



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización bioquímica de péptidos presentes en el
veneno de un caracol marino (*Conus fergusonii*).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS ARTURO LIÉVANO BELTRÁN



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
CDMX, 2017**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Liévano

Beltrán

Luis Arturo

62 79 93 54

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

412013669

2. Datos del tutor

Dr

José Estuardo

López

Vera

3. Datos del sinodal 1

Dra

Elisa

Carrillo

Flores

4. Datos del sinodal 2

Dr

Josué Orlando

Ramírez

Jarquín

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Brian

Urbano

Alonso

6. Datos del sinodal 4

Dr

Iván

Lazcano

Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización bioquímica de péptidos presentes en el veneno de un caracol marino
(*Conus fergusonii*).

60 p

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Caracterización bioquímica de péptidos presentes en el veneno de un caracol marino (*Conus fergusonii*)

realizado por **Luis Arturo Liévano Beltrán** con número de cuenta **412013669** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. Elisa Carrillo Flores

Propietario Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín

Propietario Dr. José Estuardo López Vera
Tutor

Suplente M. en C. Brian Urbano Alonso

Suplente Dr. Iván Lazcano Sánchez

LAZCANO SANCHEZ IVAN

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 31 DE MARZO DE 2017

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

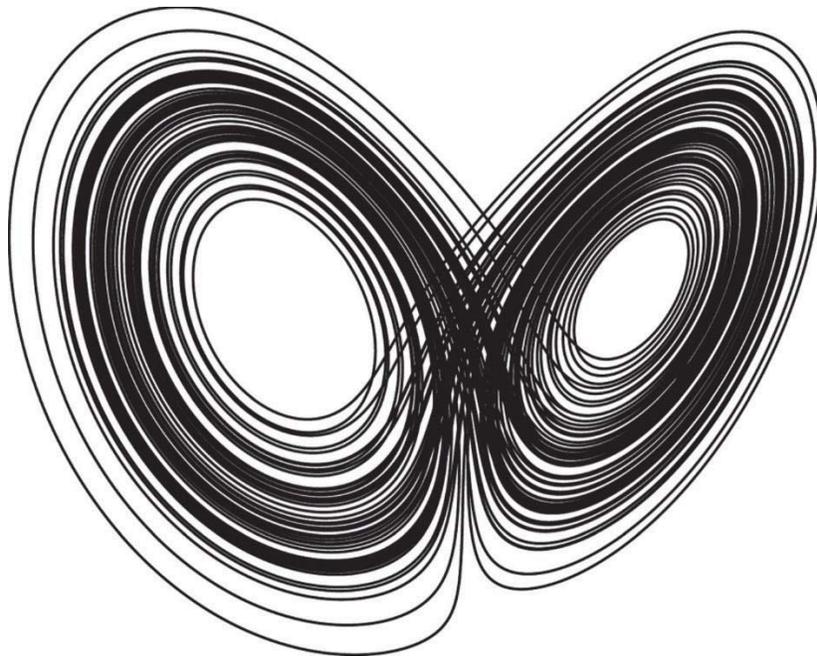
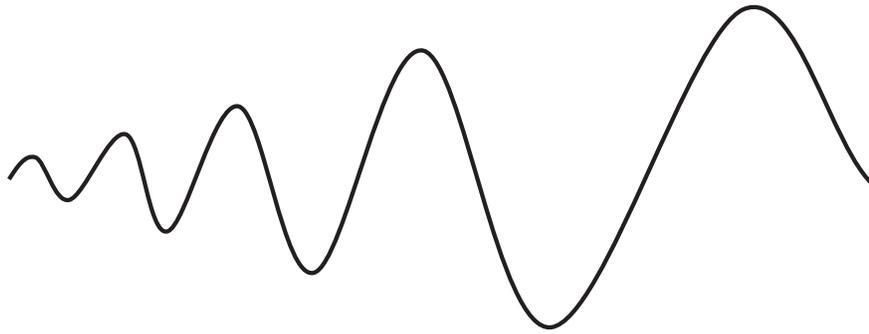
ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, dentro del Laboratorio de Toxinología Marina bajo la asesoría del Dr. José Estuardo López Vera.

El presente trabajo fue financiado gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN204116; al Proyecto Institucional 615 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con los proyectos 153915 y 15809.

¿Cómo describir la luz si se ha vivido toda una vida en la oscuridad?



Agradecimientos

A ti que te tomaste la molestia y el tiempo de leer esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la *Alma Mater*.

Al Dr. Estuardo López Vera, quién además de aceptarme en su laboratorio me ofreció su apoyo incondicional, su amistad, su conocimiento, su paciencia y una valiosa formación académica, lo que además permitió el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Josué Ramírez, Dr. Iván Lazcano, la Dra. Elisa Carrillo y el M. en C. Brian Urbano, sinodales del jurado por sus comentarios y sus valiosas recomendaciones.

A la Dra. Mónica Ortiz Arellano, por la captura e identificación de los caracoles utilizados para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Manuel Aguilar por sus valiosas correcciones.

Al ICMYL.

A mis compañer@s del Lab. De Toxinología: Luis, Elba, Angie, Elisa, Ximena, Brenda, Haydee y Minerva por su apoyo y los agradables momentos en el laboratorio y sus valiosos consejos.

A los profesores Dr. Alejandro Marché, Dr. David Romeu, Dra. Rosa Zugazagoitia, Dr. Rodolfo Salas, Dr. Josué Ramírez y Dr. Guillermo Cirano que tuvieron el interés y la pasión por demostrar que el conocimiento sin una dirección carece de belleza.

Dedicatorias

A mi amada madre Ma. del Carmen Beltrán Núñez por darme la vida, por su apoyo incondicional, por su amor inigualable y por su increíble resiliencia ante las malas jugadas de la vida sin permitir que la negatividad y la tristeza se aposenten sobre su corazón.

A mi padre Federico Arturo Liévano Mendoza, por mostrarme que no se necesita de un aula cuando se tienen ganas de aprender, por sus sabias enseñanzas que fungieron como pilares para mi desarrollo y cuyo infinito amor por su familia, la vida, la ciencia y el arte no conocía barreras, ni mucho menos respetarlas.

A mi querido hermano Tonatiuh que ha demostrado que nada es imposible de obtener si se desea con todo el corazón.

A mi dulce abuela Celia Núñez Flores por compartirme vivencias que me hacen cuestionar la moral de la sociedad en la que vivimos y la importancia de no caminar bajo la sombra de otro.

A mi tío Francisco Liévano por inculcarme la importancia de la filosofía y la disciplina y por saber escuchar cuando otros sólo supieron juzgar.

A Guillermo, Enrique y Daniel, mis hermanos de vida.

A Ángela, por demostrarme que la nobleza puede emerger de los lugares menos esperados y que vale la pena esforzarse por tratar de mejorar al mundo independientemente de que no se reciba nada a cambio.

A mis apreciad@s amig@s Casandra, Arcadio, Omar, Iván, Aarón, Mike, Oscar, Gibrán y Víctor, con quienes he tenido la oportunidad de compartir valiosas experiencias.

A mis estimados camaradas Luis, Gibrán y Víctor, con quienes he tenido la oportunidad de explorar ambientes subacuáticos inimaginables.

A Rocko por enseñarme que al cambio no se le pueden adjudicar connotaciones morales.

A Melissa por enseñarme que las cosas pueden aparentar ser una cosa en el exterior, pero ser otra en el fondo.

A mis compañer@s de la Facultad de Ciencias Marco, Sergio, Karime, Eugenio, Alejandro, Cata, Abril y Jerónimo, quienes hicieron de esta carrera una experiencia mucho más plena e interesante.

Índice general

Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas	xi
Índice de anexos	xi
Resumen	xii
Abstract	xii
I. Introducción.....	1
I.1. La importancia de los metabolitos bioactivos de organismos marinos.	1
I.2. Superfamilia Conoidea.....	1
I.3. Género <i>Conus</i>.....	2
I.4. <i>Conus fergusoni</i>.....	5
II. Antecedentes	7
II.1. Veneno de <i>Conus</i>	7
II.1.1. Componentes del veneno	7
II.1.2. Síntesis del veneno.....	7
II.1.3. Modificaciones postraduccionales	9
II.1.4. Conotoxinas y conopéptidos	10
II.1.5. Clasificación y nomenclatura de conotoxinas	11
II.1.6. Farmacología y fisiología	11
II.2. Técnicas de separación y análisis de laboratorio	12
II.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC).....	12
II.2.2. Cuantificación de proteínas.....	13
II.2.3. Espectrometría de masas	13
II.2.4. Secuenciación.....	16
II.2.5. Alineamiento de secuencias	16
III. Justificación	17
IV. Hipótesis	17
V. Objetivos	17
V.1. Objetivo general	17
V.2. Objetivos particulares.....	17
VI. Material y equipo de laboratorio	18
VI.1. Material Biológico	18

VI.2. Equipo de laboratorio	18
VI.2.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	18
VI.2.2. Espectrofotómetro	18
VI.2.3. Liofilizadora	18
VI.3. Reactivos.....	18
VI.3.1. Acetonitrilo	18
VI.3.2. Ácido Trifluoroacético.....	18
VII. Métodos	19
VII.1. Aislamiento del conducto venenoso	19
VII.2. Extracción del veneno crudo.....	19
VII.3. Separación de los componentes del veneno	19
VII.4. Cuantificación de proteínas	19
VII.5. Caracterización química	20
VII.5.1. Espectrometría de masas	20
VII.5.2. Secuenciación.....	20
VII.5.3. Alineamiento de secuencias	20
VIII. Diseño experimental.....	21
IX. Resultados	22
IX.1. Fraccionamiento del extracto crudo de <i>C. fergusonii</i>	22
IX.2. Cuantificación de proteínas de F1 y F4.....	23
IX.3. Subfraccionamiento de F1 y F4.....	23
IX.4. Purificación de los componentes mayoritarios	25
IX.5. Espectrometría de masas	31
IX.6. Determinación de la estructura primaria.....	38
IX.7. Alineamiento de secuencias	39
X. Discusión	41
XI. Conclusiones	49
XII. Perspectivas.....	49
XIII. Referencias.....	50
XIV. Anexos	57

Índice de figuras

Fig. 1. Estructura anatómica general del aparato venenoso de <i>Conus</i>	2
Fig. 2. Distribución y diversidad de especies del género <i>Conus</i> en el mundo.	3
Fig. 3. Dietas principales de los caracoles del género <i>Conus</i>	3
Fig. 4. A) Collar de aproximadamente 5,000 años encontrado en una tumba en Uruk, uno de los primeros asentamientos humanos en Mesopotamia; B) conchas de <i>C. ebraeus</i> (superior) y <i>C. parvatus</i> (inferior); C) conchas de diversos especímenes de izquierda a derecha: <i>C. marmoreus</i> , <i>C. cedonulli</i> , <i>C. imperialis</i> , <i>C. purpurascens</i> , <i>C. magus</i> , <i>C. geographus</i> y <i>C. gloriamaris</i> en la parte superior (tomado de Terlau & Olivera, 2004).	4
Fig. 5. Fotografías que muestran distintos ángulos de la concha de <i>C. fergusonii</i>	6
Fig. 6. Distribución geográfica de <i>C. fergusonii</i>	6
Fig. 7. Representación de la estructura general del precursor de la conotoxina <i>SmIVA</i> de <i>C. stercusmuscarum</i>	7
Fig. 8. Esquemmatización del proceso de maduración de un conopéptido.....	8
Fig. 9. Ejemplos de modificaciones postraduccionales de aminoácidos en péptidos sintetizados por <i>Conus</i>	9
Fig. 10. Clasificación de toxinas de acuerdo a la presencia de enlaces disulfuro, su superfamilia génica, el arreglo de Cys, la familia farmacológica y el blanco específico.....	10
Fig. 11. Se muestran los sucesos que ocurren durante la elución de un componente en RP-HPLC.	12
Fig. 12. Representación esquemática del proceso de ionización por electrospray.....	14
Fig. 13. Desviación de flujos iónicos expuestos a un campo electromagnético..	15
Fig. 14. Estructura general de un analizador de masas de tipo orbitrap.	15
Fig. 15. Esquema del diseño experimental planteado para este trabajo.	21
Fig. 16. Perfil cromatográfico del veneno de <i>C. fergusonii</i>	22
Fig. 17. Esquemmatización del fraccionamiento del extracto crudo de <i>C. fergusonii</i>	23

Fig. 18. Perfil cromatográfico resultante del subfraccionamiento de F1.	24
Fig. 19. Perfil cromatográfico resultante de la repurificación de F4.....	24
Fig. 20. Perfil cromatográfico resultante del subfraccionamiento de F1.	26
Fig. 21. Perfil cromatográfico resultante de la repurificación de F4.....	26
Fig. 22. Perfil cromatográfico del componente 13B.	27
Fig. 23. Perfil cromatográfico del componente 25B.	28
Fig. 24. Perfil cromatográfico del componente 29B.	28
Fig. 25. Perfil cromatográfico del componente 31B.	29
Fig. 26. Perfil cromatográfico del componente G3.	29
Fig. 27. Perfil cromatográfico del componente G6.	30
Fig. 28. Perfil cromatográfico del componente G7.	30
Fig. 29. Espectro de masas de la fracción 25B.....	32
Fig. 30. Espectro de masas de la fracción 29B.....	33
Fig. 31. Espectro de masas de la fracción 31B.....	34
Fig. 32. Espectro de masas de la fracción G3.	35
Fig. 33. Espectro de masas de la fracción G6.	36
Fig. 34. Espectro de masas de la fracción G7.	37
Fig. 35. Modelo propuesto para el péptido 31B.	44

Índice de tablas

Tabla 1. Fracciones resultantes de la dilución de las fracciones F1 y F4.....	25
Tabla 2. Cuantificación de proteína de los componentes mayoritarios de las subfracciones B y G.	27
Tabla 3. Cantidades de proteína utilizadas para llevar a cabo el análisis de espectrometría de masas.	31
Tabla 4. Masas teóricas obtenidas para los componentes purificados.....	31
Tabla 5. Estructura primaria, masa teórica y masa calculada del péptido 31B.	38
Tabla 6. Alineamiento de secuencias obtenido a través de BLAST.....	39
Tabla 7. Alineamiento de secuencias con el péptido 31 obtenido a través de ConoPrec.	39
Tabla 8. Patrones CX ₆ C similares entre la estructura primaria del péptido 13B y conotoxinas con arreglos de Cys XIV pertenecientes a la superfamilia O1.	47

Índice de anexos

Anexo 1. Ejemplos de conopéptidos analgésicos.....	57
Anexo 2. Modificaciones pos-traduccionales de aminoácidos conocidas para las toxinas de <i>Conus</i>	58
Anexo 3. Arreglos de Cys presentes en conotoxinas.	59
Anexo 4. Clasificación de conotoxinas.	60

Resumen

Los caracoles marinos pertenecientes al género *Conus* son depredadores capaces de sintetizar un tipo de veneno mediante el cual pueden llevar a cabo la parálisis de sus presas para alimentarse de ellas. Este veneno es una mezcla de toxinas peptídicas denominadas conotoxinas que actúan sobre receptores celulares específicos asociados con la activación y/o bloqueo de canales iónicos de células excitables. Debido a que existe una gran similitud entre los receptores de las presas de *Conus* y aquellos encontrados en células humanas, un mejor estudio de estas toxinas puede llevar al desarrollo de fármacos que permitan combatir enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central o bien, herramientas moleculares de laboratorio que aporten facilidades para la investigación básica. En este trabajo se llevó a cabo el fraccionamiento y la caracterización de las toxinas mayoritarias más hidrofóbicas e hidrofílicas presentes en el veneno de *C. fergusonii* por medio de las técnicas de RP-HPLC, espectrometría de masas y degradación de Edman, que permitieron la obtención de siete componentes distintos, seis de sus masas moleculares y la secuencia parcial de un componente previamente no descrito.

Palabras clave: *Conus*, conotoxinas, canales iónicos, RP-HPLC.

Abstract

Marine cone snails from the genus *Conus* are predators that synthesize venoms able to paralyze its prey in order to feed from them. This venom is a mixture of peptidic toxins called conotoxins which have an effect over specific cellular receptors associated with the activation and or blockade of ion channels from excitable cells. Due to the similarity between the receptors in *Conus* snails' prey and those found in human cells, a deeper understanding of these toxins would allow the development of drugs to treat diseases that affect the central nervous system or develop compounds that would help research. In this dissertation I purified and characterized the majority of the most hydrophobic and hydrophilic toxins found in the venom of *C. fergusonii* by means of RP-HPLC, mass spectrometry and Edman degradation, which led to the obtainment of seven different components, six of their molecular masses and the partial sequence of a component not previously described.

Keywords: conotoxins, ion channels, RP-HPLC.

I. Introducción

I.1. La importancia de los metabolitos bioactivos de organismos marinos

El océano es considerado la cuna de la vida, por lo que no es una sorpresa que aproximadamente el 80% de las especies del planeta habiten en él (McCarthy & Pomponi, 2004). Esta gran diversidad de especies ha permitido desde tiempos muy remotos que el océano sea una de las principales fuentes de recursos para una gran cantidad de seres vivientes, incluyendo al humano, quién aprendió a utilizarlo para poder cubrir necesidades básicas tales como la alimentación, sus intereses decorativos y la elaboración de remedios contra enfermedades. Éste último punto ha sido posible de abordar debido a que los organismos que habitan el medio marino presentan una gran diversidad de propiedades biológicas, mismas que le han servido a la humanidad para poder llevar a cabo avances importantes dentro del área de la ciencia y que van desde el descubrimiento de las propiedades medicinales y el entendimiento de las bases de la transmisión nerviosa (los calamares y sus axones nerviosos gigantes) hasta un mejor conocimiento molecular de la reproducción celular (con erizos de mar) (Jha *et al.*, 2004). Sin embargo, en las últimas décadas, la farmacología ha cobrado un gran interés en estos organismos marinos debido a su gran diversidad fisiológica y adaptativa, además de que muchos de ellos poseen mecanismos de defensa basados en la síntesis de metabolitos bioactivos (Landa *et al.*, 2013). Estos metabolitos bioactivos ofrecen un vasto potencial para el desarrollo de fármacos de uso terapéutico y en años recientes, un número significativo de metabolitos novedosos con propiedades farmacológicas potentes han sido descubiertos. Sin embargo, el conocimiento total que se tiene respecto a los compuestos que pueden ser extraídos de los organismos marinos aún es muy reducido considerando la dificultad que implica la exploración del medio acuático, motivo por el cual se requiere de un estudio más detallado de los organismos que habitan este ambiente.

I.2. Superfamilia Conoidea

La superfamilia Conoidea está conformada por una variedad de gastrópodos marinos depredadores clasificados en 340 géneros y subgéneros recientes válidos con alrededor de 4,000 especies vivas y 10,000 extintas (Puillandre *et al.*, 2008). Estos organismos presentan una distribución amplia, abarcando principalmente las zonas tropicales y subtropicales en el planeta en profundidades que van desde la zona intermareal hasta los 1,000 m de profundidad (Paredes *et al.*, 2010).

Esta superfamilia solía dividirse en tres familias: Terebridae, Turridae y Conidae de acuerdo a las características morfológicas de sus conchas. Sin embargo, una clasificación más reciente, propuesta por Bouchet *et al.* (2011), basada en estudios filogenéticos (Puillandre *et al.*, 2011) y en las características diagnósticas de cada familia, menciona que la familia Turridae se divide en trece familias polifiléticas: Conorbidae, Borsoniidae, Clathurellidae, Mitromorphidae, Mangeliidae, Raphitomidae, Cochlespiridae, Drilliidae, Pseudomelatomidae, Clavatulidae, Horaiclavidae, Turridae y Strictispiridae, motivo por el cual en la actualidad se consideran quince familias clasificadas dentro de Conoidea.

Los miembros de Conoidea presentan una rádula modificada en varios grados, llegando a la formación de dientes con forma de arpón (rádula toxoglossa), que son almacenados en una estructura conocida como saco radular, localizada cerca de una glándula salival a la mitad del esófago que da origen a un aparato venenoso (Modica & Holford, 2010). Dicho aparato es capaz de sintetizar componentes peptídicos utilizados como mecanismos de defensa y de cacería (Puillandre & Holford, 2010) y está conformado por un bulbo muscular, un conducto venenoso y el saco radular (**Fig. 1**). El bulbo muscular se encarga de la expulsión de componentes bioactivos que son sintetizadas por las células epiteliales del ducto venenoso y la glándula salival hacia la probóscide, lo que permite que la rádula se cargue con veneno (Olivera, 2002; López-Vera *et al.*, 2006; Puillandre & Holford, 2010).

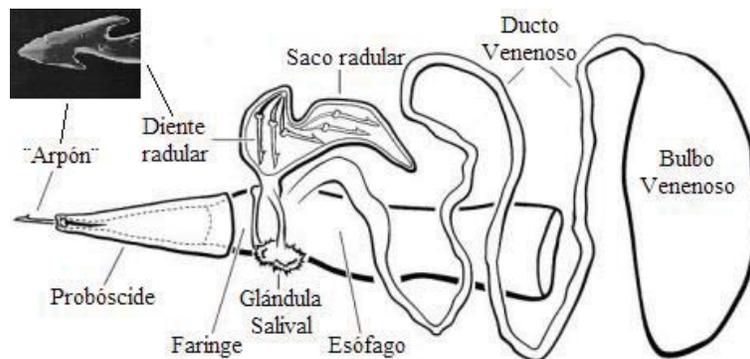


Fig. 1. Estructura anatómica general del aparato venenoso del género *Conus* (modificada de Olivera, 2002).

El mecanismo de envenenamiento se lleva a cabo mediante el posicionamiento de una rádula dentro de la probóscide (estructura que sirve como cordel de pesca) que es disparada debido al incremento de la presión hidrostática y que posteriormente perfora los tejidos de la presa para inyectarle un coctel de neurotoxinas encargadas de afectar su sistema nervioso y muscular, con lo cual la presa queda paralizada y puede ser engullida de manera fácil por el organismo (Kohn *et al.*, 1999; López-Vera *et al.*, 2006).

1.3. Género *Conus*

Los caracoles marinos pertenecientes al género *Conus* son un grupo heterogéneo de gastrópodos carnívoros conocidos por su rápida diversificación, sus venenos extremadamente diversos y la elegancia de sus conchas (Puillandre, *et al.*, 2014). En la actualidad se tiene registro de 969 especies válidas (GBIF, 2017), con una distribución marcada en aguas someras y alrededor de arrecifes de coral en las regiones tropicales de los mares en el mundo (**Fig. 2**), aunque pueden llegar a habitar regiones donde se alcanzan los 1,000 m de profundidad (Paredes, *et al.*, 2010). En los mares de México existen alrededor de 50 especies de *Conus* que habitan distintos ambientes que pueden ir desde fondos arenosos (*C. purpurascens*), rocosos (*C. brunneus*) y lodosos (*C. armiger*) con profundidades menores a los 25m (*C. princeps*) hasta profundidades mayores a 400m (*C. mazei*) (Floeter & Soares-Gomes, 1999; Trussel & Etter, 2001; Olivera, 2002). De acuerdo a los registros fósiles que se tienen, se piensa que los primeros ejemplares del género *Conus* hicieron su aparición hace aproximadamente 60 millones de años (López-Vera *et al.*, 2006), durante el Eoceno temprano en la región que corresponde en la actualidad al continente de Europa (Kohn, 1990).

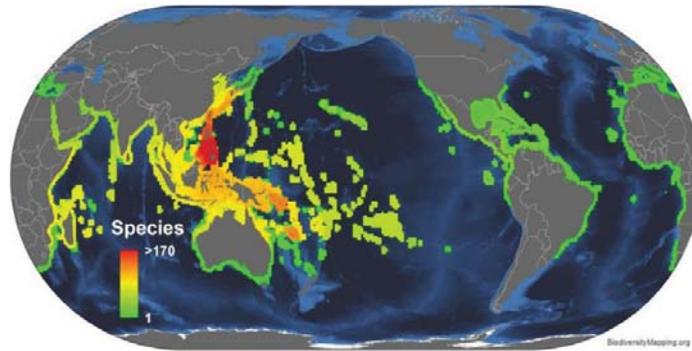


Fig. 2. Distribución y diversidad de especies del género *Conus* en el mundo. Es posible observar una marcada distribución del organismo en las regiones tropicales del mundo (tomado de BiodiversityMapping.org, 2016)

Todos los organismos pertenecientes a este género son depredadores; sin embargo, presentan una gran desventaja relacionada con su movilidad y su velocidad de desplazamiento, por lo que independientemente de su diversidad, todos estos caracoles poseen aparatos sofisticados conformados por una probóscide que les permite albergar y proyectar un diente radular; un conducto venenoso, encargado de llevar a cabo la síntesis de una variedad de neurotoxinas; y un diente radular modificado que funciona como arpón para llevar a cabo la inyección del coctel venenoso encargado de paralizar a sus presas, para así poder alimentarse de ellas. De acuerdo a sus hábitos alimenticios, los conos pueden diferenciarse en tres grupos distintos (**Fig. 3**): aquellos que alimentan de anélidos o gusanos (vermívoros), los que se alimentan de peces (piscívoros) y finalmente, aquellos que se alimentan de moluscos (molusquívoros). Cabe mencionar que de éstos, los vermívoros son los más numerosos, mientras que los molusquívoros son los más escasos y se han observado muy pocos casos de especies que se alimentan de hemicordados y equiueros (Duda *et al.*, 2001; Olivera 2002; Schulz *et al.*, 2004; López-Vera, *et al.*, 2006; Halai & Craik 2009).



Fig. 3. Dietas principales de los caracoles del género *Conus*: 1) dieta vermívora; 2) dieta molusquívoros y 3) dieta piscívora. Foto 1 (tomada de wp.seashell-collector.com/articles/general-articles/conus-regius-conus-cedonulli-feedings-habits/), foto 2 (tomada de molluscs.at), foto 3 (tomada de <https://uk.pinterest.com/pin/156781630747719972/>).

Originalmente los conos marinos fueron objetos de interés debido a la gran variedad estética que exhiben sus conchas, dato que puede trazarse hasta aproximadamente 5,000 años atrás gracias al hallazgo de un collar (**Fig. 4**) en una tumba mesopotámica en Uruk (Terlau & Olivera, 2004). Sin embargo, años después este interés estético fue desplazado debido a que se descubrió que el veneno de *C. geographus* era mortífero para los humanos y que ocasionó varias muertes, de las cuales la primera registrada ocurrió en el año 1705 (Terlau & Olivera, 2004).



Fig. 4. A) Collar de aproximadamente 5,000 años encontrado en una tumba en Uruk, uno de los primeros asentamientos humanos en Mesopotamia; B) conchas de *C. ebraeus* (superior) y *C. parvatus* (inferior); C) conchas de diversos especímenes de izquierda a derecha: *C. marmoreus*, *C. cedonulli*, *C. imperialis*, *C. purpurascens*, *C. magus*, *C. geographus* y *C. gloriamaris* en la parte superior (tomado de Terlau & Olivera, 2004).

Cabe destacar que, como resultado de la alta capacidad que presentaba el veneno de *Conus* para provocar muertes en humanos, en la década de los sesentas, el interés estético que se tenía por estos organismos fue reemplazado por un interés farmacológico (Endean & Izatt, 1965), lo que impulsó la investigación de estos venenos que culminó en la caracterización de las primeras conotoxinas a finales de los setentas (Cruz, *et al.*, 1978; Olivera, *et al.*, 1985). Desde entonces, el estudio de los venenos sintetizados por estos organismos ha incrementado y ha tenido un impacto importante en la ciencia ya que, gracias a éstos, se ha sintetizado un fármaco innovador utilizado para tratar el dolor neuropático (Prialt), mientras que otras conotoxinas que podrían estar relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, están siendo estudiadas (*Anexo I*), además de que han servido como herramientas útiles para la investigación debido a la diversidad de sus blancos farmacológicos (Conticello, *et al.*, 2001; Espiritu *et al.*, 2001; Quik, 2004).

1.4. Conus fergusonii

C. fergusonii (**Fig. 5**) fue descrito por George Sowerby en 1873; los miembros de esta especie son caracoles grandes con tamaños que van de 60 mm a 150 mm, presentan doce o trece giros con la espira ligeramente elevada, un contorno cóncavo en especímenes pequeños, casi recto en especímenes grandes y un hombro angulado de manera aguda en especímenes pequeños, pero menos angulado en los largos. Su estado de conservación actual es de preocupación menor y se distribuye en zonas con profundidades menores a los 200 m a lo largo de las costas de Baja California, México, hasta las costas del norte de Perú y las Islas Galápagos de Ecuador (**Fig. 6**), con una mayor abundancia entre Baja California y Sonora (McLean & Nybakken, 1979; Tenorio, 2013). La alimentación de estos organismos consiste principalmente de poliquetos, por lo que son considerados caracoles vermívoros (McLean & Nybakken, 1979; Sowerby, 1873) y en la actualidad no existen estudios relacionados con los conopeptidos de esta especie (NCBI, 2017).

Clasificación de *C. fergusonii*

Reino	Animalia
Subreino	Bilateria
Infrareino	Protostomia
Superphylum	Lophozoa
Phylum	Mollusca
Clase	Gastropoda Cuvier, 1795
Subclase	Caenogastropoda Milne-Edwards, 1848
Orden	Neogastropoda Wenz, 1938
Superfamilia	Conoidea Fleming, 1822
Familia	Conidae Fleming, 1822
Género	<i>Conus</i> Linnaeus, 1758
Especie	<i>Conus fergusonii</i> Sowerby, 1873

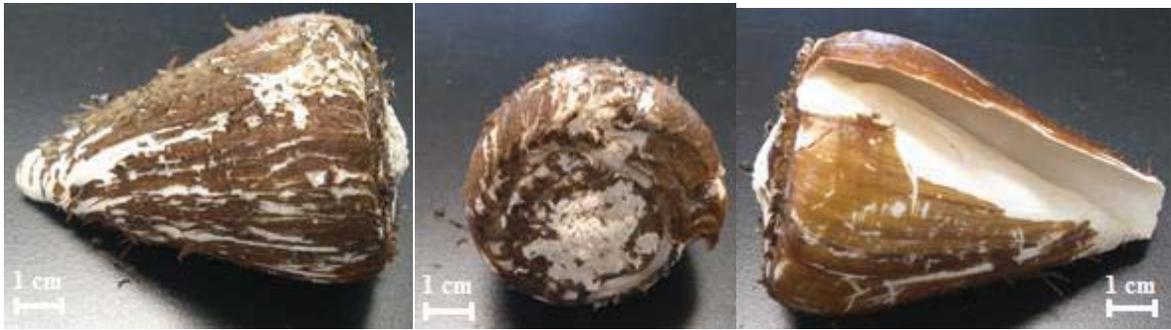


Fig. 5. Fotografías que muestran distintos ángulos de la concha de *C. fergusonii*, procedente de uno de los organismos utilizados en este trabajo.



Fig. 6. Distribución geográfica de *C. fergusonii* (imagen tomada de maps.iucnredlist.org).

II. Antecedentes

II.1. Veneno de *Conus*

II.1.1. Componentes del veneno

El veneno sintetizado por los caracoles del género *Conus* está compuesto por un repertorio de 50 a 200 componentes peptídicos (denominados conotoxinas o conopéptidos) farmacológicamente activos que a su vez pueden estar conformados por 6 a 40 residuos de aminoácidos (López-Vera, 2010). Por lo general las toxinas presentes en el veneno de *Conus* contienen residuos de cisteína (*Cys*) en su estructura primaria. Debido a la gran variedad de péptidos expresados en los organismos pertenecientes a *Conus*, se estima que existen más de 50,000 conotoxinas (cada una codificada por un gen determinado) en su mayoría producto de la diversificación de algunas superfamilias de genes (aproximadamente entre 20 y 30) (Olivera, 1997).

II.1.2. Síntesis del veneno

Las toxinas inicialmente se expresan como precursores de pre-pro-péptidos que posteriormente sufren un proceso de traducción para poder llegar a su forma madura. Cada uno de estos precursores son resultado de un locus que codifica para una toxina de 60 a 120 aminoácidos compuesta por tres regiones (**Fig. 7**): la región pre-, conformada por una secuencia señal de aproximadamente veinte aminoácidos con una tasa de mutación baja, de acuerdo a la cual las toxinas pueden ser clasificadas en superfamilias; la región pro-, que se encuentra en el extremo N-terminal (en ocasiones también en el extremo C-terminal) conformada por 20 a 40 aminoácidos con una tasa de mutación media y finalmente, la región del péptido maduro, conformada por 10 a 30 aminoácidos con una tasa de mutación alta, la cual se plantea que posiblemente puede ser una adaptación relacionada con la presión selectiva que favorece a la sustitución de aminoácidos del péptido maduro y a la diversidad funcional de las conotoxinas (Craig, *et al.*, 1999; Olivera & Cruz, 2001; Sollod, *et al.*, 2005; Kaas, *et al.*, 2010; Aguilar, *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). Sin embargo, para que el péptido alcance su estado funcional, es necesario que las regiones N- y C-terminales sean removidas del péptido por medio de una escisión proteolítica dirigida por la región pro- del péptido en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi además de la modificación postraduccion de aminoácidos si es que la presenta (Terlau & Olivera, 2004; Sollod, *et al.*, 2005; Kaas, *et al.* 2010), como se muestra en la (**Fig. 8**)



Fig. 7. Representación de la estructura general del precursor de la conotoxina *SmIVA* de *C. stercusmuscarum* (Santos *et al.*, 2004). Formada por la secuencia señal o región pre- (negro), las regiones pro- (azul) y el péptido maduro (naranja).

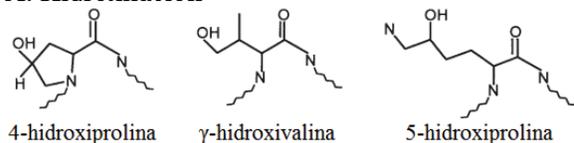


Fig. 8. Esquemización del proceso de maduración de un conopeptido: 1) los genes de los conopeptidos son transcritos a una secuencia de ARNm; 2) las secuencias de ARNm se traducen a precursores proteicos; 3) los precursores atraviesan una serie de pasos de maduración que incluyen la escisión sucesiva de la secuencia señal, la escisión de las regiones pro- del precursor y la modificación postraduccional de sus aminoácidos, dentro de las cuales destaca la formación de puentes disulfuro; 4) los péptidos se pliegan para adquirir una estructura tridimensional que les confiere su actividad biológica, lo que les permite actuar sobre sus receptores blanco en la presa (Modificada de Kaas, 2010).

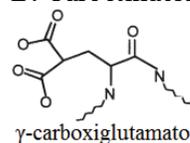
II.1.3. Modificaciones postraduccionales

Las conotoxinas encontradas en las especies del género *Conus* tienen una alta similitud entre sí, especialmente en el arreglo que presentan los residuos de Cys del péptido maduro y en las secuencias conservadas de la región pre, como se mencionó con anterioridad. Sin embargo, la alta diversidad que existe entre las regiones no conservadas se debe en parte a la tasa de mutación de la región y a la gran cantidad de modificaciones pos-traduccionales mediadas por maquinarias enzimáticas altamente especializadas llevadas a cabo en el retículo endoplásmico una vez que el péptido precursor es liberado del ribosoma (Buczek *et al.*, 2005). Una de las modificaciones pos-traduccionales más frecuentes es la formación de enlaces disulfuro, pero existen otro tipo de modificaciones (*Anexo 2 y Fig. 9*), entre las que destacan la conversión del glutamato a γ -carboxiglutamato, la hidroxilación de la prolina a 4-hidroxiprolina y la amidación de la región C-terminal (Kaas *et al.*, 2010). No todas las funciones de estas modificaciones se conocen, sin embargo se piensa que los enlaces disulfuro le permiten al péptido tener una estructura tridimensional estable y pueden estar involucrados en la afinidad y especificidad que tiene el péptido por sus blancos moleculares (Hopkins *et al.*, 1995).

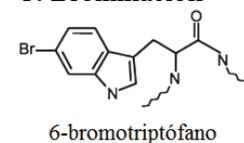
A. Hidroxilación



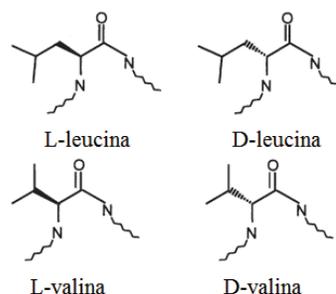
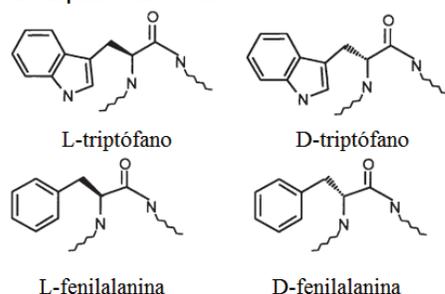
B. Carboxilación



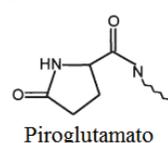
C. Brominación



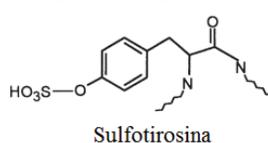
D. Epimerización



E. Ciclación del Gln N-terminal



F. Sulfatación



G. O-glicosilación

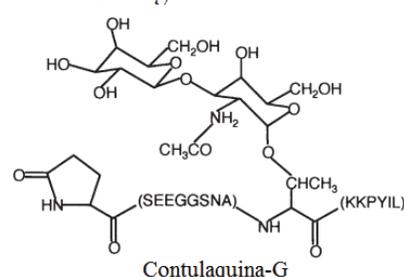


Fig. 9. Ejemplos de modificaciones postraduccionales de aminoácidos en péptidos sintetizados por *Conus* (modificada de Buczek, *et al.*, 2005).

II.1.4. Conotoxinas y conopéptidos

Una de las características de las toxinas del veneno de *Conus* es que existen algunas que contienen una gran cantidad de residuos de Cys, mientras que otras carecen de ellos, hecho que hace posible dividir a las toxinas del veneno de *Conus* en dos grupos: aquellas toxinas ricas en enlaces disulfuro, denominadas conotoxinas y aquellas que poseen uno o ningún puente disulfuro, denominadas conopéptidos (**Fig. 10**). Las conotoxinas por lo general forman enlaces disulfuro entre sus residuos, lo que les confiere una termo estabilidad incluso a temperaturas de hasta 100°C y pueden presentar 25 patrones de arreglos de Cys distintos, lo que permite su clasificación de acuerdo al arreglo de Cys que presenten (**Anexo 3**), mientras que los conopéptidos se pueden agrupar en ocho subdivisiones: las contulaquinas, las conantoquinas, las conorfamidas, las conolisinas, los conofanos, las conomarfinas, los contrifanos y las conopresinas (Balaji *et al.*, 2000; Conticello *et al.*, 2001; Halai & Craik, 2009; Olivera, 2002; Robinson *et al.*, 2014).

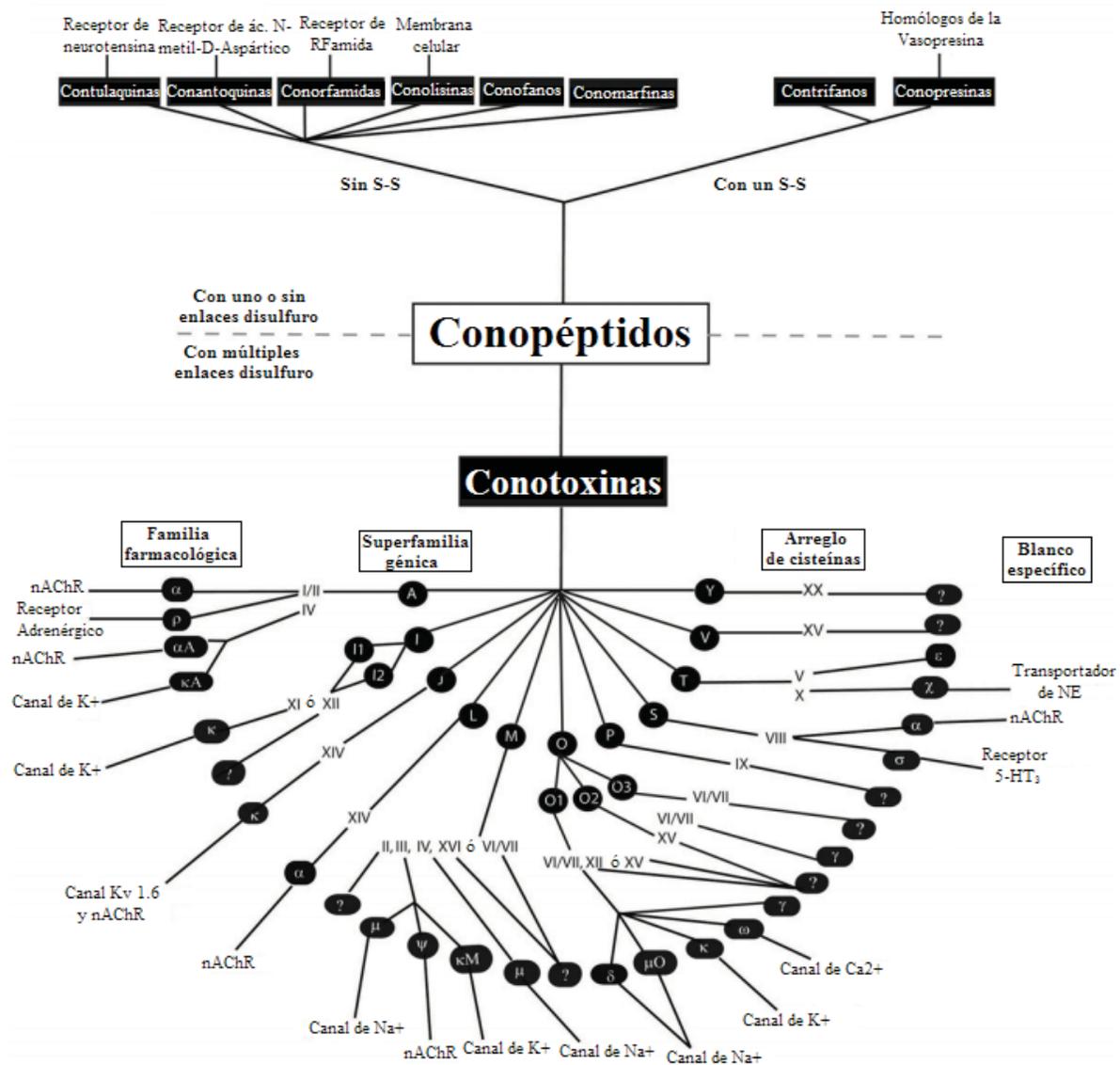


Fig. 10. Clasificación de toxinas de acuerdo a la presencia de enlaces disulfuro, su superfamilia génica, el arreglo de Cys, la familia farmacológica y el blanco específico (Modificado de Halai & Craik, 2009).

II.1.5. Clasificación y nomenclatura de conotoxinas

En la actualidad las conotoxinas son clasificadas de tres maneras (*Anexo 4* y *Fig. 10*): la primera se basa en la categorización y la similitud entre las secuencias señal de sus precursores que conforman a 27 superfamilias génicas distintas; la segunda se basa en los distintos patrones de Cys presentes en las regiones del péptido maduro (*Anexo 3*) y la tercera se basa en los blancos farmacológicos específicos de los péptidos (familias farmacológicas) (Kaas, *et al.*, 2010).

II.1.6. Farmacología y fisiología

Las conotoxinas exhiben una variedad de mecanismos de acción y tienen una alta especificidad por sus blancos moleculares, que incluyen a los canales iónicos activados por ligando, como los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh) (López-Vera, 2010); canales iónicos dependientes de voltaje, como los canales de Ca^{++} (Olivera *et al.*, 1994) e incluso algunos receptores acoplados a proteínas G (Adams *et al.* 2012). Esto resulta importante debido a que la acción conjunta de dichas conotoxinas sobre sus blancos específicos puede contribuir a la inmovilización de la presa del organismo (Terlau & Olivera, 2004).

Por si fuera poco, las toxinas del veneno de los cónidos tienen un efecto sinérgico debido a que son capaces de formar grupos que actúan de manera coordinada y secuencial, conocidos en inglés como “*toxin cabals*”, para producir la inmovilización de la presa. En un organismo determinado puede existir más de una de estas agrupaciones dependiendo de las estrategias de captura de la presa y por lo general siguen un orden determinado (Terlau & Olivera, 2004). La primera fase, consecuencia de la actividad de una primera agrupación conocida en inglés como “*lighting strike cabal*”, consiste en la inmovilización inmediata de la presa inyectada mediante la inhibición de canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, lo que resulta en una despolarización masiva de las células excitables en la cercanía del sitio de inyección que genera un efecto similar a la electrocución que le permite al caracol aturdir a su presa. La segunda fase se lleva a cabo de manera más lenta e involucra la inhibición absoluta de la transmisión neuromuscular a través de los conopéptidos que conforman a la segunda agrupación, conocida en inglés como “*motor cabal*”, que actúan en sitios lejanos al sitio de inyección, como uniones neuromusculares en donde inhiben RnACh y canales de Ca^{++} presinápticos involucrados en la liberación de neurotransmisores, lo que puede provocar la inmovilización muscular. Cabe destacar que los efectos del choque excitotóxico siempre preceden a los de la inmovilización muscular para evitar la superposición de sus efectos, ya que los efectos de una agrupación podrían interferir con los efectos de la otra (Olivera, 2002).

Considerando la gran cantidad y la variedad de blancos moleculares de los componentes en el veneno de *Conus*, éstos no pueden ser estudiados en conjunto si se desea conocer el blanco específico de cada uno, motivo por el cual es necesario dividir al veneno en fracciones más pequeñas de donde puedan ser extraídos los componentes principales, para así poder dilucidar sus propiedades individuales, lo que a su vez requiere de la asistencia de experimentos biológicos, técnicas químicas analíticas y técnicas electrofisiológicas, entre otras, que puedan permitir la caracterización de los componentes.

II.2. Técnicas de separación y análisis de laboratorio

II.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

La técnica de RP-HPLC involucra la separación de moléculas de acuerdo a su hidrofobicidad. La separación depende de que se lleve a cabo la adsorción hidrofóbica de las moléculas del soluto de la fase móvil a los ligandos inmóviles adheridos a la fase estacionaria (adsorbente) como se muestra en la *Fig. 11*.

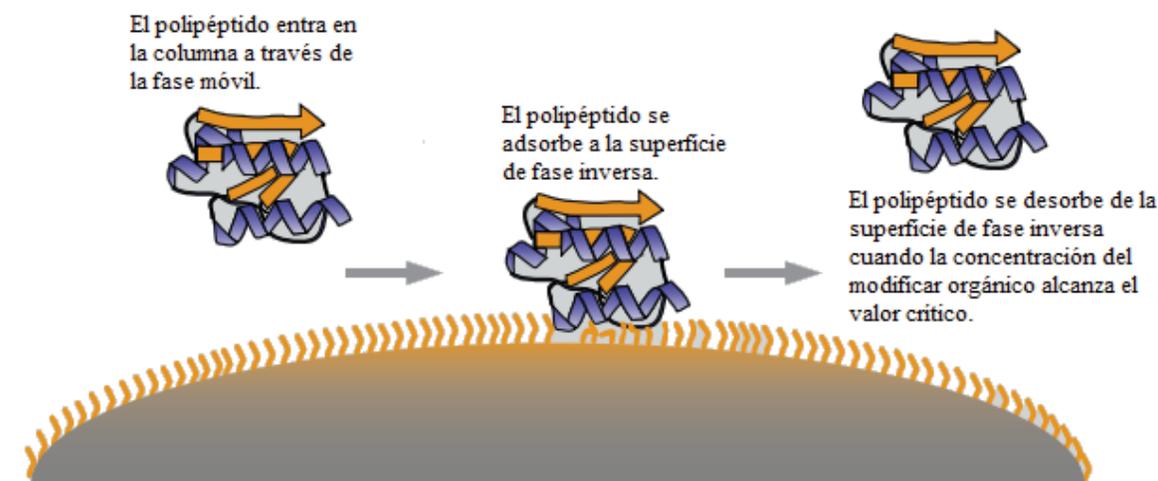


Fig. 11. Se muestran los sucesos que ocurren durante la elución de un componente en RP-HPLC. En primera instancia, el polipéptido entra a la columna a través de la fase móvil. Después, el "pie" hidrofóbico del polipéptido se adsorbe a la superficie hidrofóbica del material de fase inversa, en donde permanece hasta el momento en que la concentración del modificador orgánico alcance una concentración mayor que permita la desorción del polipéptido (modificada de Carr & Nguyen, 2013).

El sistema experimental de la RP-HPLC para el análisis de péptidos y proteínas por lo general consiste en un adsorbente de *n*-alquilsilica en el cual los solutos son eluidos con gradientes que incrementan las concentraciones de solventes orgánicos como el acetonitrilo (ACN), en conjunto con un modificador iónico como el ácido trifluoroacético (TFA) (Aguilar *et al.*, 1996; Mant *et al.*, 1996). De esta manera, mezclas complejas de péptidos y proteínas pueden ser separadas de manera rutinaria y pueden ser recolectadas para caracterizaciones posteriores. Las separaciones pueden ser manipuladas de manera fácil a través de la modificación de la curva del gradiente, la temperatura de operación, el modificador iónico o la composición del solvente orgánico.

En un principio, el soluto en la fase móvil se aplica al agente adsorbente (fase estacionaria) en presencia de amortiguadores líquidos y es eluido cuando a ésta última se le aplica un solvente orgánico; la elución puede proceder ya sea en condiciones isocráticas, en donde la concentración del solvente orgánico es constante, o por gradiente, en donde la cantidad del solvente orgánico es incrementada a lo largo de cierto período de tiempo. De este modo, los solutos son eluidos de acuerdo a su hidrofobicidad molecular.

Es así que la RP-HPLC representa una poderosa herramienta que puede ser utilizada cuando se desea llevar a cabo el análisis de péptidos y proteínas por una cantidad de factores diversos como son: la excelente resolución que puede ser adquirida bajo un amplio rango de condiciones cromatográficas para moléculas muy similares así como para moléculas muy distintas; la facilidad experimental con la que la selectividad cromatográfica puede ser manipulada a través de cambios en las características de la fase estacionaria; la tasa de recuperación y productividad altas que involucra, y la excelente reproducibilidad de separaciones repetitivas llevadas a cabo a lo largo del tiempo, que se debe en parte a la estabilidad de los materiales adsorbentes que son expuestos a un amplio rango de condiciones en la fase móvil (Aguilar *et al.*, 1996; Mant *et al.*, 1996). Sin embargo, el RP-HPLC puede provocar desnaturalizaciones irreversibles de muestras proteicas, lo que reduce el potencial de recuperación de material biológico en su forma activa y el uso extensivo de la RP-HPLC para la purificación de pequeños polipéptidos con pesos moleculares de hasta 10 kDa y compuestos de interés farmacéutico no han logrado ser replicados en el mismo grado que polipéptidos más grandes, con masas moleculares mayores de los 10 kDa y proteínas globulares.

II.2.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas es una técnica necesaria utilizada antes de llevar a cabo el procesamiento de muestras de proteínas para su aislamiento, separación y/o análisis mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas e inmunoquímicas. Dependiendo de la exactitud requerida y la cantidad y pureza de la proteína disponible, diferentes métodos son apropiados para determinar la concentración de proteína (Twyman, 2014); el método más sencillo para cuantificar proteínas en solución se realiza a través de la medición de su absorbancia a un coeficiente de extinción de 280 nm (rango UV). Otros métodos utilizados en el análisis de aminoácidos por HPLC son: el marcaje de las aminas primarias (es decir, el extremo N-terminal y la cadena lateral de residuos de lisina) con un colorante o fluorescente tal como la ninhidrina o el o-ftaldialdehído (OPA), o la adición de proteína a un reactivo que produce un cambio de color en proporción a la cantidad de proteína añadida, cuya concentración se determina con referencia en una curva estándar basada en concentraciones conocidas de una proteína de referencia purificada (Twyman, 2014). Cabe destacar que cada método presenta ventajas y desventajas respecto a los demás dependiendo el tipo de análisis que se desee llevar a cabo, por lo que es importante tener presente los motivos de su uso.

II.2.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica utilizada para identificar compuestos desconocidos y para dilucidar la estructura y las propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades muy pequeñas de muestra (algunos pmoles) para obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para lograr su ionización, lo que permite que sean separadas por campos eléctricos y/o magnéticos para después ser analizadas. De este modo, un espectro de masas brinda información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga (m/z) de cada uno de ellos (Watson, 1997).

El método utilizado en este trabajo es conocido como espectrometría de masas de ionización por electronebulización (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés ESI-MS), que involucra una técnica de ionización "suave", ampliamente utilizada para llevar a cabo la identificación de las masas moleculares de compuestos biológicos en cantidades pequeñas, que disminuye el número de fragmentaciones que ocurren en la molécula, en ocasiones evitándola por completo, lo que permite evitar la desnaturalización de la muestra para conservar su actividad biológica.

El proceso general de la ESI (**Fig. 12**) consiste en la disolución de la muestra en un solvente polar y volátil que posteriormente es bombeado a través de un capilar estrecho de acero inoxidable (75 – 150 μm) con un flujo entre 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 1 mL/min . A continuación, a la punta del capilar se le aplican de 3 – 4 kV de voltaje que permiten la formación de una gota de muestra eléctricamente cargada. A medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota que emerge del capilar adquiere la forma de un cono, conocida como *cono de Taylor*, debido a que las fuerzas del campo eléctrico superan a las de la tensión superficial de la gota (Taylor, 1964). Conforme incrementa la fuerza de repulsión entre las cargas eléctricas del cono, la muestra se dispersa en un aerosol de gotas cargadas con la ayuda de un gas nebulizante que fluye alrededor del exterior del capilar (por lo general nitrógeno), que a la vez ayuda a que el aerosol que emerge del capilar sea dirigido hacia el espectrómetro de masas. Posteriormente, las gotas cargadas disminuyen de tamaño gracias a la evaporación del solvente, favorecida por un flujo cálido de nitrógeno (gas desecante) que pasa en el frente de la fuente de ionización, lo que incrementa la carga del campo eléctrico en la superficie de la gota, provocando que las fuerzas repulsivas de las cargas excedan la tensión superficial del líquido, punto conocido como *límite de Rayleigh* (Fotiadis *et al.*, 2003). El suceso anterior culmina en el estallido de la gota para formar gotas más pequeñas, en un suceso conocido como *fisión de Coulomb*, que se repite hasta que las gotas son de tamaños tan pequeños, que los analitos ionizados finalmente son liberados hacia la fase gaseosa. Posteriormente, los analitos de la muestra ionizados son repelidos por las cargas positivas de la cámara de la ionización y son acelerados a través de un cono de muestreo para llegar a una cámara de vacío que conduce al analizador del espectrómetro (Yamashita & Fenn, 1984; Ashcroft, 1997; Banerjee & Mazumdar, 2011).

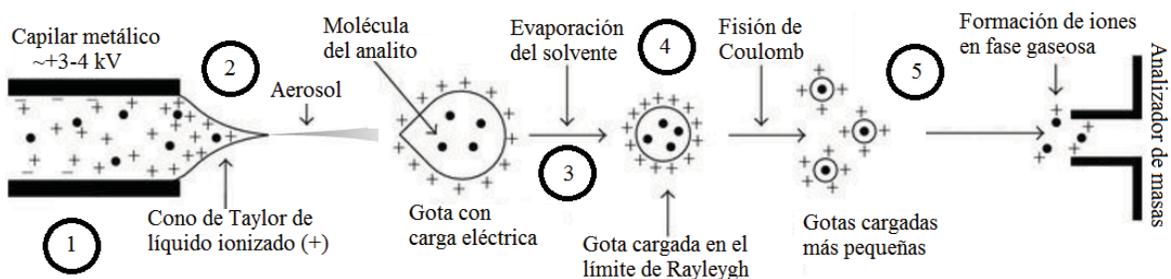


Fig. 12. Representación esquemática del proceso de ionización por electro spray: 1) la muestra con el analito es bombeada a través de un capilar metálico a cuya punta se le aplica voltaje; 2) la muestra que emerge de la punta del capilar, auxiliada por un gas nebulizante, es pulverizada para formar un aerosol con gotas eléctricamente cargadas que contienen al analito de interés; 3) la exposición a un gas desecante disminuye el tamaño de las gotas; 4) cuando las fuerzas repulsivas de las cargas alcanzan el límite de Rayleigh, ocurre la fisión de Coulomb; 5) la fisión de Coulomb se repite hasta que las gotas son tan pequeñas que los analitos ionizados son liberados hacia la fase gaseosa y pasan por un orificio que los dirige hacia el analizador de masas (modificada de Banerjee & Mazumdar, 2011).

Existen diversos tipos de analizadores de masa (tiempo de vuelo, cuadrupolo y trampas iónicas, entre otros), cada uno con características específicas que pueden ser utilizadas para llevar a cabo la separación de todos los analitos presentes en una muestra en un análisis global, o para desviar iones específicos hacia el detector. De manera general, el funcionamiento de los analizadores consiste en la exposición de los analitos ionizados a un campo eléctrico y/o magnético que los desvía de sus trayectorias originales (**Fig. 13**); el grado de desviación depende de la masa del ion, por lo que los iones más ligeros son desviados más que aquellos con masas mayores. Esto a su vez indica que los iones que tengan dos o más cargas positivas serán desviados en un mayor grado debido a que poseen una cantidad menor de electrones (Watson, 1997).

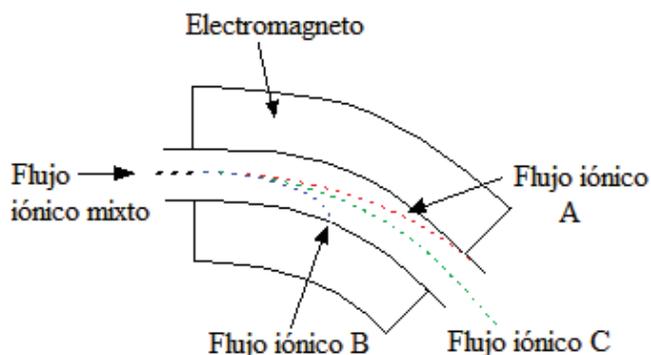


Fig. 13. Diagrama de la desviación de flujos iónicos expuestos a un campo electromagnético. El flujo iónico A se desvía más debido a que contiene iones con la relación m/z más pequeña; el flujo iónico B presenta una desviación intermedia y el flujo iónico C sufre la menor desviación por estar conformada de iones con una relación m/z más grande.

Sin embargo, los analizadores más utilizados son los de tipo *orbitrap* (**Fig. 14**), debido a que son capaces de funcionar como analizadores y detectores muy sensibles al mismo tiempo, lo que permite la obtención de espectros de resoluciones muy altas. El funcionamiento general de estos analizadores consiste en la captura de los iones entre dos electrodos: uno interno, alrededor del cual oscilan los iones, y uno externo, que permite obtener la relación m/z de los iones a partir de las frecuencias oscilatorias y las trayectorias que exhiben para posteriormente ser amplificadas y convertidas en señales digitales (Hu *et al.*, 2005).

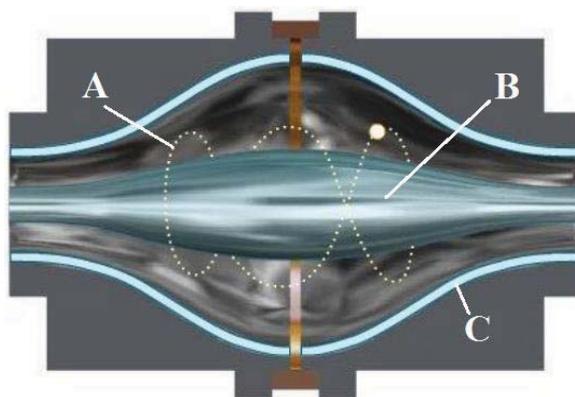


Fig. 14. Estructura general de un analizador de masas de tipo orbitrap. Se muestra A) la trayectoria del analito; B) el electrodo interno y C) el electrodo externo (modificada de chromacademy.com).

II.2.4. Secuenciación

El análisis de la secuencia de aminoácidos por degradación de Edman ha sido una de las técnicas más utilizadas para la determinación *de novo* de péptidos y proteínas debido a su alta sensibilidad. La secuenciación automatizada utiliza el reactivo de Edman (fenilisotiocianato o PITC), que reacciona con el extremo N-terminal de un polipéptido en condiciones ligeramente alcalinas para formar un aducto feniltiocarbamilo (PTC). Posteriormente, este producto se trata con TFA, que corta el residuo N-terminal y genera un derivado de tiazolinona sin hidrolizar otros enlaces peptídicos. La tiazolinona-aminoácido se extrae de manera selectiva mediante el uso de un solvente orgánico que permite su conversión al derivado feniltiohidantoína (PTH), el cual es posible identificar mediante HPLC (Voet *et al.*, 2009). Una vez que el proceso ha sido realizado, este se repite de nuevo, lo que permite llevar a cabo la determinación de una secuencia de 30 a 40 residuos de aminoácidos en una operación continua. Sin embargo, este método presenta ciertas limitaciones en términos de la longitud de la cadena que puede secuenciar y respecto a los aminoácidos con los que puede formar derivados sin dificultad. Por consiguiente, es necesario fragmentar una proteína de gran tamaño en fragmentos más pequeños para poder llevar a cabo la rutina; esto se lleva a cabo mediante el uso de reactivos químicos como el bromuro de cianógeno, capaz de romper la cadena de aminoácidos en la metionina, o a través del uso de enzimas como la tripsina, proteasa intestinal capaz de romper enlaces peptídicos de una cadena de aminoácidos en el extremo C-terminal de aminoácidos básicos (lisinas y argininas) (Bailey *et al.*, 1999).

II.2.5. Alineamiento de secuencias

Existen dos aproximaciones computacionales principales para lograr este propósito: una aproximación bioinformática y una aproximación basada en la simulación atómica de las dinámicas moleculares. La bioinformática se basa en el análisis estadístico de las secuencias proteicas y sus estructuras para entender su función, para predecir las estructuras que pueden adquirir a partir de secuencias y para facilitar la anotación de genomas, mientras que el modelaje molecular y las simulaciones de dinámicas moleculares se basan en los principios de la física y la fisicoquímica para estudiar el funcionamiento y el plegamiento de proteínas (Berman *et al.*, 2000). De este modo, los métodos bioinformáticos son considerados dentro de las herramientas más poderosas en las ciencias biológicas hoy en día ya que, son utilizadas en investigaciones fundamentales relacionadas con teorías evolutivas y diseño proteico.

Dentro de las aproximaciones bioinformáticas, el alineamiento de secuencias es un paso crucial en cualquier análisis donde se busca dilucidar relaciones evolutivas y/o en donde se busca extraer la información estructural respecto a una secuencia de aminoácidos ya que permite la localización de secuencias similares que en algunos casos podrían ser homólogas (Berman *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2003). Este proceso consiste en el acomodo de dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos diferentes de acuerdo a las coincidencias que presentan para determinar su grado de similitud y, hoy en día, gracias a los avances de la bioinformática, los programas para llevar a cabo los alineamientos generan estimados estadísticos muy certeros, que en ocasiones permiten conocer el grado de similitud de dos o más proteínas, el grado de homología que presentan y la posibilidad de que compartan un ancestro en común (Pearson, 2013).

III. Justificación

El descubrimiento de las propiedades bioactivas de las toxinas de *Conus* ha permitido el desarrollo de herramientas para la investigación en el estudio de la función de canales iónicos, el conocimiento sobre diversos tipos de interacción que existen con los receptores y ha proporcionado fuentes prometedoras para la elaboración de fármacos que pueden ser de utilidad en el tratamiento de distintos tipos de enfermedades asociadas con el sistema nervioso central como la epilepsia y el alzheimer, entre otras. En la actualidad en México se conocen 50 especies pertenecientes al género *Conus*, de las cuales no existen muchos estudios relacionados con sus toxinas. De este modo resulta de asaz importancia explorar este campo de conocimiento, ya que en la actualidad se conocen alrededor de 2000 conotoxinas a nivel mundial y considerando que se conocen alrededor de 900 especies con un promedio de 100 toxinas por espécimen, este número podría llegar a elevarse hasta 90,000 toxinas, por lo que se tiene conocimiento menor al 1%. De este modo, se aprecia que aún queda mucho campo de estudio y que se requiere de una labor más extensa que podría llevar al descubrimiento de fármacos novedosos, a un entendimiento mayor respecto a la evolución de estos organismos y a la generación de herramientas que impulsen a la investigación. Por lo tanto, el estudio y la caracterización química de los componentes del veneno de *Conus* es una tarea que no debe detenerse.

IV. Hipótesis

Las estructuras primarias de los péptidos mayoritarios más hidrofóbicos e hidrofílicos serán similares a las de conotoxinas conocidas involucradas en el choque excitotóxico y/o la inhibición de la transmisión neuromuscular.

V. Objetivos

V.1. Objetivo general

Purificar y determinar la estructura química de algunos péptidos aislados del veneno de *Conus fergusonii*.

V.2. Objetivos particulares

- Purificar los péptidos más hidrofílicos e hidrofóbicos del extracto crudo del veneno de *C. fergusonii*.
- Determinar la masa molecular de los péptidos purificados.
- Determinar la estructura primaria de los péptidos.
- Comparar a los componentes caracterizados con péptidos registrados en bases de datos.

VI. Material y equipo de laboratorio

VI.1. Material Biológico

Dos caracoles de la especie *Conus fergusonii* fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa como donación por parte de la Dra. Mónica Anabel Arellano en el mes de marzo del 2015. Posteriormente, los caracoles fueron congelados a -70°C en un ultra congelador hasta su traslado al laboratorio de Toxinología Marina en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, en donde se congelaron a -70°C hasta ser utilizados.

VI.2. Equipo de laboratorio

VI.2.1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Cromatógrafo *Agilent Technologies 1260 Infinity* con un espectrofotómetro de flujo UV ajustado a una longitud de onda de 220 nm y una columna analítica *Vydac 218TP* de 5μ de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro y un tamaño de 4.6×250 mm.

VI.2.2. Espectrofotómetro

Espectrofotómetro *NanoDrop 2000/2000c* utilizado para llevar a cabo la cuantificación de proteína a una absorbancia de 280 nm.

VI.2.3. Liofilizadora

Centrífuga evaporadora *Thermo Savant SPD1010* utilizada para llevar las muestras obtenidas a sequedad por sublimación.

VI.3. Reactivos

VI.3.1. Acetonitrilo

El acetonitrilo (ACN) es utilizado para disminuir la polaridad de la fase móvil, presenta una viscosidad baja y no absorbe luz UV a diferencia de otros disolventes como el isopropanol (Carr & Nguyen, 2013), motivo por el cual fue elegido como solvente de elución.

VI.3.2. Ácido Trifluoroacético

El ácido trifluoroacético (TFA) es el agente más utilizado para la supresión de cargas en péptidos debido a que el control del *pH* es el parámetro más importante en este tipo de cromatografía, ya que la retención aumenta conforme el *pH* maximiza la concentración de la forma iónica de los solutos. Un *pH* bajo asegura que las bases fuertes estén en su forma iónica protonada y que los ácidos débiles presentes estén en su forma no iónica. La fase móvil es preparada generalmente con TFA para mantener el *pH* cercano a tres.

El mayor beneficio de los *pH* bajos usados en la cromatografía de supresión iónica es la eliminación del efecto de modo mixto que genera un incremento en el tiempo de retención y un ensanchamiento de la señal del componente en el perfil cromatográfico. Sin embargo, el método de supresión iónica está limitado a un intervalo de *pH* de 3.0 a 7.5 debido a la inestabilidad de las fases estacionarias fuera de este intervalo de *pH*. Cabe mencionar que el TFA es volátil y es posible removerlo de las fracciones obtenidas con facilidad y presenta una baja adsorción de rayos UV en longitudes de onda bajas (Carr & Nguyen, 2013).

VII. Métodos

VII.1. Aislamiento del conducto venenoso

Se utilizaron dos caracoles pertenecientes al género *Conus fergusonii* de nueve cm de largo para realizar este estudio, cuyos conductos venenosos fueron removidos a través de la ruptura mecánica de las conchas para realizar su disección.

VII.2. Extracción del veneno crudo

Se colocaron dos conductos venenosos en 10 mL de solución de extracción de proteínas (40% v/v ACN y 2% v/v ácido TFA) y se maceraron con un homogeneizador de tejidos Biospec (Tissue Tearor) en un tubo cónico de 15 mL. La solución obtenida se centrifugó a 12,000 g por quince minutos y después se separó y etiquetó al sobrenadante (veneno) y al precipitado. Ambas fracciones se almacenaron a -70°C.

VII.3. Separación de los componentes del veneno

La separación de las conotoxinas se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) en el laboratorio de Toxinología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la UNAM utilizando un equipo *Agilent Technologies 1260 Infinity* con una solución de TFA al 0.1% v/v (solución A) y una solución de TFA al 0.085% con ACN al 90% v/v (solución B). Para llevar a cabo la purificación se utilizó una columna analítica *Vydac 218TP C18* de 5 μ de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro y un tamaño de 4.6 x 250 mm. Los péptidos se eluyeron a temperatura ambiente con un gradiente de solución B de 5% - 100% en 95 minutos (en donde B incrementaba 1% por minuto) con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 1 mL. La detección de péptidos se realizó con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm de longitud de onda y posteriormente, los componentes mayoritarios se recolectaron manualmente en tubos de polipropileno de 1 mL y se sometieron a varios pasos de RP-HPLC, con programas de elución distintos, hasta lograr su purificación para después ser liofilizados con una centrífuga evaporadora *Thermo Savant SPD1010*.

VII.4. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína se llevó a cabo en el ICMyL de la UNAM a través del método conocido como A280 con un espectrofotómetro *NanoDrop 2000/2000C*.

VII.5. Caracterización química

VII.5.1. Espectrometría de masas

La determinación de las masas teóricas de los componentes purificados utilizados para este trabajo se realizó a través de la técnica de ionización mediante rocío de electrones o (por sus siglas en inglés ESI) en el laboratorio de Proteómica del IBT de la UNAM en Cuernavaca, Morelos a cargo del Dr. César Batista utilizando un equipo *LTQ Orbitrap Velos* con trampa de iones lineal de presión doble.

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621. Estos compuestos son utilizados para calibrar el módulo *LTQ Velos* con trampa de iones y el módulo *Orbitrap* con detector de masas FT (Fourier Transform) en el modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para poder llevar a cabo determinaciones con exactitudes menores a 5 ppm.

En el sistema de cromatografía de líquidos (LC) se utilizó un programa isocrático de 50/50 de ACN con 0.1% de ácido fórmico (solución B) y una solución al 0.12% de ácido fórmico (solución A) utilizando una aguja capilar para la inyección directa (hecha en casa). La masa molecular de cada muestra se obtuvo mediante el procesamiento de datos a través del algoritmo de deconvolución automática (Xtract rawfile), generate masses mode (M).

VII.5.2. Secuenciación

La determinación de las estructuras primaria de los péptidos se llevó a cabo en el laboratorio a cargo del emérito Dr. Lourival Possani utilizando un secuenciador automático de proteínas *ProCise 491 Protein Sequencing System, Applied Biosystems*, bajo el principio de la degradación de Edman.

VII.5.3. Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias se realizó a través de los servicios bioinformáticos *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990) y *ConoPrec* (Kaas *et al.*, 2008; Kaas *et al.*, 2012), ambos servicios gratuitos en internet, con el fin de comparar las secuencias obtenidas con las secuencias reportadas en bases de datos.

VIII. Diseño experimental



Fig. 15. Esquema del diseño experimental planteado para este trabajo.

IX. Resultados

IX.1. Fraccionamiento del extracto crudo de *C. fergusonii*

El extracto crudo proveniente de los dos conductos venenosos de *C. fergusonii* se dividió en nueve tubos de polipropileno de 1 mL que habían sido etiquetados numéricamente del uno al nueve. Cada uno de estos tubos se sometió a un proceso de RP-HPLC, lo que resultó en la obtención de nueve fracciones por tubo (81 tubos en total), etiquetadas como F0 a F8. Dichas fracciones se colectaron cada diez minutos, con excepción de F0, cuya colecta fue llevada a cabo durante un lapso de cinco minutos (**Fig. 16**). Posteriormente, los tubos que contenían a las fracciones F1 y F4 se separaron del resto y fueron llevados a condiciones de sequedad para después ser concentrados en dos tubos de polipropileno etiquetados como F1 y F4 respectivamente (**Fig. 17**). Por último, a ambos tubos se les agregó solución de extracción hasta alcanzar 1 mL de volumen para llevar a cabo la cuantificación de proteína en las muestras. Cabe destacar que se eligieron los tubos procedentes de las fracciones F1 y F4 debido a que se deseaba analizar a los componentes más hidrofílicos e hidrofóbicos del veneno.

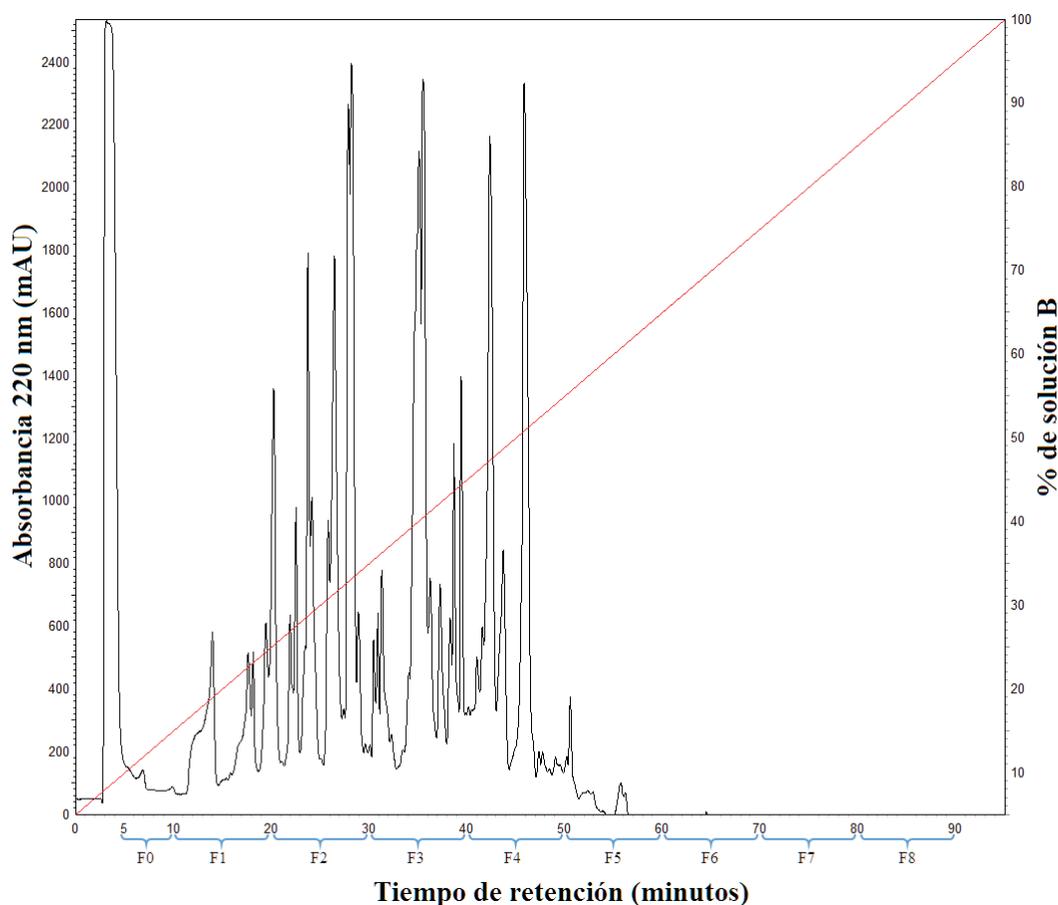


Fig. 16. Perfil cromatográfico del veneno de *C. fergusonii* a una longitud de onda de 220 nm con un gradiente lineal de 5% a 100% de solución B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min (línea roja). Los corchetes (color azul) indican el tiempo de colecta de cada fracción, enumeradas de F0 a F8, iniciando la colecta a partir del minuto 5 al 10 para la F0 y la colecta de cada fracción subsecuente por 10 minutos.

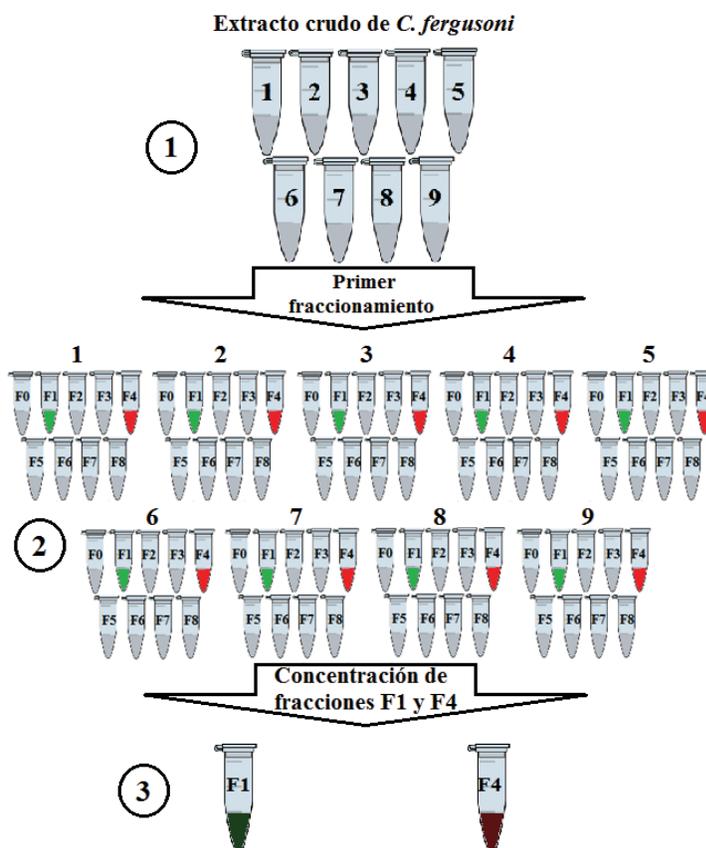


Fig. 17. Esquematación del fraccionamiento del extracto crudo de *C. fergusonii*: 1) el extracto crudo fue dividido en nueve tubos que se sometieron a procesos de RP-HPLC de manera individual; 2) de cada proceso, se obtuvieron nueve fracciones etiquetadas como F0 a F8 de acuerdo a su tiempo de elución; 3) la totalidad del contenido de todos los tubos F1 (color verde claro) procedentes de los nueve fraccionamientos fue liofilizada y concentrada en un tubo y el mismo procedimiento se repitió para los tubos etiquetados como F4 (color rojo claro), lo que resultó en la obtención de dos tubos con los componentes más hidrofóbicos (F1, de color verde oscuro) e hidrofílicos (F4, de color rojo oscuro) del extracto crudo.

IX.2. Cuantificación de proteínas de F1 y F4

Para llevar a cabo la cuantificación de proteína presente en las fracciones F1 y F4, se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop 2000/2000C* ajustado a una lectura de absorbancia de 280 nm para medir su concentración proteica, con lo que se determinó que F1 y F4 contenían 2.5 mg/mL y 2.7 mg/mL respectivamente.

IX.3. Subfraccionamiento de F1 y F4

Para separar los componentes de las subfracciones F1 y F4, su contenido fue dividido en cinco y ocho alícuotas respectivamente (etiquetadas como tubos A – E, provenientes de F1 y F – M, provenientes de F4) con la finalidad de no sobrepasar la capacidad óptima de la columna analítica (200 µg) y con ello obtener una mejor resolución de las señales correspondientes a cada componente. El subfraccionamiento se realizó utilizando un programa de 5% a 30% de B en 75 min, para el material proveniente de F1 y uno de 35% a 50% de B en 45 min, para el proveniente de F4 (**Fig. 18** y **Fig. 19**).

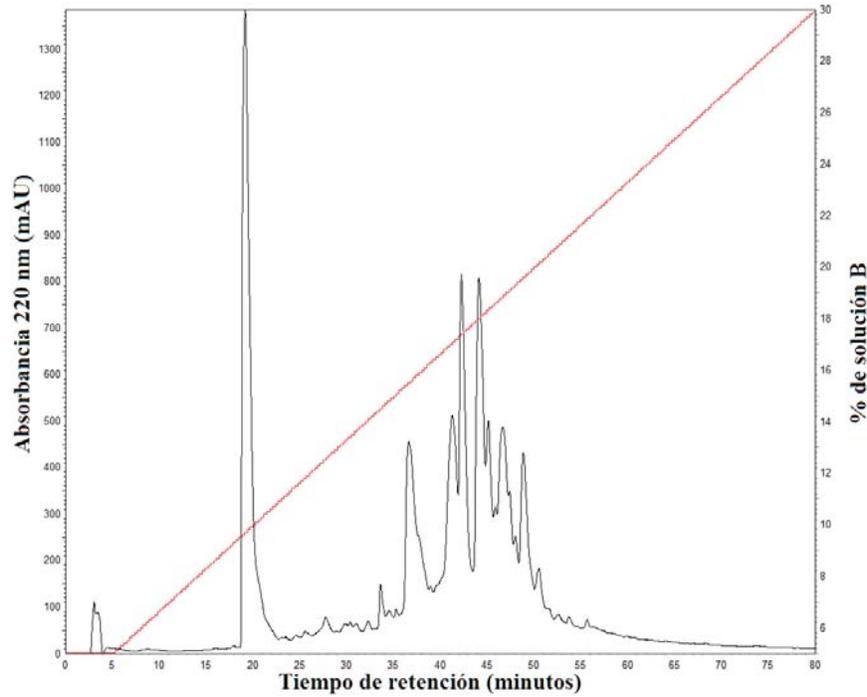


Fig. 18. Perfil cromatográfico resultante del subfraccionamiento de F1 utilizando un gradiente de 5% - 30% de solución B en 75 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de 1% de B cada tres min. El monitoreo se llevó a cabo utilizando una absorbancia de 220 nm.

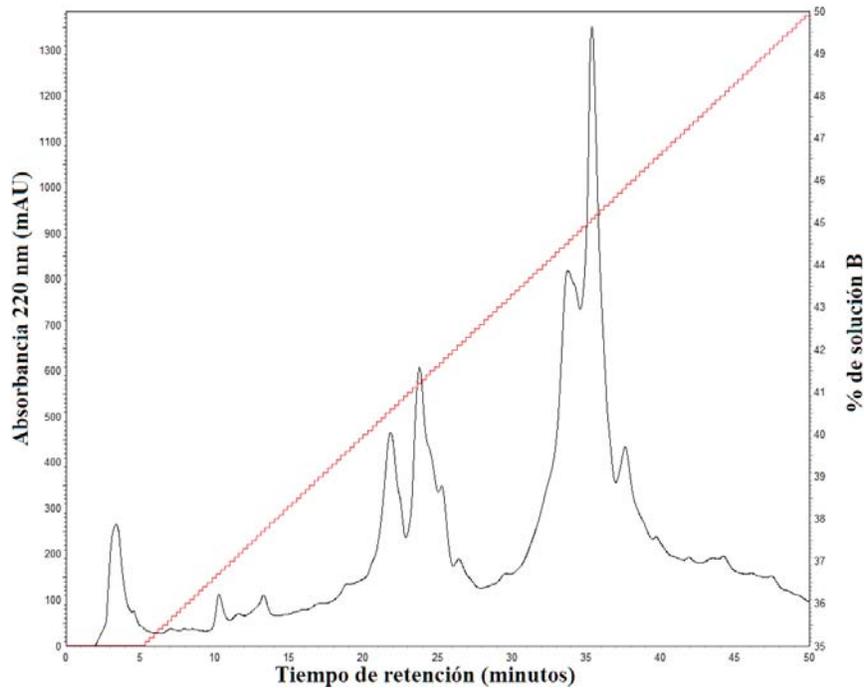


Fig. 19. Perfil cromatográfico de la repurificación de F4 utilizando un gradiente de 35% - 50% de solución B en 45 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de 1% de B cada tres min. El monitoreo se llevó a cabo utilizando una absorbancia de 220 nm.

Como resultado del subfraccionamiento, se lograron obtener cuatro subfracciones con componentes distintos provenientes de cada corrida de las alícuotas A – E y tres subfracciones con componentes distintos de las alícuotas F - M, con un total de trece corridas y 44 subfracciones como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Fracciones resultantes de la dilución de las fracciones F1 y F4.

Fracción	Gradiente de elución	Subfracción colectada para purificación
A	5% - 30% B en 75 minutos	12A, 25A, 28A, 30A
B		13B, 25B, 29B, 31B
C		2C, 14C, 17C, 18C
D		1D, 12D, 16D, 17D
E		1E, 2E, 14E, 16E
F	35% - 50% B en 45 minutos	14F, 16F, 24F
G		3G, 6G, 7G
H		3H, 6H, 7H
I		3I, 6I, 7I
J		3J, 6J, 7J
K		3K, 6K, 7K
L		3L, 6L, 7L
M		3M, 6M, 7M

IX.4. Purificación de los componentes mayoritarios

De acuerdo a los perfiles cromatográficos de las subfracciones obtenidas, los componentes obtenidos no se encontraban en estado de pureza, por lo que se procesaron nuevamente en el sistema RP-HPLC utilizando programas de elución distintos con el fin de optimizar la separación de sus componentes de acuerdo a su grado de hidrofobicidad. Esto se realizó con la finalidad de llevar a cabo la purificación y el aislamiento de sus componentes para realizar estudios posteriores con ellos. Cabe destacar que únicamente se trató de recolectar la parte central de las señales observadas en los perfiles cromatográficos para obtener el mayor grado de pureza posible.

Con la purificación se lograron obtener un total de siete componentes (**Fig. 20** y **Fig. 21**), cuatro provenientes de las subfracciones de A – E y tres provenientes de las subfracciones de F – M, de donde se eligieron aquellos provenientes de las fracciones B y G (**Fig.22 - 28**) a los cuales se les cuantificó la cantidad de proteína (**Tabla 2**) utilizando como blanco solución B al porcentaje que se había eluido el componente. Se eligieron estos componentes debido a que arrojaron los perfiles cromatográficos con los mayores rendimientos y el mayor grado de pureza. Posteriormente, los componentes se liofilizaron con una centrífuga evaporadora *Thermo Savant SPD1010* y se enviaron al IBT de la UNAM, en donde se realizaron estudios de sus masas teóricas y sus estructuras primarias.

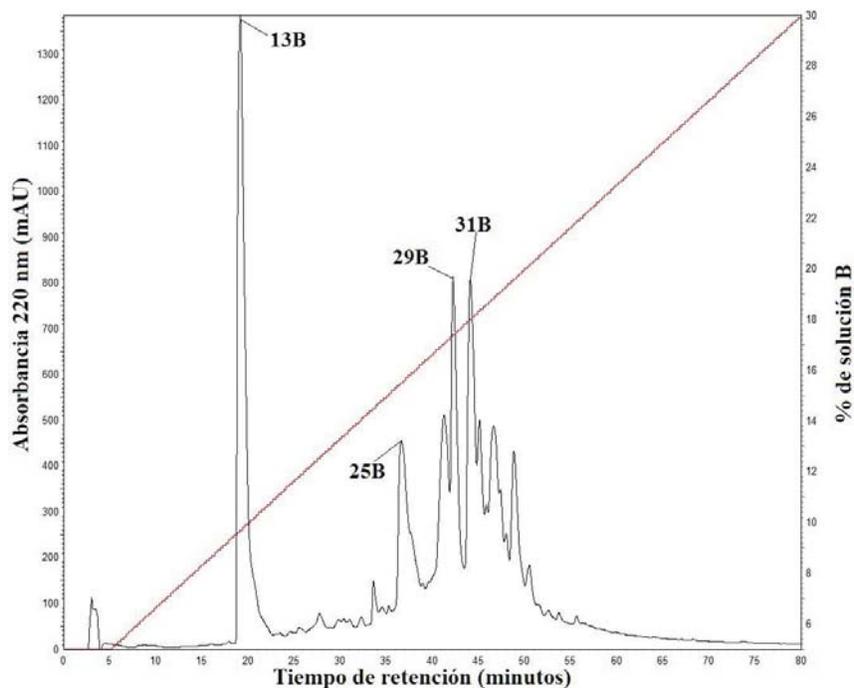


Fig. 20. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de F1 utilizando un gradiente de 5% - 30% de solución B en 75 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de 1% de B cada tres min. En él se muestran los componentes mayoritarios B colectados para llevar a cabo la repurificación independiente de cada uno de ellos.

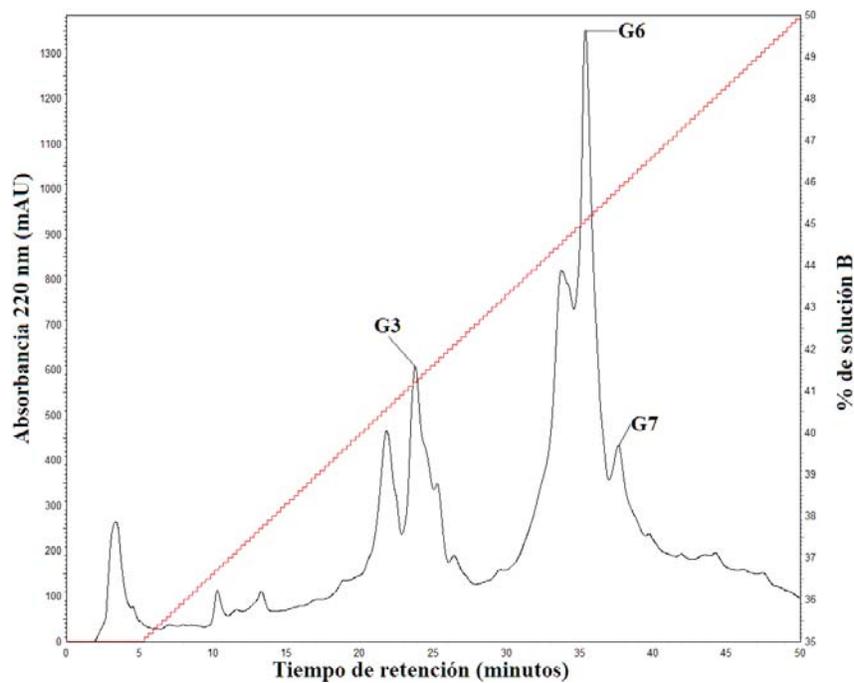


Fig. 21. Perfil cromatográfico de la repurificación de F4 utilizando un gradiente de 35% - 50% de solución B en 45 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de 1% de B cada tres min. El monitoreo se llevó a cabo utilizando una absorbancia de 220 nm; en él se muestran los componentes colectados para llevar a cabo la repurificación independiente de cada uno de ellos.

Tabla 2. Concentraciones obtenidas en la cuantificación de proteína de los componentes mayoritarios de las subfracciones B y G.

Muestra	A280 (mg/mL)
13B	0.1
25B	0.4
29B	0.2
31B	0.1
G3	0.6
G6	2.3
G7	2.2

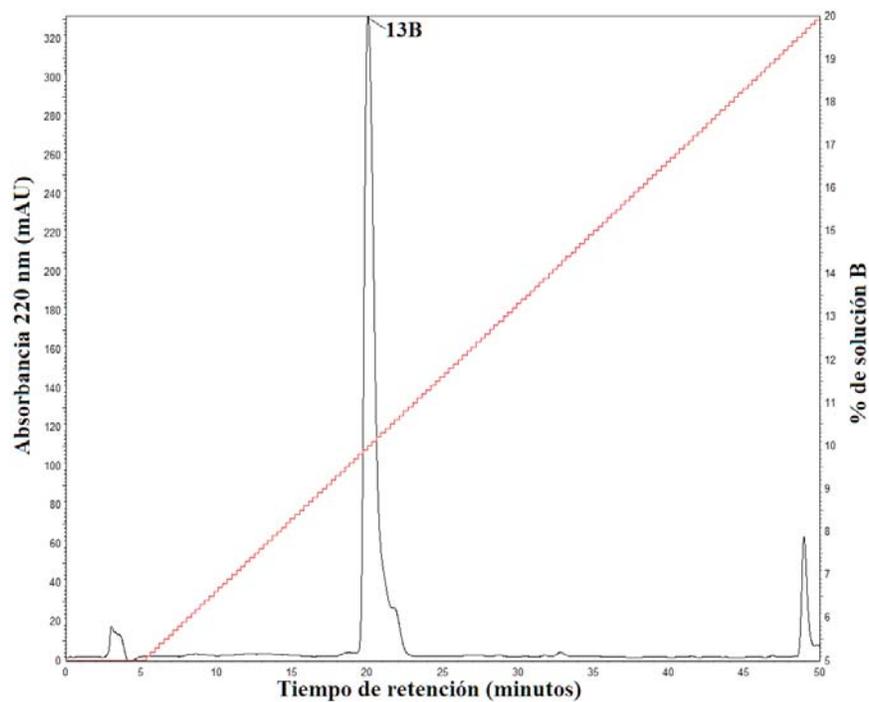


Fig. 22. Perfil cromatográfico del componente 13B proveniente del subfraccionamiento de la fracción B, eluido utilizando un programa de 5% - 20% de solución B en 45 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de B de 1% cada tres minutos. Su tiempo de retención fue de 20.6 minutos.

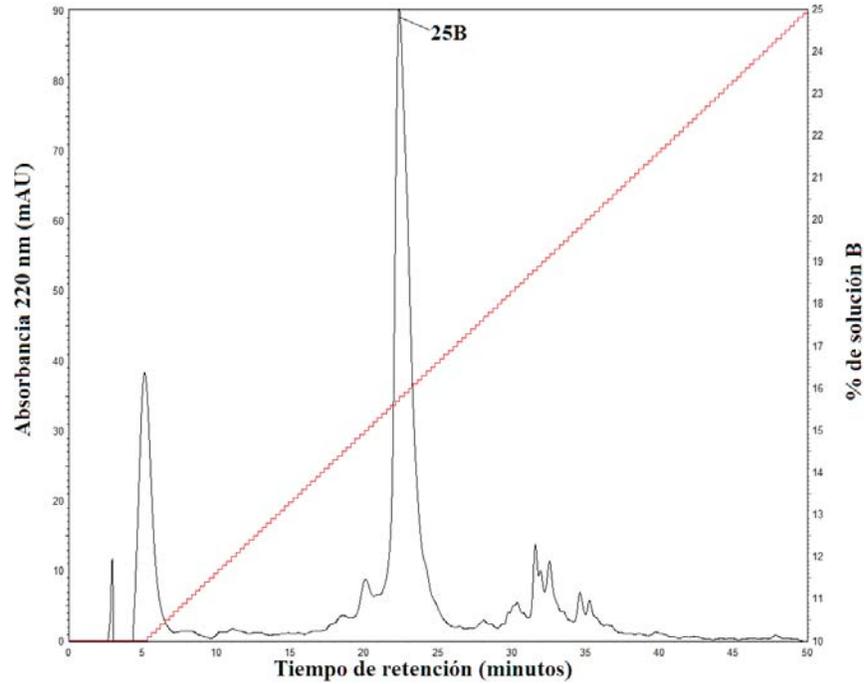


Fig. 23. Perfil cromatográfico del componente 25B proveniente del subfraccionamiento de la fracción B, eluido utilizando un programa de 10% - 25% de solución B en 45 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de B de 1% cada tres minutos. Su tiempo de retención fue de 22.5 minutos.

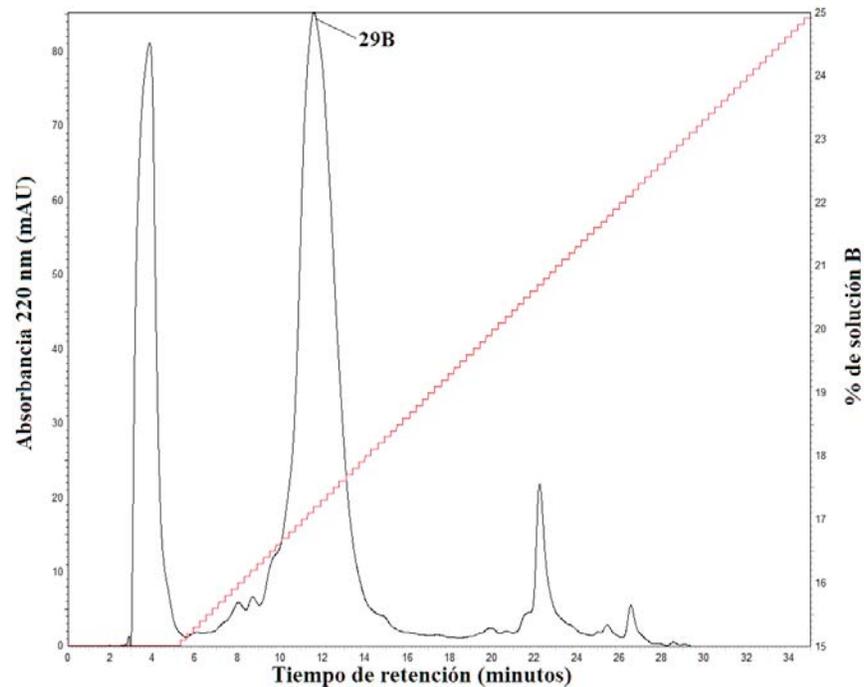


Fig. 24. Perfil cromatográfico del componente 29B proveniente del subfraccionamiento de la fracción B, eluido utilizando un programa de 15% - 25% de solución B en 30 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de B de 1% cada tres minutos. Su tiempo de retención fue de 11.6 minutos.

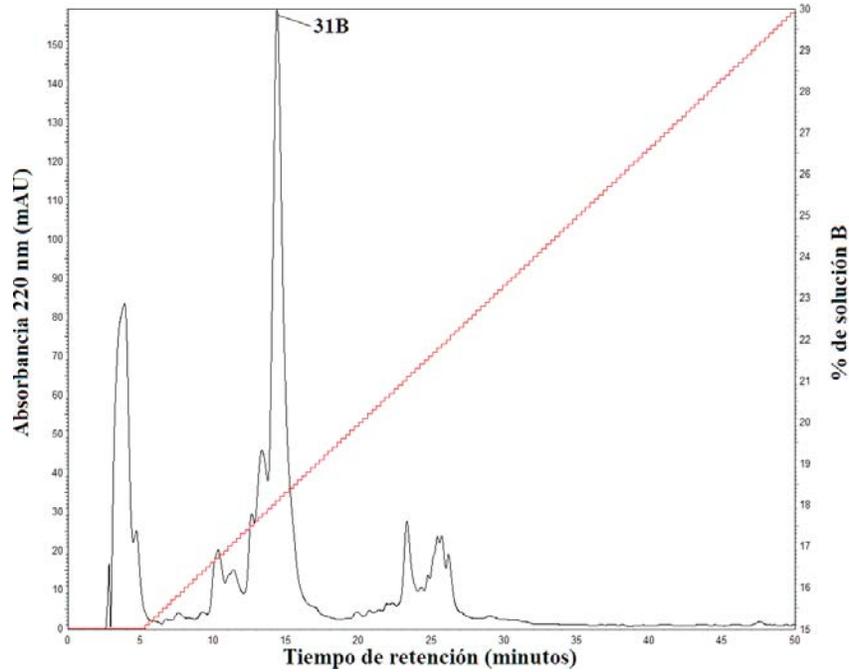


Fig. 25. Perfil cromatográfico del componente 31B proveniente del subfraccionamiento de la fracción B, eluido utilizando un programa de 15% - 30% de solución B en 45 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de B de 1% cada tres minutos. Su tiempo de retención fue de 14.4 minutos.

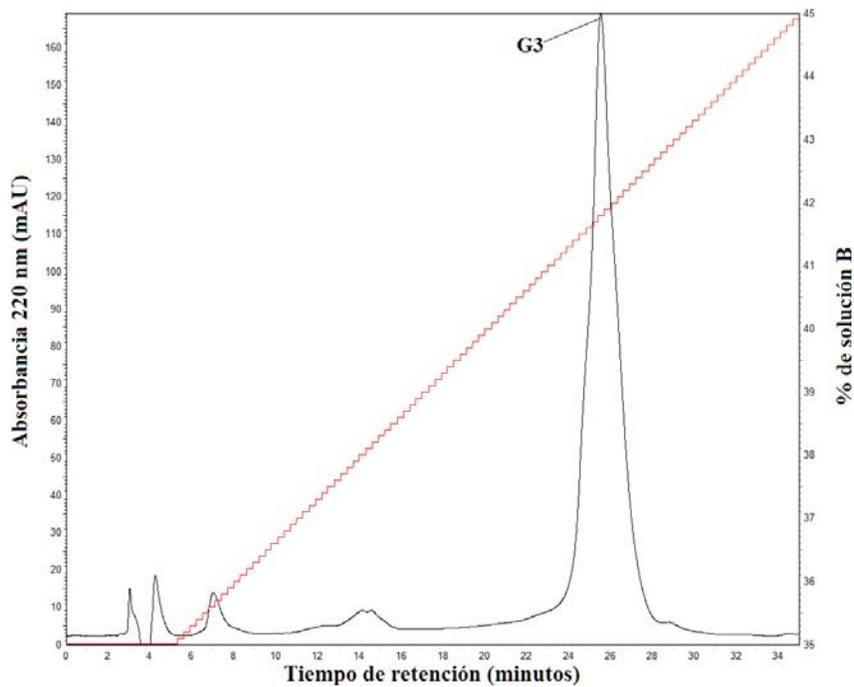


Fig. 26. Perfil cromatográfico del componente G3 proveniente del subfraccionamiento de la fracción G, eluido utilizando un programa de 35% - 45% de solución B en 30 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de B de 1% cada tres minutos. Su tiempo de retención fue de 25.5 minutos.

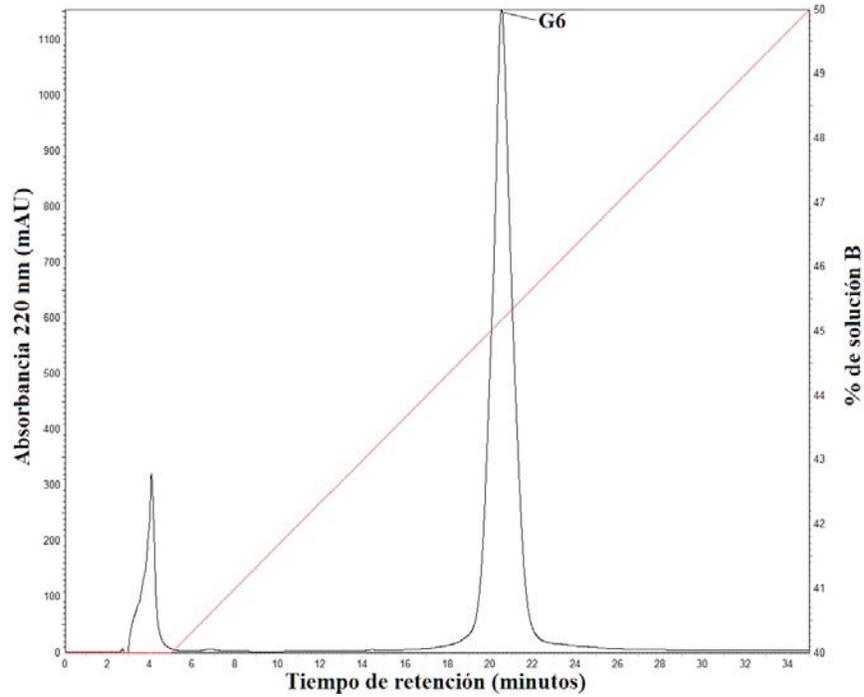


Fig. 27. Perfil cromatográfico del componente G6 proveniente del subfraccionamiento de la fracción G, eluido utilizando un programa de 40% - 50% de solución B en 30 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de B de 1% cada tres minutos. Su tiempo de retención fue de 20.5 minutos.

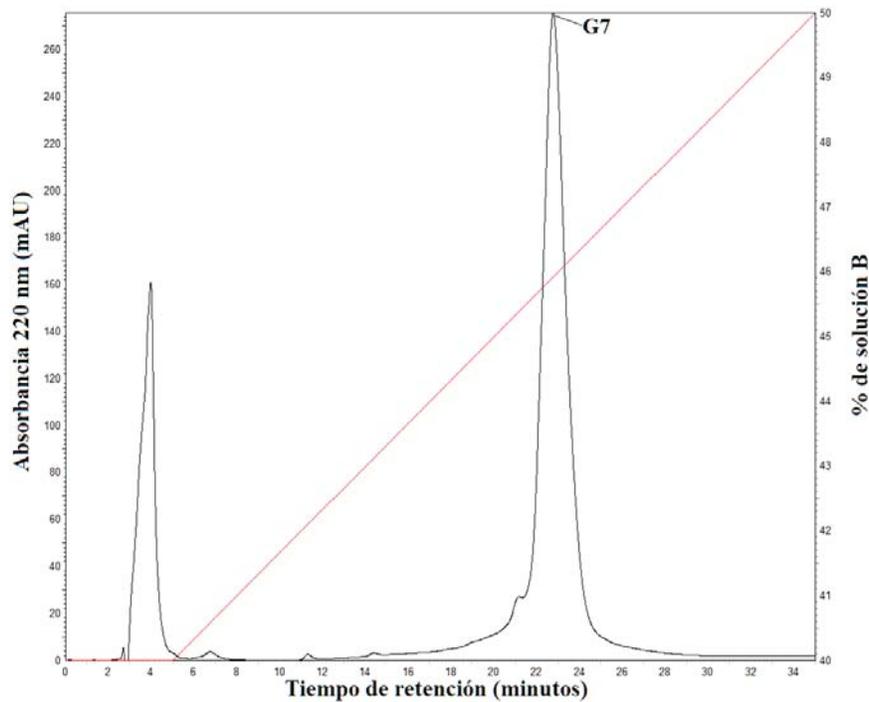


Fig. 28. Perfil cromatográfico del componente G7, eluido utilizando un programa de 40% - 50% de solución B en 30 minutos (línea roja) con un flujo de 1 mL/min y un gradiente de B de 1% cada tres minutos; su tiempo de retención fue de 22.7 minutos.

IX.5. Espectrometría de masas

De los siete componentes purificados, se tenía una cantidad muy baja de material (<100 pmoles) de los componentes procedentes de la subfracción B (13B, 25B, 29B y 31B) para llevar a cabo el análisis de espectrometría de masas, motivo por el cual se tomó la decisión de juntarlos con los componentes equivalentes procedentes de la subfracción A, para así poder incrementar su concentración. Las muestras se mantuvieron con el nombre de las etiquetas asignadas a los componentes obtenidos de la subfracción B (13B, 25B, 29B y 31B) y posteriormente fueron enviadas, junto con una parte de los componentes purificados de la subfracción de G (G3, G6 y G7), a la Unidad de Proteómica del IBT de la UNAM para ser sometidos a espectrometría de masas. Las concentraciones utilizadas para el análisis se muestran en la **Tabla 3**, determinadas a través de la función de "área bajo la curva" del software del sistema HPLC *Agilent Technologies Infinity 1260*, en donde se tomó como referencia el área obtenida para 10 nmoles de la conotoxina α -RgIA sintética (conotoxina de trece aminoácidos que actúa sobre RnACh).

Tabla 3. Cantidades de proteína utilizadas para llevar a cabo el análisis de espectrometría de masas.

Muestra	13B	25B	29B	31B	G3	G6	G7
Cantidad (pmoles)	240	90	120	100	100	200	100

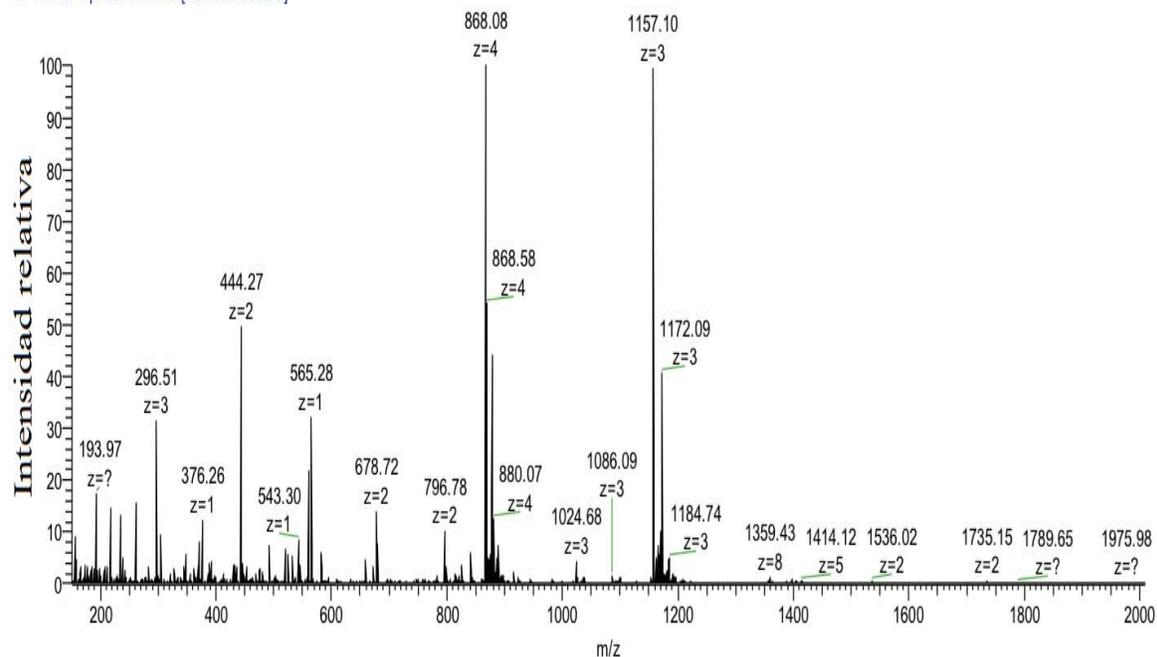
De los siete componentes analizados, únicamente se lograron obtener las masas teóricas de seis de ellos (**Tabla 4**), de los cuáles: 31B y G6 mostraron espectros claros, con una masa teórica monoisotópica de 3497.26 Da (**Fig. 31**) y 19109.41 Da (**Fig. 33**) respectivamente; 25B, 29B, G3 y G7 mostraron múltiples señales (**Fig. 29**, **Fig. 30**, **Fig. 32** y **Fig. 34**), lo que indica la presencia de otros componentes en la muestra, mientras que la masa del componente 13B no pudo ser determinada. Cabe destacar que, cuando los resultados fueron entregados, el laboratorio encargado de llevar a cabo el análisis reportó la presencia de aductos de sodio y oxidaciones en las muestras, lo que puede complicar la interpretación de los espectros.

Tabla 4. Masas experimentales obtenidas para los componentes purificados.

Muestra	13B	25B	29B	31B	G3	G6	G7
Masa experimental (Da)	ND	554.28*, 886.52*, 1355.43, 1679.57, 3468.28*, 4609.70, 6981.54, 10867.40	1591.55*, 1753.60, 1870.50, 2062.75, 2177.75, 3237.25*, 3239.24*, 3468.28, 5072.80	3452.29, 3497.26*	2909.07*, 3126.23*, 3344.39, 3475.30, 3692.47, 3910.63, 4917.44	19109.4*, 26087.62	19110.25*, 22624.87, 23698.13, 27257.37, 29058.88*

Nota: Las masas marcadas con "*" corresponden al componente más abundante en la fracción, mientras que "ND" indica que la masa del componente no pudo ser determinada.

03-2016-Cfergusoni-25B-MW #324-521 RT: 5.00-7.93 AV: 110 NL: 6.29E5
T: FTMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]



03-2016-Cfergusoni-25B-MW_XT_00001_M_160128105555 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 3.67E5
T: FTMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]

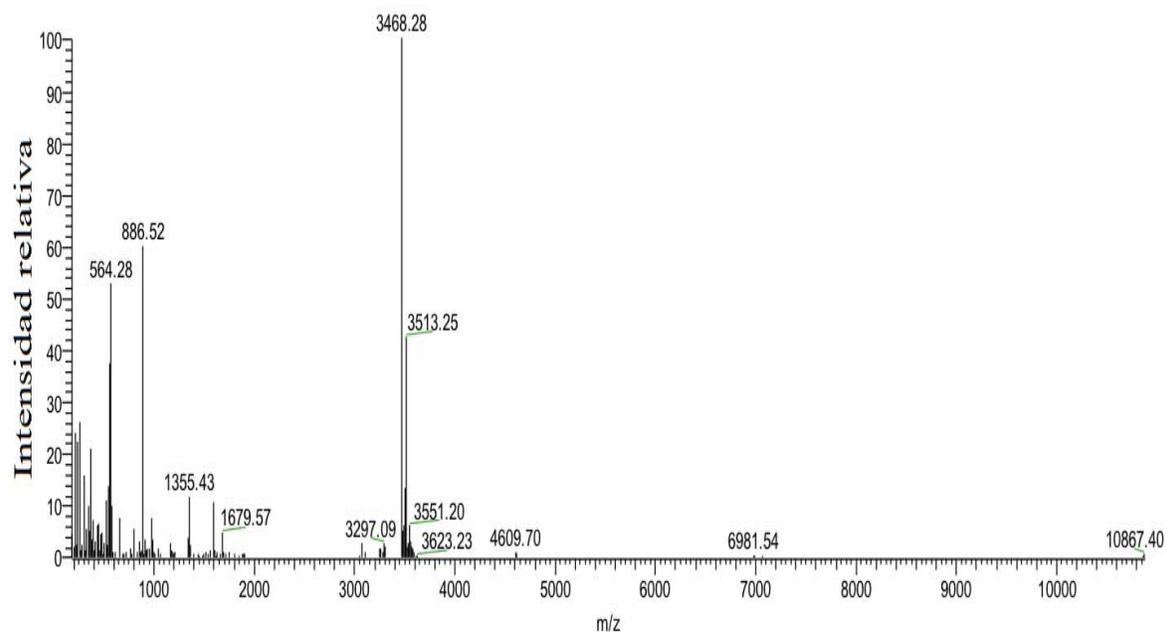
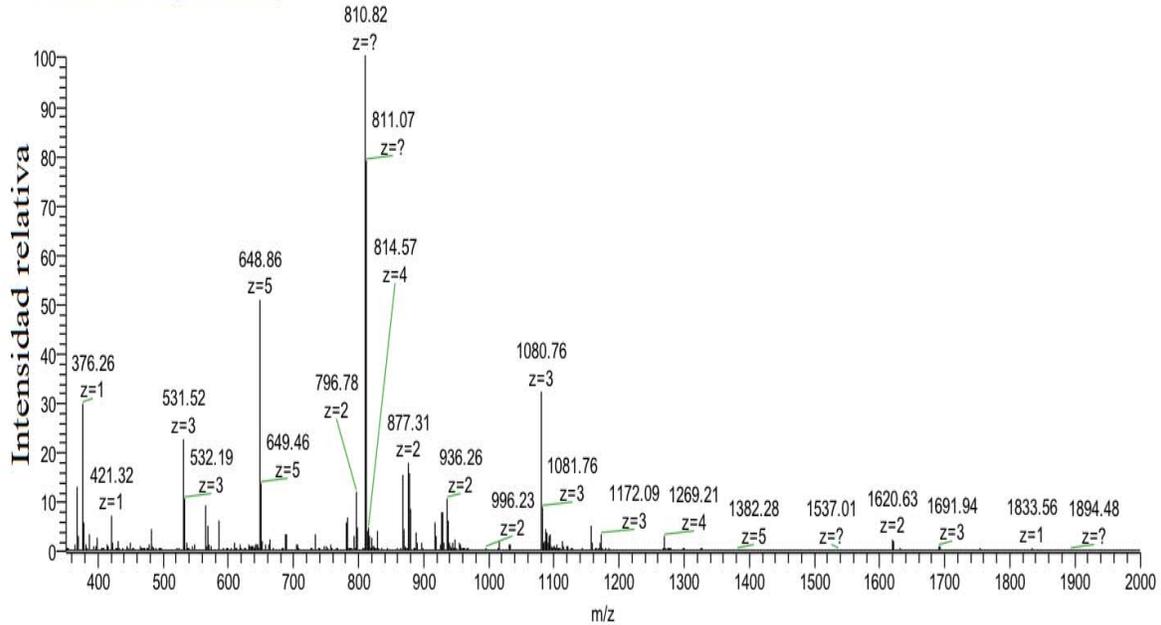


Fig. 29. Espectro de masas de la fracción 25B. El pico base corresponde a un analito de 3468.28 Da seguido de una señal con una intensidad relativa de 62%, uno de 54% y otro de 46% correspondientes a analitos de 886.52 Da, 564.28 Da y 3513.25 Da respectivamente, lo que indica que hay contaminantes en la muestra.

03-2016-Cfergusoni-29B-MW #422-481 RT: 6.37-7.22 AV: 60 NL: 5.85E5
T: FTMS + c NSI Full ms [350.00-2000.00]



03-2016-Cfergusoni-29B-MW_XT_00001_M_160128123618 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.67E5
T: FTMS + c NSI Full ms [350.00-2000.00]

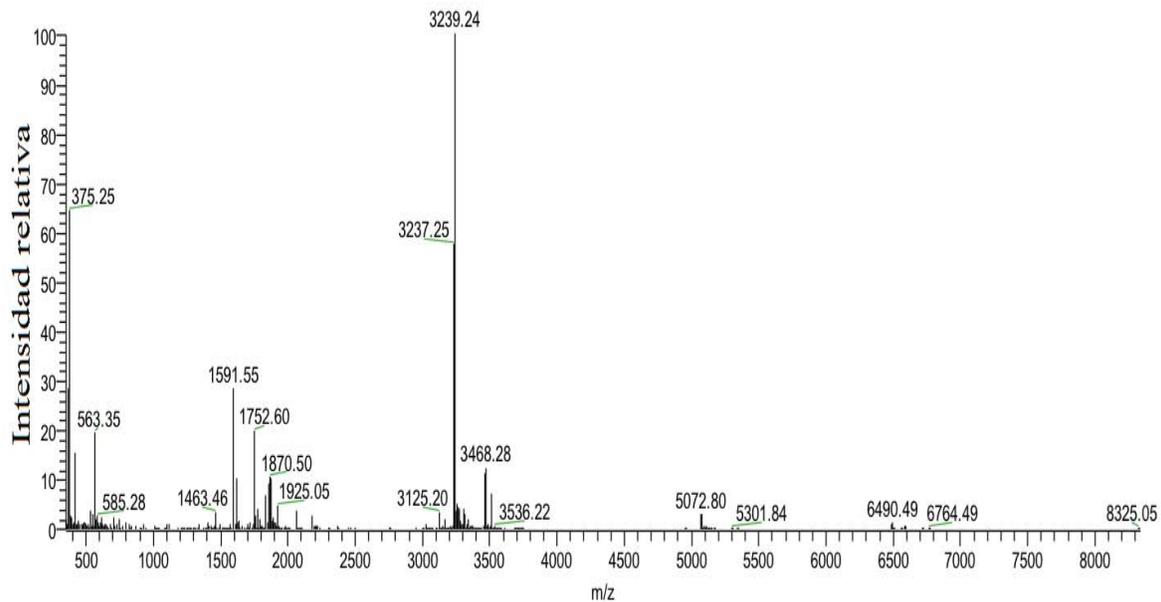


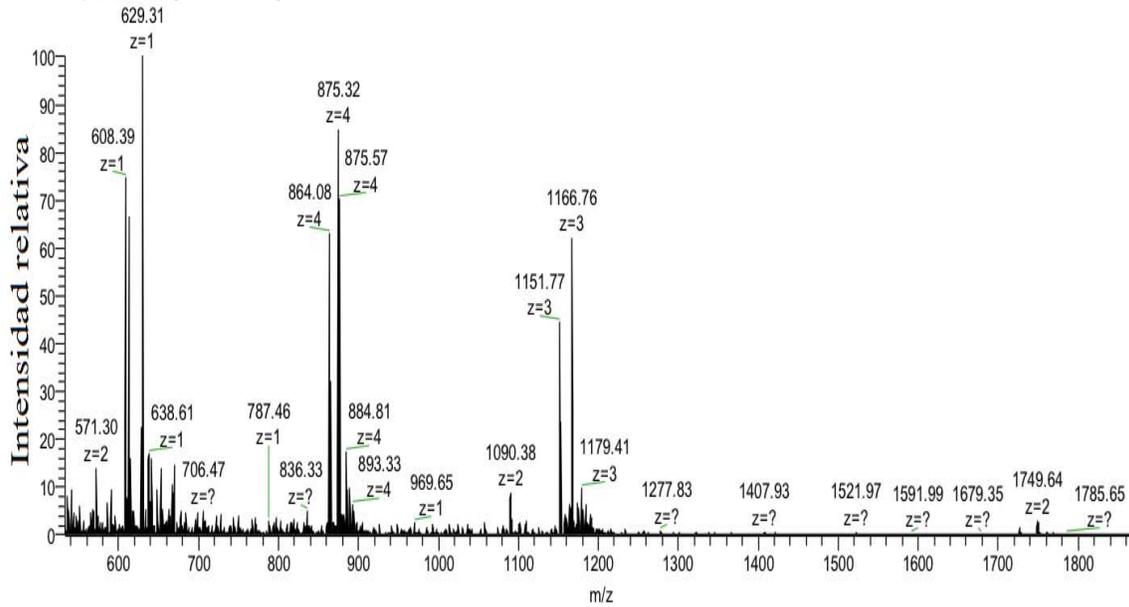
Fig. 30. Espectro de masas de la fracción 29B. El pico base corresponde a un analito de 3239.24 Da seguido de dos señales con una intensidad relativa de 64% y 60% correspondientes a analitos de 375.25 Da y 3237.25 Da respectivamente, lo que indica que hay un contaminante peptídico en la muestra.

03-2016-Cfergusoni-31B

03-2016-Cfergusoni-31B-MW

1/28/2016 11:28:42 AM

03-2016-Cfergusoni-31B-MW #510-599 RT: 7.17-8.43 AV: 90 NL: 1.21E5
T: FTMS + p NSI Full ms [400.00-2000.00]



03-2016-Cfergusoni-31B-MW_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 5.28E4
T: FTMS + p NSI Full ms [400.00-2000.00]

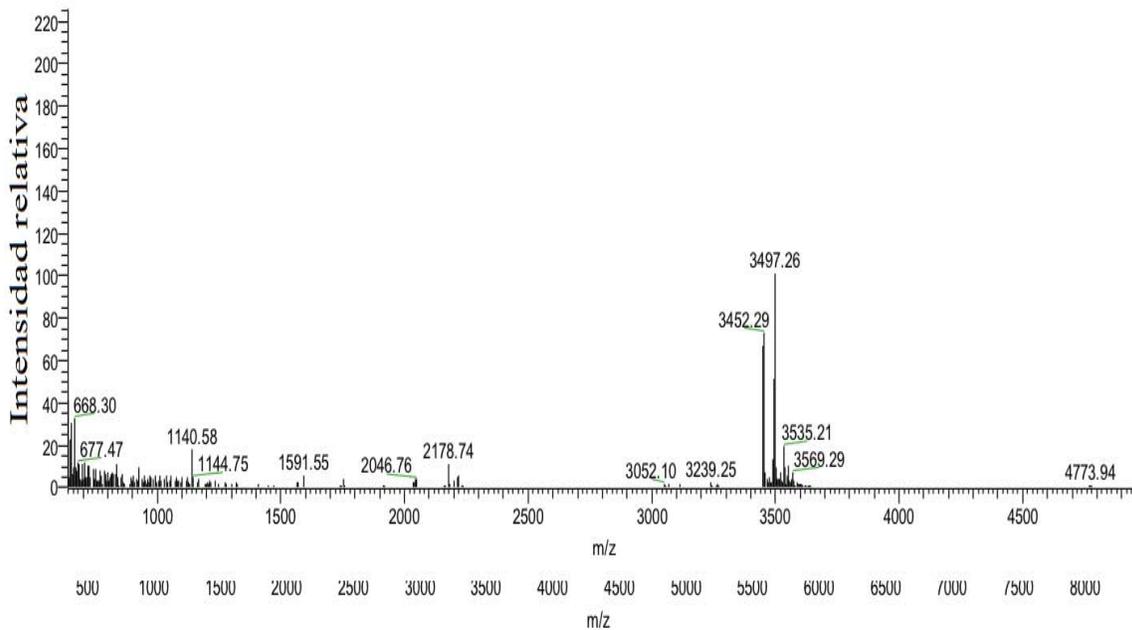
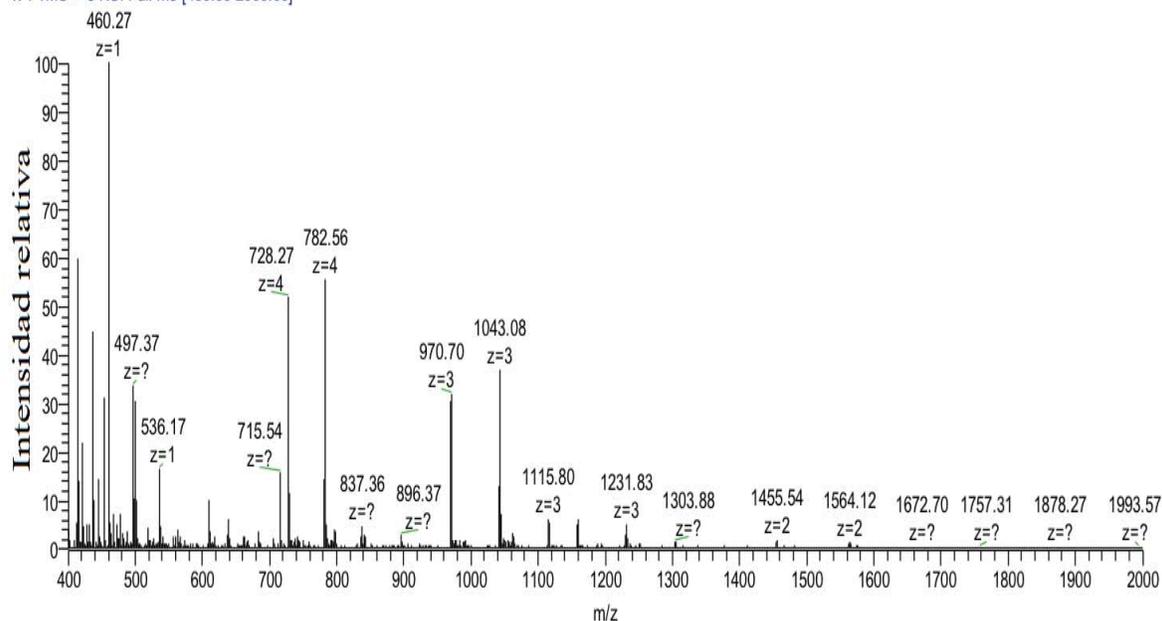


Fig. 31. Espectro de masas de la fracción 31B. El pico base corresponde a un analito de 3239.24 Da seguido de una señal con una intensidad relativa de 75% correspondiente a un analito de 3452.95 Da lo que podría indicar que se trate de un mismo péptido con una modificación postraduccional.

03-2016-Cfergusoni-G3-MW_160127130735 #331-366 RT: 3.62-4.13 AV: 36 NL: 1.00E5
T: FTMS + c NSI Full ms [400.00-2000.00]



03-2016-Cfergusoni-G3-MW_160127130735_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.65E4
T: FTMS + c NSI Full ms [400.00-2000.00]

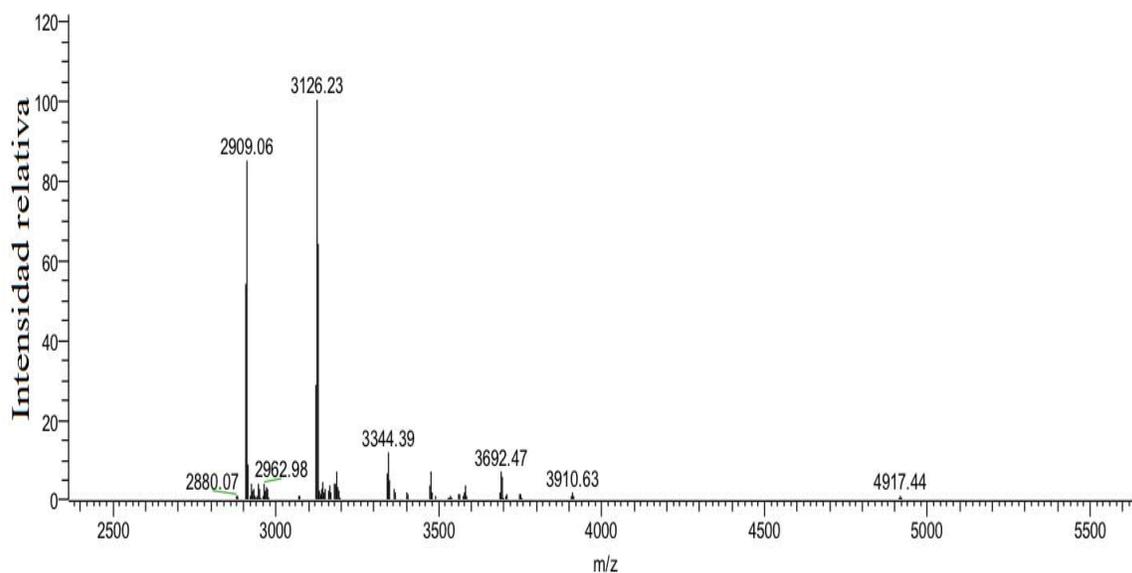
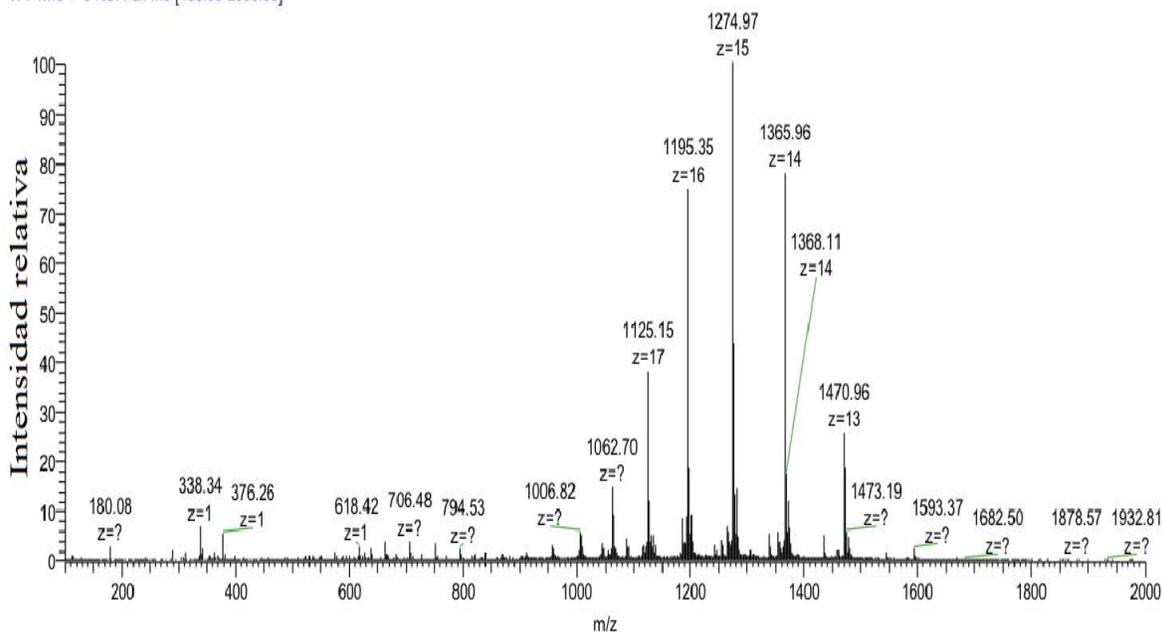


Fig. 32. Espectro de masas la fracción G3. El pico base corresponde a un analito de 3126.23 Da seguido de una señal con una intensidad relativa de 85% correspondiente a un analito de 2909.06 Da lo que podría indicar que la muestra contiene dos componentes distintos. Sin embargo, en esta muestra, se muestra un patrón de incrementos en las masas de aproximadamente 217 Da, lo que podría indicar la formación de un aducto con la molécula de interés.

03-2016-Cfergusoni-MW-G6 #569-609 RT: 9.00-9.64 AV: 37 NL: 1.27E4
T: FTMS + c NSI Full ms [100.00-2000.00]



03-2016-Cfergusoni-MW-G6_XT_00001_M_160128124453 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.79E3
T: FTMS + c NSI Full ms [100.00-2000.00]

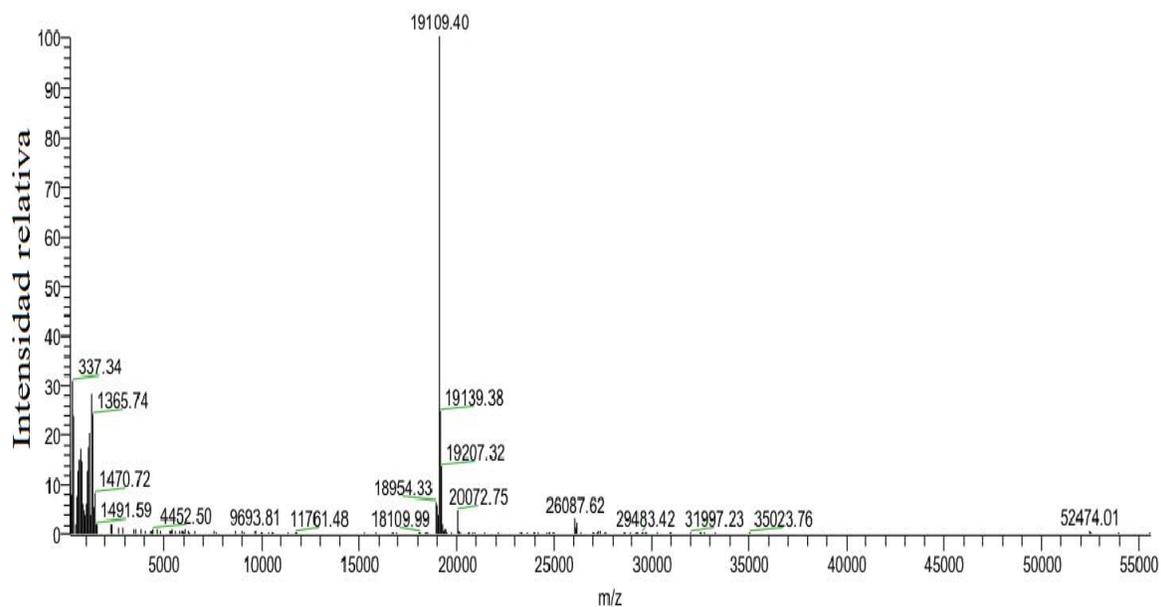
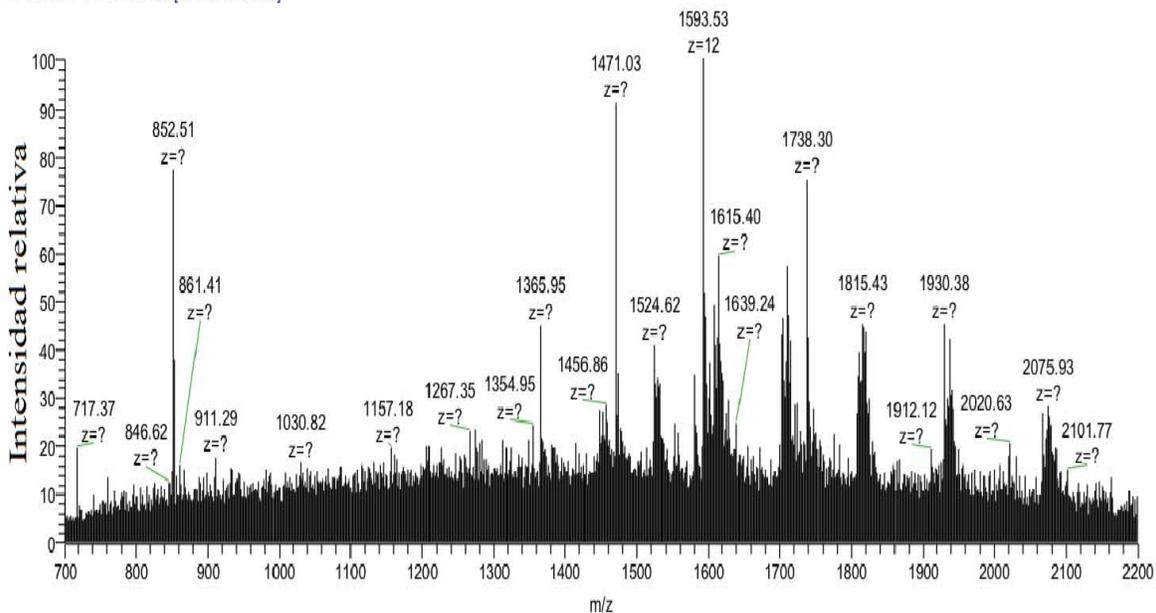


Fig. 33. Espectro de masas de la fracción G6. El pico base corresponde a un analito de 19,109.40 Da que podría tratarse de una proteína y no de un péptido proveniente del veneno.

03-2016-Cfergusoni-G7-MW_160127141815 #194-204 RT: 2.75-2.89 AV: 11 NL: 2.21E4
T: FTMS + c NSI Full ms [700.00-2200.00]



03-2016-Cfergusoni-G7-MW_160127141815_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 5.17E3
T: FTMS + c NSI Full ms [700.00-2200.00]

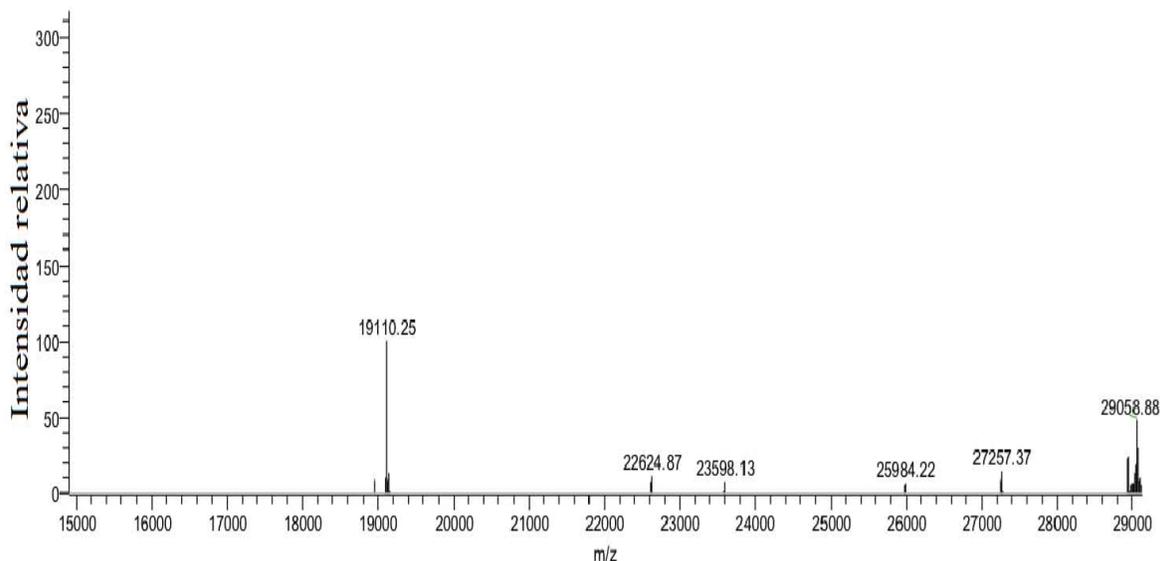


Fig. 34. Espectro de masas de la fracción G7. El espectro convolucionado muestra una gran cantidad de contaminantes y múltiples señales correspondientes a analitos que no lograron ionizarse. En el espectro deconvolucionado únicamente se muestran dos señales mayoritarias, el base con una masa de 19,110.25, y otra señal con una intensidad relativa del 50% correspondiente a un analito con una masa de 29068.88.

IX.6. Determinación de la estructura primaria

De los siete componentes que fueron sometidos a espectrometría de masas, únicamente dos (31B y G3) se eligieron para llevar a cabo la determinación de su estructura primaria debido a la poca cantidad de muestra de la que se disponía en los otros componentes, a la cantidad de contaminantes observados en el espectro de los componentes "B" y a las masas teóricas tan grandes obtenidas en las alícuotas G6 y G7. Como únicamente se disponía de 52 pmoles de 31B, se tomó la decisión de concentrar su contenido con el de las fracciones C – E correspondientes a la misma señal cromatográfica, logrando obtener una cantidad total de 150 pmoles; ambos componentes fueron enviados sin reducir ni alquilar, por lo que la determinación de la posición de los residuos de Cys no pudo ser llevada a cabo a través de esta técnica; sin embargo, se sabe que la degradación de Edman es una técnica que destruye a los residuos de Cys a menos de que se encuentren en su forma carboximetilada, por lo que al momento de la identificación de los aminoácidos mediante RP-HPLC, el no ver incrementos en los rendimientos de la feniltiohidantoína durante cuatro ciclos podría sugerir que se trata de un residuo de Cys. Las cantidades utilizadas para llevar a cabo el análisis de espectrometría fueron de 150 pmoles para 31B y de 190 pmoles para G3.

Una vez que la degradación de Edman fue llevada a cabo, únicamente se obtuvo la secuencia parcial del péptido 31B, posiblemente debido a que el componente G3 presentaba una modificación postraducciona en su extremo N-terminal que impidió la reacción con el reactivo de Edman. Sin embargo, la secuencia parcial de 31B estaba conformada por 31 aminoácidos, de los cuales uno no pudo ser identificado y tres no mostraron incrementos en sus rendimientos durante la etapa de identificación por HPLC, lo que podría sugerir que son residuos de Cys dada la naturaleza rica en Cys de las conotoxinas y el mecanismo de su identificación durante el proceso de secuenciación. Tomando en consideración a dichos aminoácidos como residuos de Cys y sin contar al aminoácido no identificado, el péptido presentaría una masa calculada de 3221.58 Da (*Tabla 5*) de acuerdo a IonSource (<http://www.ionsource.com>), lo que indica una diferencia de 275.85 Da respecto al pico base del espectro obtenido para el componente y una diferencia de 230.88 Da respecto a la segunda señal mayoritaria, mientras que su masa calculada sería de 2914.15 Da sin considerar a los residuos como Cys, con una diferencia de 582.68 Da y 538.14 Da respecto a dichos iones.

Tabla 5. Estructura primaria, masa teórica y masa calculada del péptido 31B.

Nombre del componente	Estructura primaria	Masa calculada (Da)	Masa calculada con Cys (Da)	Masa teórica (Da)	AA
31B	TVA?GASXTRWQNHXYDAAML RPPGNXVVSD	2914.15	3221.58	3497.26 3452.29	31

Nota: La X representa una posible Cys y ? un aminoácido no identificado.

Bajo este criterio, los servicios BLAST y ConoPrec arrojaron un total de cuatro y quince secuencias similares a 31B respectivamente. Sin embargo, de estas secuencias, únicamente se tomaron en consideración aquellas que presentaban un porcentaje de identidad mayor o igual al 50%, lo que redujo el número total de alineamientos obtenidos a un total de seis respecto al péptido 31B: tres arrojados por BLAST y tres arrojados por ConoPrec (**Tabla 6** y **Tabla 7**).

La comparación de secuencias llevadas a cabo por BLAST y ConoPrec arrojó secuencias pertenecientes a especies de *Conus* vermívoras del Indo-pacífico. De éstas, la búsqueda en BLAST reveló un 50% y 52% de identidad con los péptidos *Bt140* y *Bt151* de *C. betulinus* con valores de expectación de 0.013 y 0.022 respectivamente y un 73% de identidad con la conotoxina *LiCr95* perteneciente a la superfamilia O1 de *C. lividus* con un valor de expectación de 0.094, todas con un arreglo de Cys VI/VII. Por otro lado, la búsqueda a través de ConoPrec reveló distintos porcentajes de identidad con tres conotoxinas, todas pertenecientes a la superfamilia génica O1 con arreglos de Cys VI/VII. De éstas, *LiCr95*, en esta ocasión con un valor de expectación de 0.0059, y *Fla6.5* de *C. flavidus*, perteneciente a la superfamilia O1 con un valor de expectación de 0.0069, presentaron valores de identidad del 73%, mientras que la conotoxina *MiK42* de *C. miles* presentó una identidad del 50% y un valor de expectación de 0.0069.

Cabe destacar que, en todos los alineamientos, las posiciones de las Cys ocho y quince del péptido 31B se encontraban en posiciones que concordaban con Cys de las secuencias obtenidas en las bases de datos.

X. Discusión

El veneno producido por los caracoles marinos del género *Conus* es una fuente rica de péptidos ricos en Cys con actividad biológica, funcionando como antagonistas altamente específicos de canales iónicos y receptores involucrados en la transmisión sináptica, presentándose en cantidades aproximadas de 1000 componentes con tamaños moleculares que se encuentran principalmente entre tamaños de 800 y 3000 Da por especie (Kaufenstein *et al.*, 2011). Es por este motivo que su estudio puede proporcionar una gran cantidad de información que podría ser utilizada para realizar investigación básica y aplicada, además de que puede permitir el desarrollo de medicamentos y fármacos utilizables en el área biomédica.

Los péptidos del veneno de *Conus* se caracterizan por presentar una gran cantidad de modificaciones postraduccionales y pueden agruparse de acuerdo a un sistema de clasificación determinado si se conocen sus blancos moleculares o, la cantidad, la posición y la conectividad de sus residuos de Cys por lo que, para su identificación y posterior clasificación, es necesario someterlas a una serie de análisis químicos como pueden ser la espectrometría de masas, la secuenciación, la espectroscopía y técnicas electrofisiológicas entre otras. Esto propicia a que en muchas ocasiones, la caracterización de dichos péptidos resulte complicada, principalmente porque en el veneno se encuentran en distintas concentraciones que, pueden ser muy bajas y/o pueden encontrarse en estados de maduración variables; a que las modificaciones postraduccionales que exhiben complican su análisis y a que las concentraciones de los mismos disminuye aproximadamente un 50% conforme son eluidos (Kaufenstein *et al.*, 2004), lo que deja una cantidad muy pequeña de material para determinar su naturaleza una vez que el componente obtenido logra ser purificado. Por otro lado, la obtención de organismos, además de representar un costo alto relacionado con su colecta, puede tener consecuencias ecológicas graves en el ambiente que se desarrollan, motivo por el cual se extrae únicamente una cantidad reducida de los mismos que a su vez debe ser aprovechada de la mejor manera posible. La obtención de bajas cantidades de material puede ser contrarrestada a través de la síntesis *de novo* mediante el uso de técnicas de clonación de ADNc de una secuencia parcial o conocida del péptido de interés, lo que puede ser muy útil en estudios donde se desea llevar a cabo la caracterización completa del péptido.

En este trabajo se lograron aislar y purificar siete componentes mayoritarios provenientes del veneno de *C. fergusonii*, de los cuales se obtuvo el espectro de seis de sus masas y únicamente la secuencia parcial de uno de ellos, del que no se tenían conocimientos previos. Lo anterior puede estar relacionado con que se analizaron cantidades de muestras con concentraciones muy bajas (<200 pmol, con excepción de 13B y G6) y, aunque teóricamente es posible obtener resultados adecuados de muestras con concentraciones nanomolares, en ocasiones es necesario contar con al menos 200 pmoles para obtener espectros legibles ya que éstos dependen de factores como la pureza del componente de interés, el manejo que se le da a la muestra, la concentración, la posible formación de agregados peptídicos que podrían generar la supresión iónica, la fuente de ionización y la limpieza del aparato, misma que podría tener un efecto negativo en el desempeño del sistema o en el enmascaramiento de analitos por la formación de aductos.

Por otro lado, en relación con la escasa cantidad de material de la que se disponía y de la presencia de contaminantes observables en la mayoría de los espectros obtenidos, solamente se buscó dilucidar la estructura de dos de los componentes purificados (**Tabla 8**), pero al llevar a cabo la secuenciación, únicamente se logró obtener la estructura parcial de uno de ellos (**Tabla 5**), lo que podría estar relacionado con una posible modificación postraducciona en el extremo N-terminal que impidiera la reacción con el reactivo de Edman. Debido a que diversos factores pueden estar involucrados en la caracterización exitosa de un conopeptido específico y a que ninguno de los componentes purificados pudo ser caracterizado de manera completa, a continuación, se hace un análisis para cada caso particular.

13B

El perfil cromatográfico obtenido para el componente 13B mostró una señal muy bien definida con una absorbancia de 330 mAU (**Fig. 22**), lo que por lo general sugiere un alto grado de pureza del componente en cuestión. Sin embargo, no fue posible obtener el espectro de este componente independientemente de que se utilizó la mayor cantidad de muestra (240 pmoles) para realizar el análisis de su masa y de que mostró el perfil cromatográfico con la señal más definida de todos los componentes mayoritarios obtenidos. Esto pudo deberse a diversos motivos, dentro de los cuales destacan que la ionización de las especies moleculares presentes haya sido suprimida por otras especies presentes (la muestra no estaba en estado de pureza y pudo formarse un agregado peptídico), que el componente se haya desnaturalizado, o que la masa del péptido fuera demasiado grande ($>2 \times 10^5$ Da), que podría indicar la presencia de una proteína como el colágeno (285 kDa), procedente del humano.

25B

En el perfil cromatográfico correspondiente al componente purificado 25B (**Fig. 23**), es posible observar un ligero ensanchamiento de la señal del lado derecho, lo que indicaría que el componente no se encontraba en estado de pureza. Al observar el espectro deconvolucionado de esta fracción (**Fig. 29**) es posible ver un pico base con una masa promedio de 3468.28 Da (aproximadamente 29 aminoácidos si se divide entre el promedio de los veinte aminoácidos esenciales) seguido por uno de 3513.25 Da (aproximadamente 29 aminoácidos) respectivamente con intensidades relativas de 100% y 42% con una diferencia en unidades de masa de 44.97 Da, que se aproxima a la masa promedio correspondiente a una de las modificaciones postraduccionales más comunes en las conotoxinas, la γ -carboxilación del glutamato (43.98983 Da). Lo anterior podría sugerir que ambos componentes son el mismo en diferentes estadios de maduración. Sin embargo, en esta muestra existen otros dos componentes con intensidades relativas de 60% y 55 % y masas promedio de 564.28 Da y 886.52 Da respectivamente que indica la presencia relativamente alta de componentes que podrían ser de origen peptídico, o bien aductos formados por metales alcalinos y restos de detergentes comunes utilizados para limpiar el equipo como el Tritón (889.54 Da) o el propilenglicol (563.37 Da). Además de éstos, existe una masa de 1355.46 Da que se acerca a la masa molecular de la queratina humana (1357.69579), un contaminante relativamente común presente en los análisis de espectrometría de masas mediante ESI (Keller *et al.*, 2008), motivo por el cual se tomó la decisión de no someter la muestra al análisis de su masa.

De acuerdo con la base de datos de ConoServer, existe una conotoxina de 31 aminoácidos llamada Ar6.21 clasificada dentro de la superfamilia génica O3 con un arreglo de Cys VI/VII y una masa promedio de 3468.68 Da perteneciente a *C. arenatus*, un cono vermívoro del Indo-pacífico, por lo que el componente 25B podría presentar una longitud similar y tomando en consideración que las conotoxinas de la superfamilia génica O3 se caracterizan por estar conformadas por 25 a 35 aminoácidos, podría indicar la pertenencia a esta familia. Sin embargo, el hecho de no tener una secuencia completa no permite asegurar esta suposición.

29B

El perfil cromatográfico correspondiente al componente 29B (**Fig. 24**) mostró una señal ensanchada con un hombro notorio del lado derecho, lo que implicaría que el componente no se encontraba en estado de pureza; esto se logró apreciar en el espectro obtenido (**Fig. 30**), se observaron múltiples iones mayoritarios relativamente cercanos con cargas de +1 hasta +5, de los cuales se obtuvieron tres masas promedio en el espectro deconvolucionado que podrían corresponder a conopéptidos con valores de 1591.55 Da, 3237.25 Da y 3239.24 Da con intensidades relativas de 30%, 58% y 100% respectivamente. La diferencia en unidades de masa los dos últimos componentes es de 1.99 Da, que se aproxima a la masa promedio que corresponde a la formación de un puente disulfuro (2.0159 Da), por lo tanto, sería posible que estos dos componentes se traten del mismo en diferentes estadios de maduración. Sin embargo, la presencia del tercer componente (1591.55 Da) indicó que en la muestra no se presentaba un componente totalmente puro ya que la diferencia entre sus masas es muy notoria.

Considerando nuevamente el promedio del peso total de los aminoácidos, este compuesto estaría conformado por aproximadamente 27 aminoácidos y de acuerdo con la base de datos de ConoServer, existe una conotoxina llamada Mr6.28 de 28 aminoácidos clasificada dentro de la superfamilia génica O2 con un arreglo de Cys VI/VII y una masa promedio de 3239.61 Da perteneciente a *C. marmoreus*, un cono vermívoro del Indo-pacífico, por lo cual el componente 29B podría presentar un tamaño similar.

En el espectro deconvolucionado también es posible observar una molécula con una masa de 1591.55 Da, lo que resultaría en promedio de trece aminoácidos. De acuerdo con la base de datos de ConoServer, existe una conotoxina llamada BtIII A de catorce aminoácidos clasificada dentro de la superfamilia génica M con un arreglo de Cys III y una masa promedio de 1590.90 Da perteneciente a *C. betulinus*, lo que podría sugerir que el componente encontrado presenta la misma longitud respecto a su secuencia, pero para asegurar esto, sería necesario repurificar el componente para determinar su estructura primaria.

31B

El perfil cromatográfico del componente 31B (**Fig. 31**) indica que el componente en cuestión se encontraba en estado de pureza, lo que pudo ser comprobado al analizar el espectro de su masa (**Fig. 31**). Dicho espectro mostró un patrón de múltiples iones cargados de +1 hasta +4 correspondientes a tres componentes del espectro deconvolucionado con una masa de 3497.26 Da, 3452.29 Da y 668.3 Da, cuya intensidad relativa fue de 100%, 75% y 35% respectivamente. El último componente puede tratarse de un aducto de sodio formado

por el detergente Tritón (669.41844 Da), mientras que los componentes mayoritarios presentan una diferencia de 44.97 Da.

Debido a que el péptido mostraba una cantidad de masas reducidas, se tomó la decisión de enviarlo a secuenciar y, de acuerdo a los resultados obtenidos (*Tabla 5*), el péptido 31B estaba conformado por 31 aminoácidos, de los cuales uno no pudo ser determinado posiblemente debido a una modificación en el residuo. Tomando en consideración la masa calculada de la secuencia obtenida para este péptido a través de IonSource (*Tabla 5*), se tendría un componente con una masa molecular de 2914.15 Da, pero si se considera al aminoácido no identificado como un Glu y a las posiciones marcadas con **X** como residuos de Cys, de acuerdo a la calculadora, se tendría un péptido con una masa de 3350.69 Da, componente al cual aún le faltarían 101.6 Da respecto a la masa obtenida a través de la espectrometría de masas. Sin embargo, de acuerdo a ConoServer, hasta la fecha no se han encontrado péptidos con residuos de Cys impares ni arreglos de Cys de tres residuos, ya que tienden a formar enlaces disulfuro entre sí, por lo que es muy probable que, al llevar a cabo la secuenciación, en la etapa de identificación de aminoácidos mediante el principio de degradación de Edman, el no ver rendimientos para ningún aminoácido en el último ciclo pudo deberse a la presencia de un residuo de Cys al no estar reducida ni alquilada la muestra. Bajo este criterio, el péptido 31B presentaría cuatro residuos de Cys en estado oxidado (formando enlaces disulfuro) además de un Glu que, calculado utilizando IonSource, tendría una masa de 3451.84 Da, muy similar al componente de 3452.29 Da que presentó una intensidad relativa del 75%. Si a dicho péptido se le suma el cambio de masa de una γ -carboxilación del Glu, nos arrojaría una masa de 3495.8498, similar a la masa predominante de 3497.26 Da.

Lo anterior podría sugerir que la estructura primaria del péptido 31B consistiera de 32 aminoácidos y un patrón de Cys de tipo XIV descrito por Möller *et al.* (2005), observado en conotoxinas pertenecientes a las superfamilias génicas A, D, I2, J, L, M, O1, O2, P y T, con tres posibles conectividades entre sus residuos de Cys, lo que a su vez sugeriría que la estructura primaria del péptido quedaría de alguna de las siguientes maneras (*Fig. 35*).

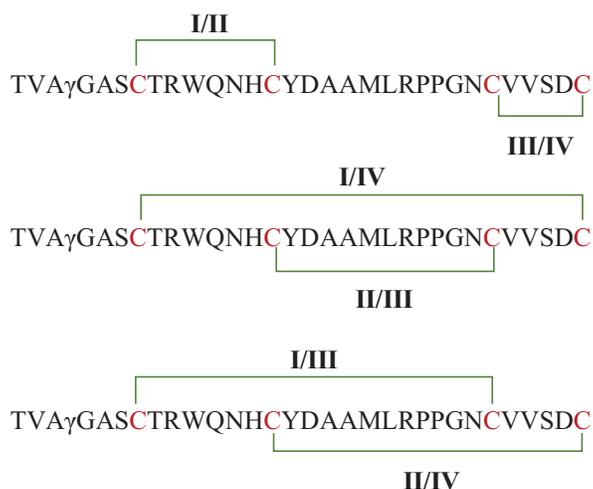


Fig. 35. Modelo propuesto para el péptido 31B. Se muestra la estructura primaria y las conectividades entre residuos de Cys, en donde γ representa una γ -carboxilación del glutamato.

El alineamiento realizado en este trabajo fue llevado a cabo bajo el criterio mencionado anteriormente debido a que, al omitir los aminoácidos desconocidos, ambos servicios (BLAST y ConoPrec) no arrojaron resultado alguno. Es importante resaltar que estos servicios se basan en un valor de puntaje que depende de cuatro valores principales: a) el tamaño de la base de datos con la cual a secuencia es comparada; b) el grado de identidad entre las secuencias, que representa el porcentaje de residuos idénticos que tienen dos secuencias distintas en las mismas posiciones de un alineamiento respecto al número de residuos de su estructura primaria; c) el grado de similitud, que hace referencia a la relación que pueden tener dos proteínas de acuerdo a su porcentaje identidad o el porcentaje de sustituciones de aminoácidos con cargas similares y d) el valor E o valor de expectación. Este último valor es considerado de gran importancia debido a que es un parámetro que describe el número de veces que se puede esperar ver un alineamiento por coincidencia cuando se busca en una base de datos de un tamaño determinado. Este valor disminuye de manera exponencial conforme el valor "S" (la puntuación) del emparejamiento incrementa (Pearson, 2013). En otras palabras, entre más cercano a cero sea el valor E, más significativo el alineamiento.

De acuerdo a Pearson (2013), si dos secuencias exhiben más del 30% de identidad, es posible que sean homólogas a menos de que se traten de péptidos con pocos residuos (ya que éstos últimos presentan mayores porcentajes de identidad por mera coincidencia), por lo que resulta más adecuado encontrar homólogos con valores E de $<10^{-10}$.

Al analizar los resultados obtenidos por BLAST y ConoPrec (*Tabla 6* y *Tabla 7*) se observaron seis secuencias de las cuales cinco eran distintas. De aquellas arrojadas por BLAST, la secuencia que presentó el porcentaje de identidad mayor (73% de identidad) fue *LiCr95*, una conotoxina perteneciente a la superfamilia O1 de *C. lividus* con un arreglo VI/VII (Zhangsun *et al.*, 2006), mientras que el menor porcentaje lo presentó *Bt140* (50% de identidad), una conotoxina no caracterizada proveniente de un estudio transcriptomal de *C. betulinus* seguida por *Bt151* (52% de identidad), ambas provenientes del mismo estudio con seis Cys cada una (Peng *et al.*, 2016) que, de acuerdo al análisis de su secuencia señal a través de ConoPrec, podrían ser acomodadas dentro de la superfamilia de conotoxinas A. De estas tres conotoxinas, *LiCr95* presentó el valor E más alto (0.094), lo que podría indicar que las identidades entre dicha secuencia y 31B pueden deberse a una coincidencia, mientras que *Bt140* y *Bt151* mostraron valores E del 0.013 y 0.022, valores aún muy altos para ser considerados homólogos. Sin embargo, dentro de los resultados arrojados por ConoPrec, es posible apreciar que *LiCr95* obtuvo el mismo porcentaje de identidad que en BLAST (73%) pero obtuvo un valor E más bajo (0.0059), posiblemente debido a que este valor depende directamente del tamaño de la base de datos analizada y, considerando que ConoPrec únicamente utiliza la base de datos de ConoServer (enfocada únicamente a conotoxinas), mientras que BLAST utiliza una base de datos mucho más grande, sería más adecuado tomar con mayor consideración los resultados provenientes de ConoPrec.

Por otro lado, la búsqueda a través de ConoPrec generó tres alineamientos con una identidad del 50% o mayor: *LiCr95*, mencionada en el párrafo anterior, *Fla6.5*, una conotoxina encontrada en *C. flavidus*, perteneciente a la superfamilia O1, con un valor E de 0.0069 y *MiK42*, conotoxina de *C. miles* perteneciente a la superfamilia O1, con un porcentaje de identidad del 50% y un valor E de 0.0069.

Estos resultados indican que *LiCr95* presenta la mayor homología respecto a 31B y, aunque es probable que las conotoxinas *Bt140* y *Bt151* presenten una relación más cercana considerando la longitud de las secuencias alineadas y los valores E que presentan, no se encuentran en la base de datos de ConoServer debido a que no han sido caracterizadas de manera completa. De acuerdo al análisis anterior, si el péptido 31B exhibiera la estructura primaria propuesta en este trabajo, de acuerdo a las superfamilias génicas a las que pertenecen los péptidos con valores E más bajos mencionados antes, esta conotoxina quizás podría acomodarse dentro de la superfamilia A u O1, pero para poder determinar esto con seguridad, es necesario llevar a cabo la secuenciación completa del péptido y obtener su secuencia señal a través de los transcritos presentes en *C. fergusoni*.

De las superfamilias mencionadas anteriormente, la A contiene a cuatro familias farmacológicas de péptidos relativamente hidrofílicos que actúan como antagonistas competitivos de RnACh involucrados en la disrupción neuromuscular: las α -conotoxinas, las $\alpha 1$ -conotoxinas, las αA -conotoxinas y las $\kappa\alpha$ -conotoxinas (McIntosh *et al.*, 2002; Terlau & Olivera, 2004; López-Vera *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2014). De éstas, únicamente dos familias presentan arreglos de cuatro cisteínas (Arias *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2010): 1) la familia de las α -conotoxinas, por lo general con un arreglo de Cys tipo I en los siguientes patrones conservados: CCX₃CX₅C (subfamilia $\alpha_{3/5}$), CCX₄CX₃C (subfamilia $\alpha_{4/3}$) y CCX₄CX₇C (subfamilia $\alpha_{4/7}$) (McIntosh *et al.*, 2002), hecho que disminuiría las posibilidades de que 31B perteneciera a alguna de estas familias considerando el grado de conservación del patrón y 2) la familia de $\alpha 1$ -conotoxinas, en donde se localizan dos conotoxinas hidrofílicas, *Pu14.1a* de *C. pulicarius* y *ts14a* de *C. tessulatus* (Peng *et al.*, 2010), con arreglos de Cys tipo XIV y conectividades entre cisteínas de C1-C3 y C2-C4 respectivamente, capaces de provocar la parálisis y la muerte en peces. Por otro lado, también se han encontrado conotoxinas de la superfamilia génica O1 con patrones de Cys tipo XIV, como las conotoxinas *Mr14.2* y *Mr14.7*, de *C. marmoratus*, y la αO -conotoxina hidrofílica *GeXIVA*, de *C. generalis*, cuyos blancos son RnACh (Dutertre *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2015), lo que podría sugerir que los blancos farmacológicos de 31B podrían ser los RnACh, relacionados con el cabal motriz del veneno, involucrado con la inhibición de la transmisión neuromuscular. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo estudios de electrofisiología y bioensayos para corroborar esto.

Por último, tomando en consideración que los patrones de Cys están altamente conservados en cada superfamilia, un dato que apoya el supuesto anterior es que las Cys de las posiciones ocho y quince del péptido 31B con un patrón CX₆C concordaban con patrones de Cys en las conotoxinas alineadas pertenecientes a la Superfamilia O1 (**Tabla 6 y Tabla 7**) y con los dos primeros residuos de Cys de los patrones en las conotoxinas *GeXIVA*, *Mr14.2* y *Mr14.7* de la superfamilia O1 con arreglos de Cys XIV, reportadas en ConoServer (**Tabla 8**).

Tabla 8. Patrones CX₆C similares entre la estructura primaria del péptido 13B y conotoxinas con arreglos de Cys XIV pertenecientes a la superfamilia O1.

Nombre		Estructura primaria		Aminoácidos
31B	8	CTRWQNH C YDAAMLRPPGNCVVSDC	32	32
GeXIVA	2	CRSSGRY C RSPYDRRRRYCRRITDACV	28	28
Mr14.2	8	CDGVEQN C RYPYCFIVVCL	26	26
Mr14.7	1	CLDGGEI C GICFQAAAVGGALFSSAHETTV	30	43

Nota: Los números azules indican la posición del aminoácido en la secuencia y las letras rojas los residuos de Cys localizadas dentro del patrón.

G3

De acuerdo al perfil cromatográfico del componente G3 (**Fig. 26**), el componente no se encontraba en estado de pureza y mostraba dos hombros ligeros hacia ambos lados de la señal del componente mayoritario. Al analizar el espectro deconvolucionado de la fracción G3 (**Fig. 32**) puede observarse que existe un pico base de 3126.23 Da (que representaría un componente de aproximadamente 26 aminoácidos) y otro con una intensidad relativa de 83% con una masa promedio de 2909.06 (que presentaría alrededor de 24 aminoácidos). La diferencia entre estas dos especies moleculares es de 217.17 Da, lo que podría indicar que se tratan de componentes distintos. Sin embargo, un análisis más a fondo permite la observación de un patrón de incrementos de los valores en la relación m/z de aproximadamente 217 Da entre las señales con masas de 2909.06 Da, 3126.23 Da y 3344.39 Da, así como entre las señales con masas de 3692.47 Da y 3910 Da, que podría indicar la formación de un aducto de sodio y polietilenglicol (PEG), componente encontrado en el detergente Triton, comúnmente utilizado para limpiar espectrómetros. Esto podría indicar que las dos moléculas con mayor intensidad relativa podrían tratarse del mismo componente. Para confirmar esto, es necesario llevar a cabo el análisis de su secuencia, la cual no pudo ser determinada posiblemente debido a que algunas proteínas sufren modificaciones postraduccionales que resultan en el bloqueo del extremo N-terminal con grupos formilo y piroglutamil (Gevaert & Vandekerckhove, 2000), lo que le impide al PITC adherirse al aminoácido, por lo que sería necesario utilizar otra técnica como la secuenciación a partir del extremo C-terminal o generar la ruptura del péptido en fragmentos más pequeños a través de la digestión utilizando a la enzima tripsina para llevar a cabo la secuenciación de los mismos o utilizando enzimas como aminopeptidasas piroglutamato y amino acil péptido hidrolasas para remover los grupos funcionales del extremo N-terminal (Fowler *et al.*, 2001).

En la base de datos de ConoServer existen dos toxinas con masas similares a las obtenidas: la primera, procedente de una conotoxina de 30 aminoácidos clasificada dentro de la superfamilia génica A llamada *Pul14.2* de *C. pulicarius*, un caracol vermívoro del Indo-pacífico, con una masa teórica de 3126.28 Da y un arreglo de Cys XIV, muy similar a la masa mayoritaria arrojada por el análisis de espectrometría y la segunda, procedente de una toxina de 25 aminoácidos clasificada dentro de la superfamilia O1 nombrada *Ai6.2* de *C. ammiralis*, con una masa de 2908.21 Da y un arreglo de Cys VI/VII. El hallazgo de estas conotoxinas y su notable similitud con los componentes desconocidos podrían sugerir que estos últimos presentan una cantidad similar de aminoácidos. Sin embargo, al no tener una secuencia, no es posible corroborar este supuesto.

G6

El perfil cromatográfico correspondiente al componente G6 (**Fig. 27**) mostró una señal bien definida con una absorbancia de 1050 mAU a 220 nm, lo que indicaba que el componente presentó un alto grado de pureza. Sin embargo, el espectro correspondiente a este componente (**Fig. 33**) mostraba un patrón de múltiples iones con cargas de +13 hasta +17 relacionadas con la señal correspondiente a la masa promedio de 19,109.40 Da del espectro deconvolucionado. El espectro arrojado por esta molécula hace evidente la capacidad que la técnica espectrométrica ESI tiene de producir múltiples iones cargados, que incrementan conforme incrementa el peso molecular del analito y, debido al gran tamaño del componente, es posible que dicho componente se tratase de una proteína celular que no logró ser separada del veneno cuando se llevó a cabo la separación del sobrenadante y el precipitado, ya que las toxinas encontrados en *Conus* por lo general presentan de 6 a 40 residuos (López-Vera, 2010). Por otro lado, en el espectro deconvolucionado, también fue posible observar una señal correspondiente a un analito con una masa de 337.27 Da que podría corresponder al detergente Triton en su forma reducida formado por la aducción del sodio a una molécula del detergente (Keller *et al.*, 2008).

G7

El perfil cromatográfico del componente G7 (**Fig. 28**) mostró una señal relativamente bien definida, lo que podría interpretarse como un componente purificado de manera adecuada. Sin embargo, en el espectro obtenido mediante la espectrometría de masas (**Fig. 34**), se logró observar un patrón de múltiples iones con cargas desconocidas con excepción de uno que presentaba una intensidad relativa de 100% con una carga de +12 y un alto grado de contaminación observable en el espectro convolucionado. Este compuesto presentaba una masa de 19110.25 Da en el espectro deconvolucionado, muy similar a aquella presentada por el componente G6 (19,109.40 Da) por lo cual podría tratarse del mismo contaminante presente en la fracción G6 (**Fig. 27**) debido a que presentaban un tiempo de retención muy similar (<1%) utilizando el mismo programa de elución. Al igual que el componente G6, podría tratarse de un péptido de aproximadamente de 160 aminoácidos tomando como base el promedio de los veinte aminoácidos esenciales, lo cual se aleja de manera notoria del tamaño promedio de las conotoxinas.

XI. Conclusiones

- Se determinaron las masas moleculares de seis péptidos caracterizados en este trabajo, de los cuales tres corresponden a los componentes mayoritarios hidrofílicos (25B, 29B y 31B) y tres a los componentes mayoritarios hidrofóbicos (G3, G6 y G7).
- Se logró caracterizar de manera parcial la estructura primaria del péptido 31B, un componente previamente no descrito de acuerdo a la base de datos de BLAST y ConoServer.
- El péptido 31B presenta por lo menos cuatro residuos de Cys que conforman al arreglo XIV y tiene una mayor similitud estructural con los péptidos *Bt140* y *LiCr95* pertenecientes a las superfamilias génicas A y O1, cuyos blancos moleculares son canales de K^+ y Na^+ dependientes de voltaje y receptores de RnACh, que indicaría que 31B podría tratarse de una toxina hidrofílica relacionada con la inhibición de la transmisión neuromuscular de la presa.
- Las técnicas de espectrometría de masas y la degradación de Edman deben realizarse en conjunto para llevar a cabo la caracterización de un péptido.
- Es necesario contar con una mayor cantidad de material para poder llevar a cabo la caracterización completa de los componentes purificados.

XII. Perspectivas

- Una estrategia para obtener más veneno del organismo sin sacrificarlo sería a través del "ordeñamiento", que a su vez podría brindar una fuente de veneno constante.
- Los conopéptidos se deben reducir y alquilar para confirmar la presencia de residuos de Cys presentes en las secuencias.
- Se debe demostrar la actividad de las toxinas sobre diferentes subtipos de RnACh para la identificación de los blancos moleculares. Una estrategia es la expresión heteróloga de éstos RnACh en ovocitos de *Xenopus laevis*, y su posterior evaluación electrofisiológica por medio de la técnica de fijación de voltaje con dos micro electrodos.
- Para obtener la secuencia de G3, es necesario fragmentar al péptido a través de la digestión de la tripsina y desbloquear su extremo N-terminal con las enzimas amino acil péptido hidrolasa y aminopeptidasa piroglutamato, o llevar a cabo la secuenciación a partir del extremo C-terminal.
- Para determinar la superfamilia génica de los componentes, es necesario obtener el prepropéptido a través de los transcritos presentes en *C. fergusonii*.

XIII. Referencias

- Adams, D. J., Callaghan, B., Berecki, G. (2012). Analgesic conotoxins: block and G-protein-coupled receptor modulation of N-type (Cav2.2) calcium channels. *Br. J. Pharmacol.* **166**: 486-500.
- Aguilar, M. I. & Hearn, M. T. W. (1996). High resolution reversed phase high performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Meth. Enzymol.*, **270**: 3–26.
- Aguilar, M. B., Ortiz, E., Kaas, Q., *et al.* (2013). Precursor De13.1 from *Conus delessertii* defines the novel G gene superfamily. *Peptides*, **41**: 17-20.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W. *et al.* (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410.
- Arias, H. R. & Blaton, M. P. (2000). A-Conotoxins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32(10)**: 1017-1028.
- Ashcroft, A. E. (1997). **Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry**. RSC Analytical Spectroscopy Monographs. Cambridge. UK. 186 pp.
- Bailey, A. C. & Bailey, S. P. (1999). **Química Orgánica: Conceptos y Aplicaciones**. Pearson Educación. 5ª ed. Madrid. ES. 513 pp.
- Balaji, R. A., Ohtake, A., Sato, K. *et al.* (2000). Lambda-conotoxins, a new family of conotoxins with unique disulfide pattern and protein folding. Isolation and characterization from the venom of *Conus marmoreus*. *J. Biol. Chem.*, **275(50)**: 39516-39522.
- Banerjee, S. & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2012**: 1-40.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z. *et al.* (2000). The Protein Databank. *Nucleic Acids Research*, **28(1)**: 235-242.
- Bouchet, P., Kantor, Y. I., Sysoev, A. *et al.* (2011). A new operational classification of the Conoidea (Gastropoda). *Journal of Molluscan Studies*, **77**: 73-308.
- Buczek, O., Bulaj, G. & Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **62**: 3067-3079.
- Callaghan, B., Haythornthwaite, A., Berecki, G. *et al.* (2008). Analgesic alpha-conotoxins Vc1.1 and Rg1A inhibit N-type calcium channels in rat sensory neurons via GABAB receptor activation. *J. Neurosci.*, **28**: 10943-10951.
- Carr, D & Nguyen, R. (2013). **Protein and Peptide Analysis and Purification, Vydac Reversed Phase Handbook**. GRACE. 5ª ed. Maryland, US. 91 pp.

- Conticello, S. G., Gilad, Y., Avidan, N., *et al.* (2001). Mechanisms for Evolving Hypervariability: The Case of Conopeptides. *Mol. Biol. Evol.*, **18(2)**: 120-131.
- Craig, A. G., Bandyopadhyay, P. & Olivera, B. M. (1999). Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *Eur. J. Biochem.*, **264**: 271-275.
- Cruz, L. J., Gray, W. R. & Olivera, B. M. (1978). Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **190(2)**: 539-548.
- Dutertre, S., Jin, A. H., Kaas, Q. *et al.* (2013). Deep venomics reveals the mechanism for expanded peptide diversity in cone snail venom. *Mol. Cell. Proteomics*, **12**: 312-329
- Donevan, S. D. & McCabe, R. T. (2000). Conantokin G is an NR2B-selective competitive antagonist of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.*, **58**: 614-623.
- Duda, T. F., Kohn, A. J., Palumbi, S. R. (2001). Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological Journal of the Linnean Society*, **73**: 391-409.
- Endean, R., Izatt, J. (1965). Pharmacological study of the venom of the gastropod *Conus magus*. *Toxicon*, **3(2)**: 81-93.
- Espiritu, D. J. D., Watkins, M., Dia-Monje, V., *et al.* (2001). Venomous cone snails: molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon*, **39**: 1899-1916.
- Floeter, S. R. & Soares-Gomes, A. (1999). Biogeographic and species richness patterns of Gastropoda on the southwestern Atlantic. *Rev. Bras. Biol.*, **59**: 567-575.
- Farries, T. C., Harris, A., Auffret, A. D. *et al.* (1991). Removal of N-acetyl groups from blocked peptides with acylpeptide hydrolase Stabilization of the enzyme and its application to protein sequencing. *Eur. J. Biochem.*, **196**: 679-685.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S. *et al.*, (2003). Coulomb fission: Rayleigh jets from levitated microdroplets. *Nature*, **421**: 128.
- Fowler, E., Moyer, M., Krishna, R. G. *et al.* (2001). Removal of N-terminal blocking groups from proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **11(7)**: 1-11.
- GBIF. (s.f.). *Conus* Linnaeus, 1759. Recuperado el 24 de abril, 2017 de www.gbiforg/species/2303217.
- Gevaert, K. & Vandekerckhove. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*, **21**: 1145-1154.

- Halai, R. & Craik, D. J. (2009). Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.*, **26**: 526-536.
- Hopkins, C., Grilley, M., Miller, C., *et al.* (1995). A New Family of *Conus* Peptides Targeted to the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. *J. Biol. Chem.*, **270(38)**: 22361-22367.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H. *et al.* (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, **40**: 430-443.
- Jha, R. K. & Zi-rong, X. (2004). Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs*, **2**: 123-146.
- Kaas, Q., Westermann, J. C., Dutertre, S. *et al.* (2008). ConoServer, a database for Conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics*, **24(3)**: 445-446.
- Kaas, Q., Westermann, J. C. & Craik, D. J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon*, **55**: 1491-1509.
- Kaas, Q., Yu, R., Jin, A. H. *et al.* (2012). ConoServer: updated content, knowledge, and Discovery tools in the Conopeptide database. *Nucleic Acids Research*, **40(Database issue)**: D325-D330.
- Kaufenstein, S., Porth, C., Kendel, Y., *et al.* (2011). Venomic study on cone snails (*Conus* spp.) from South Africa. *Toxicon*, **57(1)**: 28-34.
- Kaufenstein, S., Huys, I., Kuch, U., *et al.* (2004). Novel Conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails. *Toxicon*, **44**: 539-548.
- Keller, B. O., Sui, J., Young, A. *et al.* (2008). Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **627(1)**: 71-81.
- Kohn, A. J. (1990). Tempo and mode of evolution in Conidae. *Malacologia*, **32(1)**: 55-67.
- Kohn, A. J., Nishi, M. & Pernet, B. (1999). Snail spears and scimitars: a character analysis of *Conus* radular teeth. *J. Moll. Stud.*, **65**: 461-481.
- Lambert, C., Van Campenhout, J., Debolle, X., *et al.* (2003). Review of Common Sequence Alignment Methods: Clues to Enhance Reliability. *Current Genomics*, **4**: 131-146.
- Landa, V., Michel, J. E., Castillo, S. G., Heimer, E. P. (2013). Los caracoles conos de Tenacatita, productores de venenos con potencial biomédico. *Elementos*, **90**: 41-48.
- Layer, R. T. & McInthosh, J. M. (2006). Conotoxins: Therapeutic Potential and Application. *Marine Drugs*, **4**: 119-142.

- Lewis, R. J., Nielsen, K. J., Craik, D. J. *et al.* (2000). Novel ω -conotoxins from *Conus catus* Discriminate Among Neuronal Calcium Channel Subtypes. *J. Biol. Chem.*, **275**: 35335-35344.
- López-Vera, E. (2010). Receptores Nicotínicos de Acetilcolina y las α -Conotoxinas*. *REB.*, **29(1)**: 8-12.
- López-Vera, E., Aguilar, R. M. B., Heimer de la Cotera, E. P. (2006) Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. *Revista Ciencia*, **57(3)**: 47-51.
- López-Vera, E., Aguilar, M. B., Schiavon, E., *et al.* (2007). Novel α -conotoxins from the *Conus spurius* and the α -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Journal*, **274**: 3972-3985.
- Luo, S., Zhangsun, D., Harvey, P. J., *et al.* (2015). Cloning, synthesis, and characterization of α O-conotoxin GeXIVA, a potent α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *PNAS*, **112(30)**: 4026-4035.
- Mant, C. T. & Hodges, R. S. (1996) Analysis of peptides by high performance liquid chromatography. *Meth. Enzymol.*, **271**: 3–50.
- McCarthy, P. J. & Pomponi, S. A. (2004). A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. *Mar. Biomed. Res.*, **2**: 123-146.
- McIntosh, J. M., Dowell, C., Watkins, M., *et al.* (2002). α -Conotoxin GIC from *Conus geographus*, a Novel Peptide Antagonist of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 33610-33615.
- McLean, J. H. & Nybakken, J. W. (1979). On the Growth Stages of *Conus fergusonii* Sowerby, 1873, the Reinstatement of *Conus xanthicus* Dall, 1910, and a New Species of *Conus* from the Galapagos Islands. *The Veliger*, **22(2)**: 135-144.
- Modica, M. V. & Holford, M. (2010). The Neogastropoda: evolutionary innovations of predatory marine snails. *En: Pontarotti, P. (ed.), Evolutionary biology: Concepts, molecular and morphological evolution*: 249-270. Springer Verlag. NY, US.
- Möller, C., Rahmankhah, S., Lauer-Fields, J. *et al.* (2005). A Novel Conotoxin Framework with a Helix-Loop-Helix (Cs α/α) Fold. *Biochemistry*, **44**: 15986-15996.
- Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R. *et al.* (1985). Peptide Neurotoxins from Fish-Hunting Cone Snails. *JSTOR*, **230(4732)**: 1338-1343.
- Olivera, B. M., Miljanich, G. P., Ramachandran, J. *et al.* (1994). CALCIUM CHANNEL DIVERSITY AND NEUROTRANSMITTER RELEASE: The ω -Conotoxins and ω -Agatoxins¹. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**: 823-67.

- Olivera, B. M. (1997). Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell.*, **8**: 2101-2019.
- Olivera, B. M. (2002). Conus Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **33**: 25-47.
- Olivera, B. M. & Cruz, L. J. (2001). Conotoxins in retrospect. *Toxicon.*, **39**: 7-14.
- Paredes, C., Cardoso, F., Altamiranzo, K. *et al.* (2010). La familia Conidae en el mar peruano. *Revista Peruana de Biología*, **17(1)**: 65-73
- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, **3**: 1-9.
- Peng, C., Ye, M., Wang, Y., *et al.* (2010). A new subfamily of conotoxins belonging to the A-superfamily. *Peptides*, **31**: 2009-2016.
- Peng, C., Yao, G., Gao, B., *et al.* (2016). High-throughput identification of novel conotoxins from the Chinese tubular cone snail (*Conus betulinus*) by multi-transcriptome sequencing. *GigaScience*, **5(17)**: 1-14.
- Puillandre, N., Duda, T. F., Meyer, C. *et al.* (2014). One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Journal of Molluscan Studies*, **81(1)**: 1-23.
- Puillandre, N. & Holford, M. (2010). The Terebridae and teretoxins: Combining phylogeny and anatomy for concerted Discovery of bioactive compounds. *BMC Chemical Biology*, **10(7)**: 1-12.
- Puillandre, N., Samadi, S., Boisselier, M-C., *et al.* (2008). Starting to unravel the toxoglossan knot: molecular phylogeny of the “turrids” (Neogastropoda: Conoidea). *Molecular phylogenetics and evolution*, **47(3)**: 1122-1134.
- Quik, M. (2004). Smoking, nicotine and Parkinson’s disease. *TRENDS in Neurosciences*, **27(9)**: 561-568.
- Robinson, S. D., Norton, R. S. (2014). Conotoxin Gene Superfamilies. *Mar. Drugs*, **12**: 6058-6101.
- Robinson, S. D., Safavi-Hemani, H., McIntosh, L. D., *et al.* (2014). Diversity of Conotoxin Gene Superfamilies in the Venomous Snail, *Conus victoriae*. *PLoS ONE*, **9(2)**: 1-13.
- Santos, A. D., McIntosh, J. M., Hillyard, D. R., *et al.* (2004). The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence. *J. Biol. Chem.*, **279**: 17596-17606.

Schulz, J. R., Norton, A. G. & Gilly, W. F. (2004). The Projectile Tooth of a Fish-Hunting Cone Snail: *Conus catus* Injects Venom Into Fish Prey Using a High-Speed Ballistic Mechanism. *Biol. Bull.*, **207**: 77-79.

Sharpe, I. A., Palant, E., Schroeder, C. I. *et al.* (2003). Inhibition of the norepinephrine transporter by the venom peptide χ -MrIA. Site of action, Na⁺ dependence, and structure-activity relationship. *J. Biol. Chem.*, **278**: 40317-40323.

Sigwart, J. D. & Sutton, M. D. (2007). Deep molluscan phylogeny: synthesis of palaeontological and neontological data. *Proc. R. Soc.*, **274**: 2413-2419.

Smith, S. A., Wilson, N. G., Goetz, F. E. *et al.* (2011). Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature*, **480**: 364-367.

Sowerby, G. B. (1873). Description of five new cones. *Proc. Zool. Soc. London*, **10**: 145-146.

Sollod, B. L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., *et al.* (2005). Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries?. *Peptides*, **26**: 131-139.

Taylor, G. (1964). Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London*, **280**: 383-397.

Tenorio, M. J. (2013). *Conus fergusonii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T192566A2117478. Recuperado el 23 de abril, 2017 de <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T192566A2117478.en>.

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

Trussel, G. C. & Etter, R. J. (2001). Integrating genetic and environmental forces that shape the evolution of geographic variation in a marine snail. *Genetica*, **112-133(1)**: 321-337.

Twyman, R. M. (2014). **Principles of Proteomics**. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. NY, USA. 266 pp.

Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. (2009). **Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular**. Editorial Médica Panamericana. 2^a ed. Madrid, ES. 1127pp.

Watson, J. T. (1997). **Introduction to Mass Spectrometry**. Lippincott-Raven Publishers. 4^a ed. Philadelphia, PA, USA. 862 pp.

Wilson, M. J., Zhang, M. M., Azam, L. *et al.* (2011). Na_v β Subunits Modulate the Inhibition of Na_v1.8 by the Analgesic Gating Modifier μ O-Conotoxin MrVIB. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **338**: 687-693.

Wu, Y., Wang, L., Zhou, M. *et al.* (2013). Molecular Evolution and Diversity of *Conus* Peptide Toxins, as Revealed by Gene Structure and Intron Sequence Analyses. *PLoS ONE*, **8(12)**: 1-11.

Yamashita, M. & Fenn, J. B. (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, **88(20)**: 4451-4459.

Zhangsung, D., Luo, S., Wu, Y., *et al.* (2006). Novel O-superfamily conotoxins identified by cDNA cloning from three vermivorous *Conus* species. *Chem. Biol. Drug. Des.*, **68**: 256-265.

XIV. Anexos

Anexo I. Ejemplos de conopéptidos analgésicos.

Nombre	Especie de <i>Conus</i>	Superfamilia	Familia Farmacológica	Arreglo de Cys	Blanco específico	Referencia
MVIIA (Prialt®)	<i>C. magus</i>	O1	ω	VI/VII	Ca _v 2.1 Ca _v 2.2	Olivera <i>et al.</i> , 1985
CVID (AM336)	<i>C. catus</i>	O1	ω	VI/VII	Ca _v 2.1 Ca _v 2.2	Lewis <i>et al.</i> , 2000
Contulaquina-G (CGX-1160)	<i>C. geographus</i>	C	ND	ND	Receptor de neurotensina	Craig <i>et al.</i> , 1999
MrIA (Xen-2174)	<i>C. marmoreus</i>	T	χ	X	Transportador de norepinefrina	Sharpe <i>et al.</i> , 2003
Conantoquina-G (CGX-1007)	<i>C. geographus</i>	B1	ND	ND	Receptor de NMDA	Donevan <i>et al.</i> , 2000
Vc1.1 (ACV-1)	<i>C. victoriae</i>	ND	α	I	Receptores GABA _B acoplados a proteínas G	Callaghan <i>et al.</i> , 2008
MrVIB (CGX-1002)	<i>C. marmoreus</i>	O1	μ	VI/VII	Na _v 1.8	Wilson <i>et al.</i> , 2011

Anexo I. Se muestran algunos ejemplos de conopéptidos utilizados como analgésicos en el tratamiento del dolor neuropático. En la primera columna se observa el nombre del componente seguido por el nombre de su patente en paréntesis; en la segunda, se menciona la especie en la cual fue encontrado el componente; en la tercera, la superfamilia génica a la que pertenece el péptido; en la cuarta, la familia farmacológica a la que pertenece el péptido; en la quinta, el blanco específico de la toxina y en la sexta, las referencias de las publicaciones donde se encontraron dichos hallazgos (tabla modificada de Layer *et al.*, 2006).

Anexo 2. Modificaciones pos-traduccionales de aminoácidos conocidas para las toxinas de *Conus*.

Modificación postraducciona
L-4,5-ditionorvalina
Ácido 2-amino-DL-dodecanoico
2-2-dimetiltiazolidina
3-(S)-fenil-prolina
3-yodotirosina
4-(R)-1-naftilmehil-prolina
4-(R)-amino-prolina
4-(R)-benzil-prolina
4-(R)-betainamidil-prolina
4-(R)-fluoro-prolina
4-(R)-guanidino-prolina
4-(R)-fenil-prolina
4-(S)-amino-prolina
4-(S)-fluoro-prolina
4-hidroxiprolina
5-(R)-fenil-prolina
Ácido 5-amino-3-oxo-pentanoico
5-hidroxi-lisina
Ácido alpha-aminobutírico
Dimetilarginina asimétrica
Benzoilfenilalanina
Bromotriptófano
Amidación del extremo C-terminal
Puente de C [C2 insaturado] (mitad)
Puente de C [C4 saturado] (mitad)
Puente de C [C4 insaturado] (mitad)
Puente de C [C7 insaturado] (mitad)
D-alanina
D-leucina
D-fenilalanina
D-triptófano
D-tirosina
Diyodotirosina
Ácido gamma-carboxiglutámico
Gamma-hidroxi-D-valina
Serina glicosilada
Treonina glicosilada
N-acetato (en extremo N-terminal)
Norleucina
Oxometionina
Ácido piroglutámico
Selenocistina (mitad)
Sulfotirosina

Anexo 2. Modificaciones pos-traduccionales de aminoácidos conocidas para las toxinas de *Conus* (modificado de http://www.conoserver.org/?page=about_conotoxins&bpage=ptm).

Anexo 3. Arreglos de Cys presentes en conotoxinas.

Arreglo	Patrón de Cys	# de Cys	Conectividad
I	CC-C-C	4	I-III, II-IV
II	CCC-C-C-C	6	
III	CC-C-C-CC	6	
IV	CC-C-C-C-C	6	I-V, II-III, IV-VI
V	CC-CC	4	I-III, II-IV
VI/VII	C-C-CC-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI
VIII	-C-C-C-C-C-C-C-C	10	
IX	C-C-C-C-C-C	6	I-IV, II-V, III-VI
X	CC-C.[PO]C	4	I-IV, II-III
XI	C-C-CC-CC-C-C	8	I-IV, II-IV, III-VII, V-VIII
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8	I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII
XIII	C-C-C-CC-C-C-C	8	
XIV	C-C-C-C	4	
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8	I-III, II-IV
XVI	C-C-CC	4	
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8	
XVIII	C-C-CC-CC	6	
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10	
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10	
XXI	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10	
XXII	C-C-C-C-C-C-C-C	8	
XXIII	C-C-C-CC-C	6	
XXIV	C-CC-C	4	
XXV	C-C-C-C-CC-CC	6	
XXVI	C-C-C-C-CC-CC	8	

Anexo 3. Arreglos de Cys conocidos en conotoxinas. La primera columna indica el patrón que presenta, la segunda el número de Cys, la tercera el número de Cys que contiene el arreglo y la cuarta muestra las diferentes conectividades entre residuos de Cys que puede exhibir el arreglo (modificado de <http://www.conoserver.org/?page=classification&type=cysteineframeworks>).

Anexo 4. Clasificación de conotoxinas.

Superfamilia génica	Arreglo de Cys	Familia farmacológica	Blancos específicos
A	I, II, IV, VI/VII, XIV, XXII	α , $\alpha 1$, αA , κ , ρ	RnACh; canales de Na ⁺ y K ⁺ dependientes de voltaje, receptores adrenérgicos Alpha1
B1			
B2	VIII		
B3	XXIV		
C			
D	XX	αD	RnACh
E	XXII		
F			
G	XIII		
H	VI/VII		
I1	VI/VII, XI	ι	Canales de Na ⁺ dependientes de voltaje
I2	XI, XII, XIV	κ	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
I3	VI/VII, XI		
J	XIV	κJ	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
K	XXIII		
L	XIV, XXIV	αL	RnACh
M	I, II, III, IV, VI/VII, IX, XIV, XVI	α , ψ , ι , κM , μ	RnACh, canales de Na ⁺ y K ⁺ dependientes de voltaje
N	XV		
O1	I, VI/VII, IX, XII, XIV, XVI	δ , γ , κ , μO , ω	Canales de Ca ²⁺ , Na ⁺ y K ⁺ dependientes de voltaje
O2	VI/VII, XIV, XV	γ	
O3	VI/VII		
P	IX, XIV		
Q	VI/VII, XVI		
S	VIII	$\alpha S, \sigma$	Receptores de 5-HT ₃ y RnACh
T	I, V, X, XVI	χ , ϵ , μ	Transportadores de norepinefrina, canales de Ca ²⁺ y RnACh
V	XV		
Y	XVII		

Anexo 4. Clasificación actual de las conotoxinas. En la primera columna se nombran las superfamilias génicas conocidas; en la segunda, los arreglos de Cys que se conocen para cada superfamilia; en la tercera las familias farmacológicas conocidas para las superfamilias y en la cuarta, los blancos específicos de las familias farmacológicas (modificado de <http://www.conoserver.org/?page=classification&type=genesuperfamilies>).