosensitive channels in inside-out patches from giant spheroplasts**. *Biophysical Journal*. 99: 2870-2878.

Kaufmann S. H. (2002). **Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages**. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 61: 54-58.

Lambert P. A. (2002). **Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria**. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 46S-54S.

Lau P. P., Li L., Merched A. J., Zhang A. L., Ko K. W. S., & Chan L. (2006). **Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor - I- mice**. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 26:143-149.

Lopez-Vera E., Walewska A., Skalicky J. J., Olivera B. M., & Bulaj G. (2008). **Role of hydroxyprolines in the *in vitro* oxidative folding and biological activity of conotoxins**. *Biochemistry*. 47: 1741-1751.

Louwn G. E., Warren R. M., Gey van Pittius N. C., McEvoy C. R. E. Van Helden P. D., & Victor T. C. (2009). **A balancing act: Efflux/Influx in mycobacterial drug resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53: 3181-3189.

Luna H. J., Martínez C. G., Parra M. R., Enciso M. A., Torres L. J., Quesada P. F., Delgadillo P. R., & Franzblau S. G. (2003). **Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.** *European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 22: 21-27.

Luo S. Zhangsun D., Lin Q., Xie L., Wu Y., & Zhu X. (2006). **Sequence diversity of O-superfamily conopeptide from *Conus marmoreus* native to Hainan.** *Peptides* 27: 3058-3068.

Madigan M. T., Martinko M., & Parker J. Brock. (1999). **Biología de los microorganismos.** Octava edición. Prentice Hall. 966 p.

Mahapatra S., Basu J., Brennan P., & Crick D. (2005). **Structure, biosynthesis, and genetics of the mycolic acid-arabinogalactan-peptidoglycan complex.** In **tuberculosis and the tubercle bacillus.** *American Society for Microbiology Press*. 275-285.

Martin A., Moncillo N., Lemus D., Montoro E., Telles M. A., Simboli N., Pontino M., Porras T., León C., Velasco M., Chacon L., Barrera L., Ritacco V., Portales F., & Palomino J. C. (2005). **Multicenter study on MTT and resazurin assays for susceptibility testing to first-line antituberculosis drugs.** *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. 9: 901-906.

Masek T., Vopalensky V., Suchomelova P., & Pospisek M. (2005). **Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels.** *Analytical Biochemistry*. 336: 46-50.

McIntosh J. M., Yoshikami D., Mahe E., Nielsen D. B., Rivier J. E., Gray W. R., & Olivera B. M. (1994). **A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, α -conotoxin Iml.** *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 16733-16739.

Millard E. L., Nevin S. T., Loughnan M. L., Nicke A., Clark R. J., Alewood P. F., Lewis R. J., Adams D. J., Craik D. J., & Daly N. L. (2009). **Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes by alpha-conotoxin GID and analogues.** *The Journal of Biological Chemistry*. 284: 4944-4951.

Munro, D. A. (2005). **Análisis del efecto de la toxina de *Anthopleura elegantissima*, *C. californicus* y *Auronoctonus phaiodactylus* en *Mycobacterium tuberculosis***. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. Recuperada de <http://biblioteca.cicese.mx/>

National Center for Biotechnology Information (2011). Basic Local Alignment Search Tool. Recuperado el 27 de enero de 2011 de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2009). Department of Health and Human Services. Recuperado y modificado el 20 de Agosto del 2009 de <http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/tuberculosis/tb1.jpg>

Niederweis M., Danilchanka O., Huff J., Hoffmann C., & Engelhardt H. (2010). **Mycobacterial outer membranes: in search of proteins**. *Trends in Microbiology* 18: 109-116.

Okunade L. A., Memory P. F., Lewis E. & Lewis H. W. (2004). **Natural antimycobacterial metabolites: curren status**. *Phytochemistry* 65: 1017-1032.

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

Ortalo M. A., Dupont M. A., Lemassu A., Andersen A. B., Guonon P., & Daffé M. (1995). **Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus**. *Microbiology*. 141:1609-1620

Ou X., Blount P., Hoffman R. J. & Kung C. (1998). **One face of transmembrane helix is crucial in mechanosensitive channel gating**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 11471-11475

Peng C., Liu L., Shao X., Chi C., & Wang C. (2008). **Identification of a novel class of conotoxins defined as V-conotoxins with a unique cysteine pattern and signal peptide sequence**. *Peptides*. 29: 985-991.

Peptide Protein Research Limited. (2012). Peptides synthetics Recuperado el 25 de abril de 2012 de <http://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>.

Raynaund C., Papavinasasundaram K. G., Speight R. A., Springer B., Sander P., Bottger E. C., Colston M. J., & Draper P. (2002). **The functions of OmpATB, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis***. *Molecular Microbiology*. 46: 191-201.

Rivas-Santiago B., Sada E., Hernández-Pando R., Tsutsumi V. (2005). **Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas.** *Salud pública de México.* 48: 62-71.

Safavi-Hemami H., Gorasia D. G., Steiner A. M., Williamson N. A., Karas J. A., Gajewiak J., Olivera B. M., Bulaj G., & Purcell A. W. (2012). **Modulation of conotoxin structure and function is achieved through a multienzyme complex in the venom glands of cone snails.** *The Journal of Biological Chemistry.* 287: 34288-34303.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2012). Recuperado el 23 de noviembre 2012 de <http://www.cenavece.salud.gob.mx/>.

Sun S., Xie H., Sun Y., Song J., & Li Z. (2012). **Molecular characterization of gap region in 28S rRNA molecules in brine shrimp *Artemia parthenogenica* and planarian *Dugesia japonica*.** *Biochemistry* 77: 411-417.

Terlau H., & Olivera B. M., (2004). **Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides.** *Physiological Reviews.* 84: 41-68.

The European Bioinformatics Institute (2012). Programa ClustalW. Recuperado el 10 de mayo de 2012 en www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/.

The World Health (2006). Report: working together for health. Recuperado el 11 de octubre de 2013 de http://www.who.int/whr/2006/whr06_en.pdf

Tisa L. S. (2000). **Interaction of ω -conotoxin and the membrane calcium transport system of *Escherichia coli*.** *Federation of European Microbiology Societies.* 188: 97-101.

Trials J., Jarlier V. & Benz R. (1992). **Porins in the cell wall of mycobacteria.** *Science* 258: 1479-1481.

Ulloa L., & de Jonge W. J. (2007). **The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation.** *British Journal of Pharmacology.* 151: 915-929.

Wang C. Z., Jiang H., Ou Z. L., Chen J. S., & Chi C. W. (2003). **cDNA cloning of two A-superfamily conotoxins from *C. striatus*.** *Toxicon.* 42: 613-619.

Wang Y., Zhang F., Yang W., & Xue S. (2012). **Nicotine induces pro-inflammatory response in aortic vascular smooth muscle cells through a NF κ B-Osteopontin amplification loop-dependent pathway.** *Inflammation*. 35: 342-349.

Whiteaker P., Christensen S., Yoshikami D., Dowell C., Watkins M., Gulyas J., Rivier J., Olivera B. M., & McIntosh J. M. (2007). **Discovery synthesis and structure activity of a highly selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist.** *Biochemistry*. 46: 6628-6638.

Wink M. (1984). **Evidence for an extracellular lytic compartment of plant cell suspension cultures: the cell culture medium.** *Naturwissenschaften* 71.

Winnebeck E. C., Millar C. D., & Warman G. R. (2010). **Why does insect RNA look degraded?.** *Journal of Insect Science* 10: 159.

Woodward R. S., Cruz J. L., Olivera M. B., & Hillyard R. S. (1990). **Constant and hypervariable Regions in Conotoxin Propetides.** *The EMBO Journal* 9: 1015-1020.

Xie J. P., Yue J., Xiong Y. L., Wang W. Y., Yu S. Q., & Wang H. H. (2003). **In vitro activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.** *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22: 172-174.

Yefimov S. Van der Huyesen E., Onck P. R., & Marrink S. J. (2008). **Mechanosensitive membrane channels in action.** *Biophysical Journal* 94: 2994-3002.

Yuan D., Han Y., Wang C., & Che C. (2007). **From the identification of gene organization of α conotoxins to the cloning of novel toxins.** *Toxicon*. 49: 1135-1149.

Zhuo Y., Zuo X., Li Y., Wang Y., Zhao H., & Xiao X. (2012). **Nicotine inhibits tumor necrosis factor-alpha induced IL-6 and IL-8 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatology International*. 32: 97-104.