



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Estudio toxinológico de *C. fergusonii*: un aspecto ecológico y bioinformático para el estudio de canales iónicos.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

Luis Enrique Montiel Reyes

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Estuardo López Vera

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

COMITÉ TUTOR:

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. Sergio Rodríguez Morales

Facultad de Química Unidad Sisal, UNAM

Dr. Píndaro Díaz Jaimes

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Dr. Marcelino Arciniega Castro

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., Noviembre 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Reconocimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca número 968785

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por formarme profesionalmente en las etapas de licenciatura y maestría.

Al proyecto institucional No. 615 del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

A mi tutor, el Dr. José Estuardo López Vera, por haberme proporcionado el espacio y material necesario para desarrollar mi proyecto de investigación.

A todos los integrantes de mi comité tutorial:

- Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez
- Dr. Sergio Rodríguez Morales
- Dr. Píndaro Díaz Jaimes
- Dr. Marcelino Arciniega Castro

Al laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por el apoyo en la secuenciación de los diferentes péptidos de interés.

Reconocimiento especial al Dr. Marcelino Arciniega Castro por brindarme su tiempo y darme las herramientas necesarias en el análisis bioinformático de mis resultados.

Reconocimiento especial al M.C. Luis Ángel Martínez Hernández por su ayuda durante el proceso experimental de este proyecto.

Agradecimientos

La culminación de este proyecto también es el resultado de un gran esfuerzo por parte colegas, familiares y amigos que siempre me estuvieron apoyando a lo largo de estos años. De manera general, quiero agradecer al Dr. José Estuardo López Vera por haberme brindado la confianza y los conocimientos teóricos y prácticos para realizar mi investigación. Además, a todos mis compañeros del laboratorio de toxicología marina por el soporte técnico y por siempre generar un buen ambiente de trabajo.

De manera particular quiero agradecer a mis padres y hermanos, ya que sin su apoyo, nada de esto pudo ser posible.

A mis amigos Javier, Jonathan y Linda por apoyarme y brindarme su amistad

A Vanessa por siempre estar en los buenos y malos momentos.

Contenido

1.	RESUMEN.....	7
2.	GLOSARIO.....	8
3.	INTRODUCCIÓN.....	10
	3.1 Phylum Mollusca	10
	3.2 Caracoles marinos del género <i>Conus</i>	10
	3.3 Importancia de las conotoxinas dentro del nicho ecológico del género <i>Conus</i>	12
	3.4 Estructura de una conotoxina	12
	3.5 Clasificación de conopéptidos y conotoxinas	13
	3.6 Comunicación celular y conotoxinas	15
	3.7 Canales iónicos	15
	3.8 Estructura de canales iónicos	16
	3.9 Canales iónicos activados por voltaje	17
	3.10 Canales de sodio activados por voltaje	18
4.	ANTECEDENTES	19
	4.1 <i>Conus fergusonii</i>	19
	4.2 Efecto del veneno de <i>C. fergusonii</i> sobre diferentes blancos moleculares	20
	4.3 Efecto del veneno de caracoles del género <i>Conus</i> sobre canales Nav	20
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
6.	OBJETIVOS.....	25
	6.1 Objetivo general:	25
	6.2 Objetivos particulares:	25
7.	HIPÓTESIS.....	25
8.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
	8.1 Colecta de organismos	26

8.2 Extracción de veneno.....	27
8.3 Soluciones para extracción de veneno total y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC).....	28
8.4 Fraccionamiento del veneno	28
8.5 Protocolos utilizados para HPLC	28
8.6 Obtención del peso molecular por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	29
8.7 Obtención del peso molecular por ESI	29
8.8 Secuenciación de péptidos por degradación de <i>Edman</i>	29
8.9 Construcción de un modelo tridimensional del péptido de interés	30
8.10 Acoplamiento molecular entre una conotoxina y dos canales de sodio activados por voltaje.....	30
9. RESULTADOS.....	31
9.1 Fraccionamiento del veneno total de la especie <i>Conus fergusonii</i>	31
9.2 Subfraccionamiento del componente en común.....	31
9.3 Espectrometría de masas de las señales mayoritarias purificadas	42
9.4 Purificación de la señal 30 del macho que pertenece a la localidad San Lázaro.....	45
9.5 Determinación de las secuencias por inferencia de peso molecular	48
9.6 <i>BLAST</i> y alineamiento de secuencias en <i>UniProt</i>	49
9.7 Modelo por homología de una conotoxina perteneciente a <i>C. fergusonii</i>	55
9.8 Selección del molde para construir el modelo parcial de la conotoxina N de <i>C. fergusonii</i> con el número de entrada 3975. ...	57
9.9 Modelo parcial de la conotoxina N de <i>C. fergusonii</i> con el número de entrada 3975	57
9.10 Selección del molde para construir el modelo parcial de la conotoxina N de <i>C. fergusonii</i> con el número de entrada 2334 ..	60
9.11 Modelo parcial de la conotoxina N de <i>C. fergusonii</i> con el número de entrada 2334	60
9.12 Acoplamiento molecular de la conotoxina 3975 con los canales Na_v 1.4 y Na_v 1.5.....	63
9.13 Interacción energética entre la conotoxina N3975 con el canal Na_v 1.4 y el canal Na_v 1.5.....	65
9.14 Conotoxina N y/o divergente 3975 y canales Na_v 1.4 y Na_v 1.5 visualizados en Pymol	66

9.15 Visualización de la conotoxina N 3975 interactuando con los dominios fragmentados de los canales Nav 1.4 y Nav 1.5 respectivamente	67
10. DISCUSIÓN.....	68
10.1 Hipótesis sobre el área de influencia de los individuos colectados de la especie <i>C. fergusonii</i>	68
10.2 Determinación de la superfamilia de dos conotoxinas aisladas de <i>C. fergusonii</i>	70
10.3 Relaciones filogenéticas de las conotoxinas N y/o divergentes aisladas de <i>C. fergusonii</i>	71
10.4 Evaluación de los modelos tridimensionales de las conotoxinas 3975 y 2334	78
10.5 Análisis del acoplamiento molecular entre la conotoxina N 3975 de <i>C. fergusonii</i> y los canales Nav1.4 y Nav1.5	79
10.6 Sitios de unión propuestos para la conotoxina N 3975 en el canal Nav 1.4.....	81
10.7 Sitios de unión propuestos para la conotoxina N 3975 en el canal Nav 1.5.....	83
11. CONCLUSIONES.....	85
12. PERSPECTIVAS A FUTURO	85
13. REFERENCIAS.....	86
14. APÉNDICE	94
14.1 Figuras suplementarias	94

1. RESUMEN

Los caracoles marinos del género *Conus* son el grupo de invertebrados marinos más abundantes con cerca de 800 especies vivas. Sintetizan de 100 a 200 conotoxinas en sus conductos de veneno. Particularmente, la especie *C. fergusonii* contiene alrededor de 167 conotoxinas, con una gran variedad de superfamilias. Entre ellas, destacan un número significativo de conopeptidos con potencial efecto sobre canales Na_v . En este trabajo evaluamos, en primer lugar, las diferencias de veneno que se dan entre algunas poblaciones de individuos de *C. fergusonii* con el fin de establecer patrones ecológicos y relaciones filogenéticas marcadas por la presencia de un componente en común y/o conotoxina que se presenta en cada perfil cromatográfico; independientemente de la variabilidad biológica observada en el veneno total y abundancia del mismo. Una vez identificado dicho componente en común, se caracterizó por espectrometría de masas y secuenciación por degradación de *Edman*, para su posterior modelado tridimensional por homología. La caracterización arrojó la presencia de dos conotoxinas de la superfamilia N y/o divergentes, de las cuales se resolvió una estructura proteica parcial para cada una. Posteriormente, se realizó acoplamiento molecular (*docking*) con un canal de sodio sensible a TTX (Na_v 1.4) y con un canal de sodio insensible a TTX (Na_v 1.5). La evidencia sugiere que las conotoxinas de superfamilias N y/o divergentes pueden interactuar con el dominio del poro de al menos dos subtipos de canales Na_v .

ABSTRACT

The marine snails of the genus *Conus* are the most abundant group of marine invertebrates with about 800 living species. These organisms produce 100 to 200 conotoxins in their venom ducts. Particularly, species *C. fergusonii* contains around 167 conotoxins, with a great diversity of superfamilies, where some types have effect on sodium channels. In this work we firstly evaluate the venom differences that occur between populations of *C. fergusonii*, to establish ecological patterns and phylogenetic relationships marked by the presence of a common component or conotoxin that is present in any chromatographic profile; regardless of the biological variability observed in the venom and their abundance. When the common component was identified, it was characterized by mass spectrometry and sequencing by Edman reaction. Subsequently the analysis showed the presence of two N or divergent conotoxins; so we built a partial three-dimensional model of both peptides. After that, a molecular docking protein-protein was performed with sodium channels TTX sensitive (Na_v 1.4) and TTX insensitive (Na_v 1.5). The evidence shows that conotoxins N or divergent interact energetically with the pore domain of two subtypes of voltage gated sodium channels.

2. GLOSARIO

Å	Medida en Angstrom
Arg	Arginina
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
Asn	Asparagina
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Género <i>Conus</i>
CA/C α	Carbono en la posición alfa
C β :	Carbonos en la posición beta
CABLAM	Validación de la geometría de CA
COO-	Extremo carboxilo
<i>Cluster</i>	Conjunto de soluciones (<i>members</i>) que tiene el modelo de <i>docking</i> molecular
DI-DIV	Número de dominios que conforman al canal
<i>Docking</i>	Acoplamiento molecular
FFT	Transformada Rápida de Fourier
Glu	Ácido glutámico
IRMSD	Desviación Cuadrática Media de la Raíz de Interfaz
K _v	Canales de potasio activados por voltaje
Lys	Lisina
M	Molaridad
mAU	Unidades de miliabsorbancia
Molusquívoro	Organismos que se alimenta de moluscos
mM	Milimolar

m/z	Masa sobre carga
N-	Extremo amino
nm	Nanómetro
nmol	nanomol
Na _v	Canales de sodio activados por voltaje
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
Outliers	Observación anormal de rotámeros
PA	Potencial de acción
PDB	Protein Data Bank
Piscívoro	Organismo que se alimenta de peces
Rotámero	Conformación en el espacio de la cadena lateral de un aminoácido
S1-S6	Segmentos transmembranales que conforman a cada dominio del canal
S4+	Sensor de voltaje de un canal iónico
SCN	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
Ser	Serina
Vermívoro	Organismo que se alimenta de gusanos
v/v	Volumen sobre volumen

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Phylum Mollusca*

Los moluscos son el segundo *Phylum* más numeroso dentro de los metazoos. Actualmente, se tienen registradas cerca de 93,000 especies vivas; y otras 70,000 especies fósiles. Se caracterizan principalmente por ser animales protostomados, celomados, con simetría bilateral, o parcialmente asimétricos. No se encuentran segmentados; por lo que la cavidad principal del cuerpo está constituida como un hemocele, lo cual significa que el sistema circulatorio es abierto. Todos los órganos del cuerpo están almacenados dentro de una masa visceral en la región dorsal. Además de esto, el cuerpo de los moluscos, está cubierto por una capa extradérmica y extracuticular conocida como manto; en este se encuentran los ctenidios, osfradios, nefridioporos y glándulas especializadas que secretan espículas o conchas de naturaleza calcárea. En la región ventral, se encuentra el pie, para dar soporte, fijación y movilidad al animal (Figura 1A). En el caso particular del género *Conus*, pertenecen a la clase gasterópoda y orden neogasterópoda, el cual se caracteriza por tener un ctenidio monopectinado, un osfradio bipectinado y el manto forma un sifón, dentro de un mismo canal (Figura 1B). Además, pertenecen al suborden toxoglossa que se caracteriza por la presencia de una rádula con múltiples dientes quitinosos modificados en forma de arpón, que le servirá para alimentarse de diferentes presas (Figura 1C) ¹.

3.2 Caracoles marinos del género *Conus*

El género *Conus* perteneciente a la familia Conidae, cuenta con el mayor número de especies vivas de invertebrados marinos. Dependiendo del tipo de clasificación y del registro fósil, se han reportado cerca de 800 especies ^{2 3}. De acuerdo con Alan Khon, quien es una de las autoridades en el tema, el género *Conus* evolucionó a partir del linaje de los túrridos hace unos 55 millones de años (eoceno temprano) en las costas que actualmente pertenecen a Francia e Inglaterra. Cabe mencionar, que a partir de la aparición de este género, sus poblaciones sufrieron diferentes procesos de radiación y extinción, hasta llegar a una disminución al 11%, que es el porcentaje de especies que se encuentran vivas actualmente ⁴.

Para diferenciar entre especies de *Conus*, las clasificaciones están basadas en caracteres fenotípicos como el tamaño y la forma de la concha, así como el patrón de pigmentación. También pueden establecerse diferencias en cuanto a la distribución geográfica, tipo de alimentación, análisis de secuencias a través de técnicas de biología molecular y herramientas bioinformáticas ^{5 6 7}.

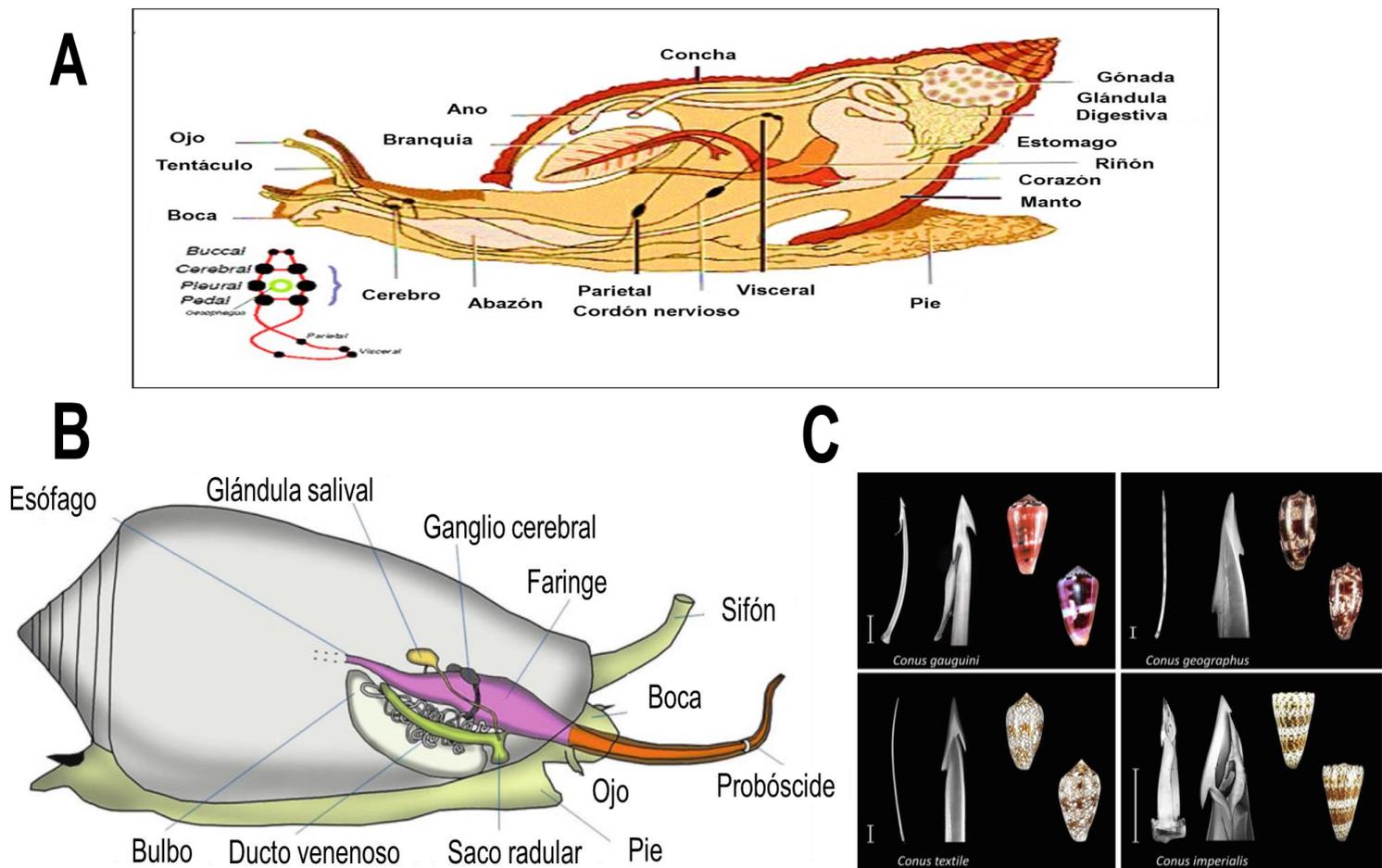


Figura 1. Plan corporal de un gasterópodo ⁶ y un caracol marino del género *Conus* ⁸ A) Esquema que describe de manera general el plan corporal de un gasterópodo. Como puede observarse, estos organismos se caracterizan por concentrar todos sus órganos en una masa visceral conocida como manto. Además, contienen glándulas calcáreas que secretan carbonato de calcio para la formación de una concha característica. B) Esquema que describe de manera general el plan corporal del género *Conus*, destacando el sifón, la probóscide, ducto venenoso, entre otros. C) Micrografía electrónica en escala de 1 mm. Se muestra la rádula y fotografías de la concha de varias especies de *Conus*. *C. gauquini* y *C. geographus* (piscívoros), *C. textile* (molusquívoros) y *C. imperialis* (vermívoros).

3.3 Importancia de las conotoxinas dentro del nicho ecológico del género *Conus*

Las especies de este género son depredadores carnívoros de presas particulares. Básicamente pueden dividirse en aquellos que son piscívoros, vermívoros y molusquívoros. Sin embargo, también se ha observado que pueden alimentarse de algunos hemicordados y equiuridos ⁹. Esta diversidad de presas se dio gracias al éxito evolutivo de los *Conus*, que está basado en el desarrollo de mecanismos moleculares que permitieron la síntesis de veneno constituido de diferentes tipos de toxinas ^{10 11}. Estas toxinas, llamadas conotoxinas, juegan un papel fundamental en la biología de estos moluscos. Debido a las características del ambiente marino, su veneno funciona como un mecanismo de defensa en contra de potenciales depredadores y como una herramienta para cazar a sus presas.

A pesar de su similitud morfológica, cada especie de *Conus* sintetiza un tipo de veneno en particular dependiendo su hábitat y su dieta ¹². De forma interesante, las especies de este género sintetizan en sus venenos alrededor de 100 a 200 péptidos o conotoxinas, con un tamaño promedio de 30 aminoácidos. Se ha demostrado que estos péptidos, son moléculas potencialmente activas por tener un efecto selectivo sobre diversos receptores y/o canales iónicos activados por voltaje ¹³. En México, existen cerca de 73 especies; 37 en el Océano Pacífico y 36 en el Océano del Atlántico. No obstante, existen pocos trabajos que estudian los aspectos ecológicos de estas toxinas en el ambiente marino donde habitan estos caracoles ¹⁴.

3.4 Estructura de una conotoxina

Estudios de biología molecular realizados con la especie *C. textile* mostraron evidencia acerca de la codificación de diferentes exones que se encuentran separados por largas secuencias de intrones y que traducen un ARNm que da lugar a un prepéptido que sufre un corte a través de reacciones proteolíticas en regiones específicas ^{15 16}. La región del carboxilo terminal (COO⁻) del precursor de las conotoxinas maduras es altamente variable; mientras que la región del amino terminal (NH₂), que corresponde a la secuencia señal y al propéptido, es altamente conservada (Figura 2). De manera general, la secuencia señal contiene en promedio 20 aminoácidos; mientras que el propéptido y la proteína madura son más variables, ya que pueden contener de 20 a 60 y 11 a 49 aminoácidos, respectivamente. Incluso, en ciertas toxinas, se presenta una región conocida como postpéptido que se encuentra después de los residuos pertenecientes a la toxina madura. Sin embargo, el 80% de los conopéptidos presentan longitudes de entre 12 y 33 aminoácidos ¹⁷.

3.6 Comunicación celular y conotoxinas

La comunicación celular es un proceso complejo, que requiere la participación de diferentes moléculas. Dicho proceso es vital para realizar cualquier función biológica; desde la síntesis de una proteína, hasta un potencial de acción en el cerebro. Por lo tanto, existe variabilidad entre las moléculas precursoras de la comunicación celular, incluidos iones, péptidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, etc. Para el caso particular de los iones, resalta la importancia de la excitabilidad celular por el flujo de corrientes iónicas, lo cual es muy importante para todas aquellas células que se localizan en tejidos excitables de diversas especies ¹⁸. Entonces, si hay moléculas que transmiten información, se requieren de receptores celulares que puedan recibir, leer y codificar cualquier mensaje biológico. De manera general, se conocen tres tipos: 1) Receptores asociados a enzimas con actividad catalítica, 2) Receptores acoplados a proteínas G, 3) Receptores que forman canales iónicos ¹⁹.

Durante las últimas décadas, se han estudiado los caracoles marinos del género *Conus* con un enfoque toxinológico ²⁰. Se ha observado que el efecto agonista o antagonista de las conotoxinas puede servir como una herramienta farmacológica para la identificación de receptores o canales iónicos, así como su estructura-función. Los canales iónicos empezaron a ser identificados como blancos terapéuticos para tratar diferentes patologías como dolor crónico, hipertensión, ataxia cerebelosa, cáncer y algunos desórdenes psiquiátricos, etc. ²¹ Específicamente, las conotoxinas están divididas en diferentes familias farmacológicas, donde destacan la familia alfa (α), la cual tiene como blanco molecular a los receptores nicotínicos de Acetilcolina (nAChR); la familia de mu-conotoxinas (μ), las kappa-conotoxinas (k) y las omega-conotoxinas (ω), las cuales se asocian con canales de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{+2}), respectivamente ²².

3.7 Canales iónicos

Específicamente, los canales iónicos son proteínas que se encuentran en la membrana celular, pero también en otros orgánulos como núcleo, mitocondrias y cloroplastos. Suelen tener una mayor importancia dentro del sistema nervioso central. Sin embargo, todas las células, tanto de organismos unicelulares y multicelulares, incluyendo plantas y animales, utilizan estas proteínas para una gran variedad de funciones ¹⁸. La función principal de los canales consiste en permitir la entrada y salida de iones (Na^+ , Ca^{+2} , K^+ , Cl^-) a través de la membrana para la transmisión de señales eléctricas que generan la excitabilidad celular, y/o la inhibición de la excitación celular ²³.

Como consecuencia de esta propagación eléctrica a través del tejido celular, se genera la despolarización y repolarización de la membrana, potenciales de acción, contracción del músculo, expresión genética para el caso de calcio, etc. Sin embargo, es importante mencionar que en los últimos años también se ha encontrado una relación de los canales con la comunicación o señalización química, ya que estos pueden ser regulados río abajo por otros mensajeros ^{24 25}.

Los canales iónicos se han ido clasificando de acuerdo a sus propiedades estructurales y funcionales (Figura 4). Sin embargo, existen algunas características compartidas entre estos tipos de receptores independientemente del linaje celular en que se encuentren. Por ejemplo, el flujo de iones a través del poro es pasivo, es decir, no requiere de energía. Además, la apertura y cierre del canal, promueve cambios de configuración en la proteína ^{19 18}. Actualmente se tienen bien caracterizadas las filogenias de los canales iónicos. Esto sirve como herramienta cuando se quieren realizar estudios comparativos entre las secuencias de aminoácidos que regulan diferentes funciones del canal o para identificar alguna subfamilia de canales que se encuentran en una especie en particular.

3.8 Estructura de canales iónicos

A pesar de que el estudio de los canales iónicos comenzó en el siglo pasado con el axón de calamar gigante, tuvieron que pasar algunas décadas para conocer su estructura molecular. Gracias al uso de diferentes técnicas como el registro de corrientes macroscópicas usando bloqueadores selectivos, diferentes protocolos de estimulación, iones inorgánicos y enzimas se pudieron obtener algunos datos acerca de la posible conformación molecular de los canales iónicos ²⁶. Los canales iónicos generalmente están compuestos de entre cuatro a seis dominios homólogos estructuralmente. En el caso de los canales dependientes de voltaje (Na^+ , Ca^{2+} , K^+), hay repeticiones de dominios estructuralmente similares dentro de una proteína. Cada proteína se desliza hacia atrás y adelante a través de la membrana de dos a seis veces. La interacción simétrica entre las subunidades genera la formación del poro por donde fluyen los iones.

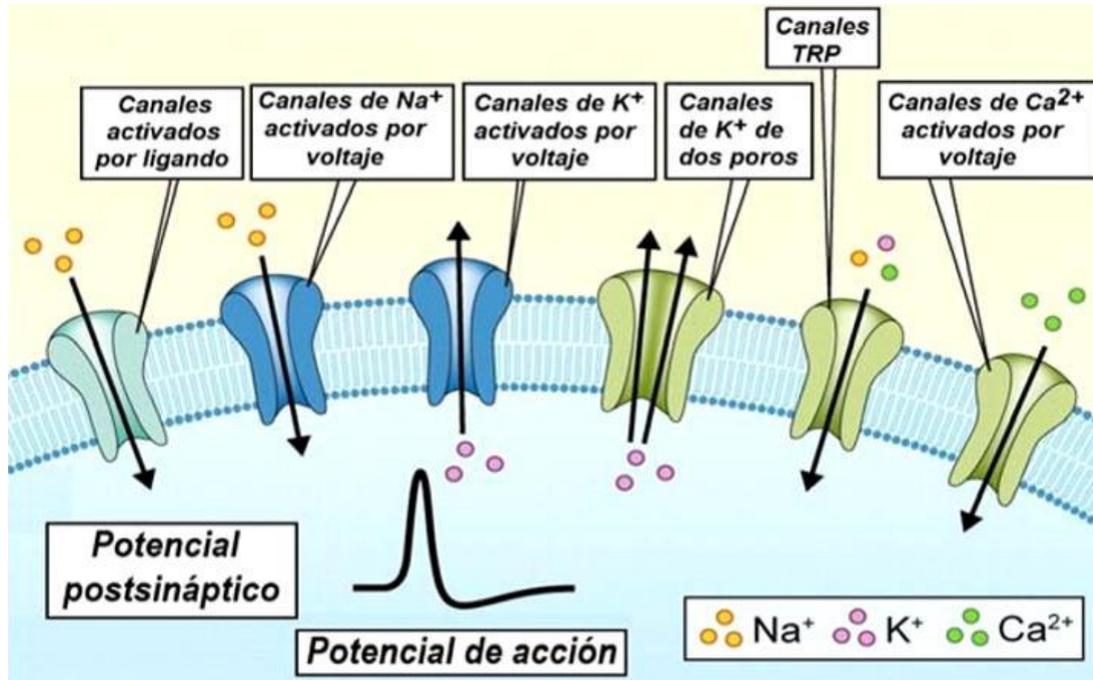


Figura 4. Clasificación de canales iónicos ²⁷. Estas proteínas se dividen de acuerdo a su función, ya que algunos son activados por ligando, voltaje, pH, presión y temperatura.

3.9 Canales iónicos activados por voltaje

Los canales iónicos activados por voltaje forman una superfamilia de complejos proteicos transmembranales que comprende a los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} ¹⁸. Ellos comparten varias características estructurales y funcionales. La subunidad α que forma el poro es la estructura proteica básica de estos canales. No obstante, esta subunidad presenta variaciones dependiendo del tipo de canal que se trate. Contiene cuatro dominios homólogos (I a IV) unidos entre sí por asas intracelulares. Cada dominio está compuesto por seis segmentos transmembranales (S1 a S6), interconectados por asas intra y extracelulares ²⁸. En el dominio S4, se encuentra el sensor de voltaje conformado por tres residuos de arginina, los cuales sufren un cambio conformacional para promover la activación y la apertura del canal.

3.10 Canales de sodio activados por voltaje

Se identifican a los canales de sodio voltaje dependientes como los principales aportadores del potencial de acción en neuronas y células pertenecientes a tejido excitable. Incluso, fueron las primeras corrientes iónicas que se registraron en la placa neuromuscular en el axón de calamar gigante a través de los trabajos de ²⁹. El estudio de esta familia de proteínas se desarrolló durante la década de los setenta y los primeros estudios que se realizaron se basaron en registrar el flujo de corriente hacia adentro y fuera de la membrana (inward outward por sus acrónimos) y en evaluar la alta afinidad de neurotoxinas que ya se habían aislado y en establecer los protocolos necesarios para la solubilización de los canales y purificación con detergentes ^{30 31}.

Los canales Na_v están compuestos por una subunidad α de 4 dominios (Figura 5A, 5B), la cual está codificada por un polipéptido que puede variar en un rango de 1700-2000 aminoácidos y dos o una subunidades beta auxiliares, con un bajo peso molecular (~45 KDa). El número de subunidades beta (β) que acompañan al canal, dependen del tejido donde se encuentre, siendo una subunidad β para sistema nervioso central y dos subunidades β para tejido muscular ³². Hasta el momento, se han identificado nueve subunidades α o subtipos de canales de sodio activados por voltaje que codifican para las subfamilias Na_v 1.1 a Na_v 1.9 ³³. Las diferencias entre las subfamilias de canales Na_v , están basadas en estructura y función. La primera, hace referencia al número y tipo de aminoácidos que codifican para las dos subunidades (α , β). La segunda diferencia, se ve reflejada en las propiedades biofísicas de las corrientes evocadas por cada subtipo de canal ^{34 31 35}.

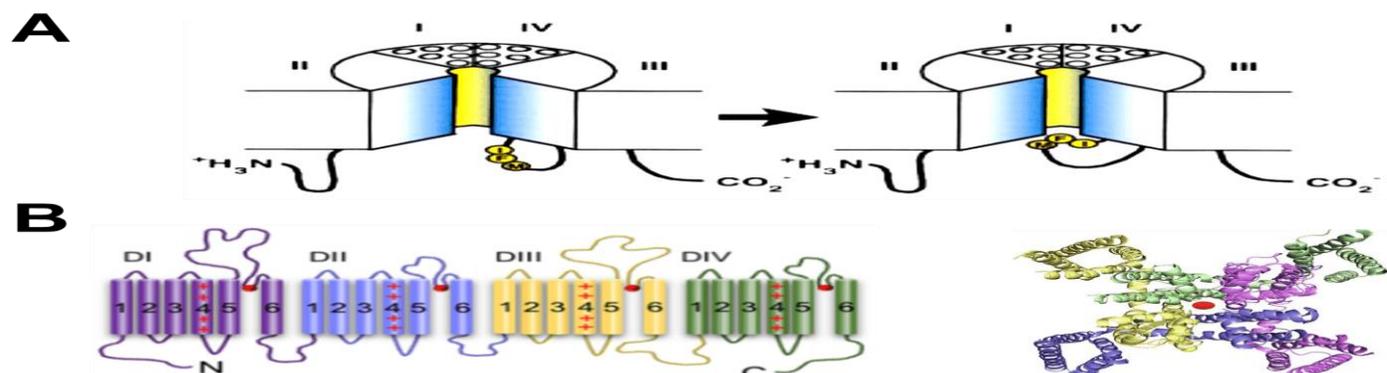


Figura 5. Representación gráfica de un canal de sodio activado por voltaje A) se observa la topología de un canal de sodio, donde se pueden apreciar los cuatro dominios que forman la subunidad alfa. ³¹ B), se muestran los 24 segmentos transmembranales que conforman los 4 dominios que forman el poro de conducción de ion. Además, en la parte inferior derecha del mismo panel, se muestra la subunidad alfa representada en forma de *cartoons* para apreciar las alfa hélices y el dominio del poro en el centro del canal ³⁶.

4. ANTECEDENTES

4.1 *Conus fergusonii*

Esta especie fue descrita por George B. Sowerby II en 1873. En cuanto a su morfología, estos caracoles tienen un tamaño por encima del promedio del género *Conus* (60 mm a 150 mm). Presenta variabilidad en cuanto a la proporción y altura de la concha. Además, es común que pierdan la coloración típica de bandeo y manchas de diferentes proporciones en el estadio juvenil (Figura 6A). La concha tiene alrededor de doce o trece giros; la espira ligeramente elevada y un contorno cóncavo. Es una de las pocas especies que en su estadio juvenil, muestra un diente radular, a diferencia de especímenes adultos^{37 38}. Estos organismos, viven en mares con climas templados y cálidos. Son bentónicos y se pueden encontrar desde la zona intermareal, hasta una profundidad aproximada de 1,000 metros. Además, habitan en diferentes tipos de sustrato como fondos rocosos, arenosos, fangosos, arrecifes de coral y fondos cubiertos por vegetación. *Conus fergusonii*, se distribuye en el Océano Pacífico, desde las costas de Baja California, hasta las costas de Perú y las islas Galápagos en Ecuador^{39 40 41}. (Figura 6B). Se alimenta principalmente de poliquetos; por lo tanto, puede considerarse vermívoro.

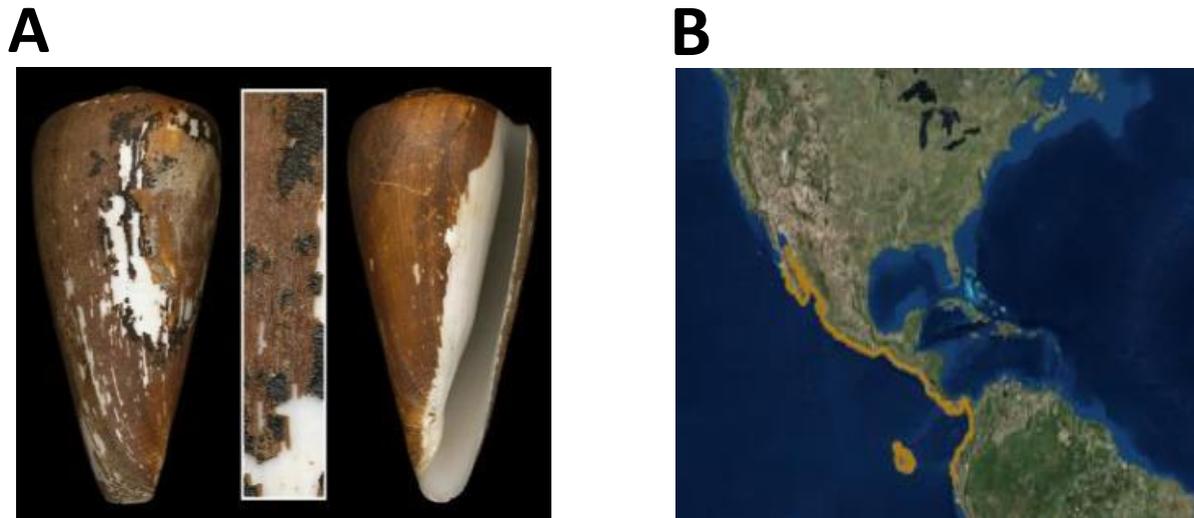


Figura 6. A) Mapa en el que se delimita con una línea amarilla la zona biogeográfica ocupada por la especie *C. fergusonii*. Se ubica en la región del Océano Pacífico; desde el mar de Cortez, hasta Perú.³⁹ **B)** Concha característica de la especie. Vista dorsal, acercamiento del peristraco y vista ventral³⁹.

4.2 Efecto del veneno de *C. fergusonii* sobre diferentes blancos moleculares

Actualmente, no se tienen reportes publicados sobre las bases moleculares de las diferentes conotoxinas que componen el veneno de *C. fergusonii*. Tampoco hay reportes de los tipos de receptores celulares que interactúan con los conopeptidos que sintetiza. Sin embargo, en el Laboratorio de Toxinología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de las UNAM ya se han aislado algunos péptidos con actividad biológica (datos no publicados). Hasta el momento, se tienen algunos resultados preliminares del efecto de bloqueo sobre receptores nicotínicos de acetilcolina activados por ligando; y posiblemente, sobre canales iónicos de sodio y potasio activados por voltaje.

En particular, estudios de transcriptómica realizados a partir de conducto venenoso indican la presencia de conotoxinas de las superfamilias I, M y O para la especie *C. fergusonii*. Si bien se utilizan los blancos moleculares que tienen las conotoxinas para evaluar su efecto electrofisiológico, este método podría servirnos para extrapolar hacia posibles conclusiones acerca del nicho ecológico de estos caracoles, la dieta que consumen y todas aquellas variables que podrían estar afectando la composición de su veneno, por ejemplo, agentes contaminantes ⁴², ciclo de vida ⁴³, competencia intra e interespecífica ⁴⁴ conductas de depredación o defensa ^{45 46} y diferencias físico-químicas entre las diferentes zonas biogeográficas que ocupan los caracoles del género *Conus* ⁴⁷.

4.3 Efecto del veneno de caracoles del género *Conus* sobre canales Nav

Las evidencias sugieren que el veneno de los caracoles marinos del género *Conus* contiene péptidos que actúan como potenciales agonistas o antagonistas de nueve de las subunidades alfa de canales Nav ¹⁷. La mayoría de estos conopeptidos comparten sitios de unión y actividad biológica con otros bloqueadores específicos que también son aislados de especies marinas ⁴⁸, por ejemplo, la tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX), que ejercen su efecto mediante la bioacumulación en tejidos. Particularmente, se ha observado que las familias de μ , μO y δ conotoxinas no solamente tienen un efecto sobre la densidad de corrientes de sodio, sino que también modifican las propiedades biofísicas del canal, retrasando la activación de los mismos ^{49 50}.

Por otra parte, es bien conocido que hay ciertas subunidades de canales Nav que son insensibles a TTX en el orden de mM y μM . Este es el caso de Nav 1.5, Nav 1.8 y Nav 1.9, las cuales no poseen un anillo aromático en la posición 385 del dominio I ^{51 52}. De esta manera, el intercambio de una cisteína por una tirosina disminuye la sensibilidad de este grupo de canales Nav a TTX y STX. Incluso, también se reduce la afinidad por bloqueadores inorgánicos como el Cd^{2+} . Sin embargo, ya se han

descubierta algunas conopéptidos que presentan afinidad y/o selectividad por ciertos canales Na_V insensibles a TTX ⁵³. Este es el caso de la conotoxina *SmIIIA* aislada de la especie *Conus stercusmuscarum*, la cual se caracteriza por ser el primer bloqueador orgánico que actúa como antagonista para bloquear las corrientes iónicas de sodio de al menos un canal resistente a TTX. Este efecto es más claro en el subtipo $\text{Na}_V1.5$ (Figura 7). También, han sido registradas las especies que contienen péptidos potencialmente bloqueadores de canales de sodio, ya sea musculares, neuronales o de tejido esquelético (Tabla 2 y 3). Por lo tanto, el conocimiento de las conotoxinas es fundamental para diferentes estudios de estructura-función. Además, son de gran importancia para discriminar entre diferentes subunidades de canales iónicos, y por consiguiente, útiles en la búsqueda de blancos terapéuticos que estén distribuidos en células musculares o neuronales ^{54 55}.

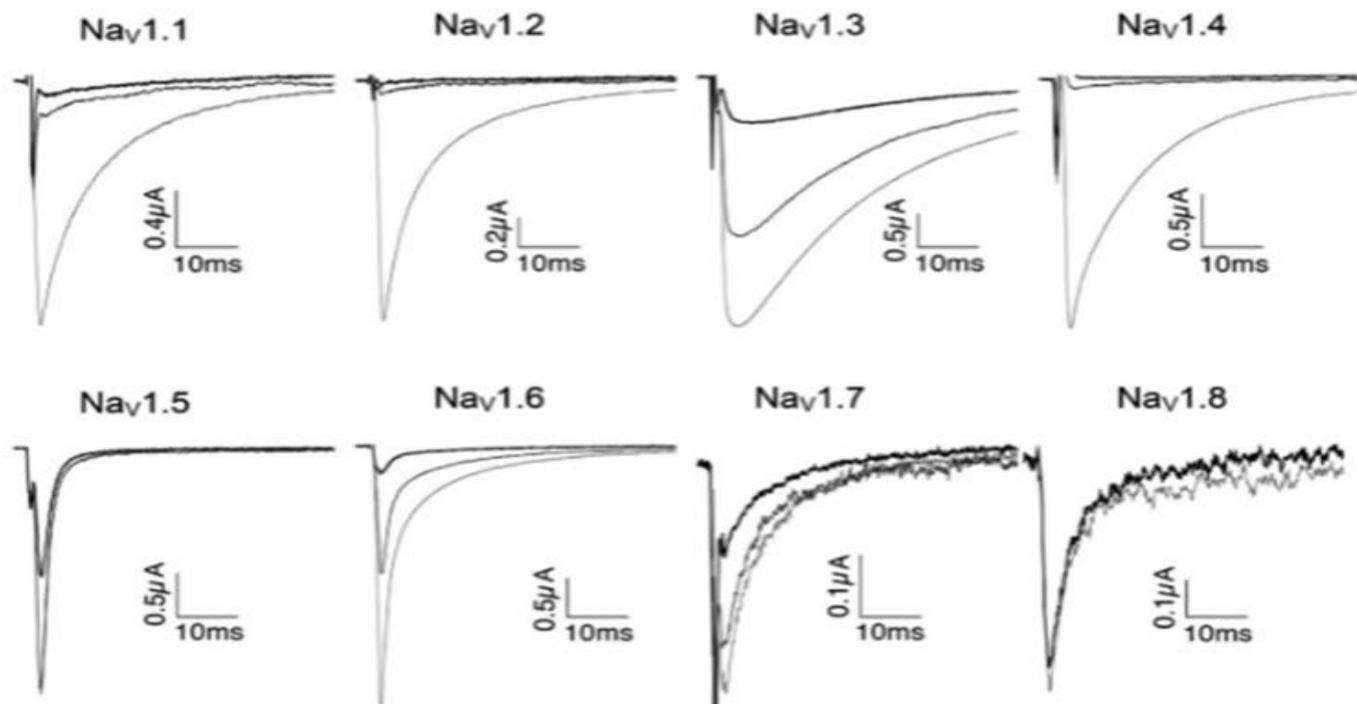


Figura 7. Efecto del bloqueo de la conotoxina *SmIIIA* sobre 8 de las 9 subunidades de canales de sodio. ⁵¹ Las corrientes iónicas del orden de μA se registraron en clones de canales de sodio aislados de rata, excepto para el canal $\text{Na}_V 1.6$, que pertenece a ratón. El potencial de mantenimiento fue de -80 mV para todos los canales, excepto para el $\text{Na}_V 1.8$ que se mantuvo a -100 mV . Por otro lado, la despolarización de la membrana se llevó desde -20 mV a 20 mV durante 50 ms .

De esta manera, con la información recabada de manera experimental sobre el veneno contenido en los conductos de *C. fergusonii*, se puede especular que alguno de los componentes podrá interactuar con algún subtipo de canales Nav. Además, recordemos que en la literatura ya se han descrito diferentes sitios de unión para toxinas en canales Nav. Por eso, cabe la probabilidad de interacción energética (al menos en términos electrostáticos) con las conotoxinas de *C. fergusonii*. De acuerdo a dos grupos de autores ^{56 57}, son 5 sitios que interactúan con algún péptido en particular, de acuerdo a su composición y por su origen o taxón del cual fueron aislados (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes sitios de unión a toxinas que se han descrito para canales de sodio dependientes de voltaje ⁵⁶.

Toxinas	Mecanismo de acción	Sitio de unión
Tetrodotoxina, saxitoxina, μ -conotoxina	Inhibición de la conductancia por obstrucción del poro del canal.	Glu 387 del DI Regiones del S5 y S6 de cualquier dominio I; Lys 1422 del DIII
Grayanotoxina, veratridina, aconitina y batracotoxina	Activación persistente debido al cambio en la sensibilidad al voltaje.	S6 del DI Algunas regiones del DII y IV Asa P del dominio III
α Escorpiotoxinas, β pompilidotoxina, y toxinas de anémonas	Bloqueo y enlentecimiento de la inactivación del canal. Prolongan la duración del potencial de acción.	S3 y S4 del DIII
β Escorpiotoxinas	Desplazan la activación de canales a valores más negativos. Se induce actividad neuronal espontánea y el bloqueo es independiente del potencial de membrana.	Segmento S6 del DI Segmento S5 del DI Secuestran el S4 del DII
Brevetoxinas, ciguatoxinas	A diferencia de los sitios 2 y 3, el mecanismo de acción actúa cuando el canal no está cerrado o inactivado. El umbral de activación se mueve a potenciales hiperpolarizantes con cinéticas extremadamente lentas.	Segmento S5 y S6 del dominio IV

Tabla 2. μ -CTX aisladas de diferentes especies y el efecto que tienen sobre diferentes canales Na_v neuronales, musculares o esqueléticos ⁴⁹.

Especies	μ-CTX	Subtipo Na_v	Distribución	Efecto biológico
<i>C. geographus</i> 	μ -GIIIA μ -GIIB	1.1, 1.2, 1.4, 1.6	Músculo	Placa muscular P.A.
<i>C. purpurascens</i> 	μ -PIIA	1.4	Músculo	Placa muscular P.A.
<i>C. striatus</i> 	μ -SIIIA μ -SIIB	1.2, 1.4, 1.6	SNC, músculo, neuronal	Analgésico
<i>C. stercusmuscarum</i> 	μ -SmIIIA	TTX resistente 1.1, 1.2, 1.3, 1.5	SNC, SNP, corazón	Neuronas sensoriales
<i>C. kinoshitai</i> 	μ -KIIIA μ -KIIB	TTX resistente 1.1, 1.2, 1.4, 1.7	SNC, corazón, neuronal	Analgésico
<i>C. tulipa</i> 	μ -TIIIA	1.2, 1.4	SNC, músculo, neuronal	Desconocido
<i>C. bullatus</i> 	μ -BuIIIA μ -BuIIB	1.2, 1.3, 1.4	SNC, SNP	Placa muscular Esquelético
<i>C. striolatus</i> 	μ -SxIIIA μ -SxIIB	1.1, 1.2, 1.4, 1.6	Esquelético	Inhibición Placa muscular
<i>C. catus</i> 	μ -CnIIIA μ -CnIIB	TTX resistente	Esquelético Neural	Inhibición P.A.
<i>C. consor</i> 	μ -CnIIC	1.2, 1.4	Neural	Analgésico Miorrelajante
<i>C. magnus</i> 	μ -MIIIA	TTX resistente 1.1 a 1.8	Esquelético Neural	Desconocido
<i>C. tessulatus</i> 	μ -TsIIIA	TTX resistente	Desconocido	Desconocido

Tabla 3. μ -O CTX aisladas de diferentes especies con efecto sobre diferentes subtipos de canales Na_v distribuidos en tejido neuronal, muscular o esquelético ⁴⁹.

Especies	μO-CTX	Subtipo Na_v	Distribución	Efecto biológico
<i>C. marmoratus</i> 	μ O-MRVIA μ O-MRVIB	Sensible a TTX 1.2, 1.4 1.8	SNC, músculo, neuronal	Actividad Analgésica
<i>C. magnificus</i> 	μ O-MfVIA	1.4, 1.8	Músculo, Neuronal	Actividad Analgésica
<i>C. geographus</i> 	μ O-GVIIJ	Subtipo Na_v	Desconocido	Desconocido

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los caracoles marinos del género *Conus* presentan una gran diversidad de toxinas que se pueden encontrar en cada especie. La variabilidad en cuanto a la forma y potencia de veneno está en función de la biología per se de estos organismos y su amplia distribución en las zonas tropicales y subtropicales de los Océanos Índico, Atlántico y Pacífico. Particularmente, el género *Conus* se distribuye en ambas costas de nuestro país; pero hay poco conocimiento sobre la composición del veneno de cada una de las especies que habitan en las costas mexicanas, así como del efecto de su veneno sobre posibles blancos moleculares. Por lo tanto, estos organismos ofrecen una plétora de pequeñas moléculas que pueden servir como herramientas moleculares para dilucidar la estructura-función de diferentes receptores y/o canales iónicos de membrana; por ejemplo, los canales de sodio activados por voltaje. Además, los conopéptidos tienen potencial para el desarrollo de posibles fármacos. Asimismo, el estudio de conotoxinas sobre un blanco molecular en particular ampliaría el conocimiento sobre la historia evolutiva de la aparición y diversificación de toxinas en la clase gasterópoda y el nicho ecológico del género *Conus*. De esta forma, podremos entender más sobre la biología de estos organismos y su interacción con el medio ambiente marino. En este proyecto de investigación nos enfocaremos a estudiar y caracterizar bioquímicamente y funcionalmente, al menos una toxina de *C. fergusonii* con efecto sobre receptores celulares que podrían ser un blanco terapéutico para tratar diferentes patologías. Por otro lado, también puede aislarse algún componente de veneno que interactúe con la actividad metabólica de alguna especie en particular.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Caracterizar bioquímicamente una(s) conotoxina(s) con actividad sobre algún receptor celular y/o canal iónico.

6.2 Objetivos particulares:

- Dilucidar posibles diferencias en la composición del veneno de *C. fergusonii* entre individuos de diferentes localidades y/o entre hembras y machos.
- Determinar si existe algún componente en común entre individuos de diferentes localidades y/o entre hembras y machos.
- Definir el posible blanco molecular de la conotoxina caracterizada.
- Inferir la importancia del posible blanco molecular dentro del nicho ecológico de la especie.

7. HIPÓTESIS

- Debido a las diferencias de nicho ecológico y a las diferencias determinadas por el sexo que presentan una gran cantidad de especies biológicas, es probable que se observen distintos perfiles cromatográficos para cada uno de los individuos de *C. fergusonii*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Colecta de organismos

Los caracoles marinos de la especie *Conus fergusonii* fueron capturados en las costas de Baja California y Mazatlán, gracias a colectas organizadas por el Laboratorio de Invertebrados Marinos de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa. En total, se muestrearon cinco localidades: San Lázaro, Santo Domingo, Isla Altamura, Piaxtla y San Mármol (Tabla 4). Una vez capturados, los organismos fueron trasladados al laboratorio para ser identificados por la clasificación de Sowerby II (1873). Además, todos los individuos fueron sexados y disectados. Los conductos venenosos que se extrajeron fueron almacenados en tubos de polopropileno (“Eppendorf”) de 1.5 ml y mantenidos con solución de extracción y hielo seco para evitar su descomposición. Dichos conductos, fueron donados amablemente por la Doctora Mónica Ortiz de la Universidad de Sinaloa, al Laboratorio de Toxinología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en Ciudad Universitaria UNAM.

Tabla 4. Diferentes zonas de colecta para individuos de la especie *C. fergusonii*.

Especie	Localización	Localidad	Latitud	Longitud	Profundidad	Tiempo de arrastre
<i>C. fergusonii</i>	Sinaloa	Piaxtla	23°36'9''N	106°49'40''W	29.26 m	2 horas
<i>C. fergusonii</i>	Baja California Sur	Santo Domingo	25°36'6''N	112°10'8''W	25.60 m	6 horas
<i>C. fergusonii</i>	Sinaloa	Isla Altamura	24°53'05''N	108°25'8''W	58 m	3 horas
<i>C. fergusonii</i>	Sinaloa	Mármol	23°27'55''N	106°42'55''W	27.43 m	3 horas
<i>C. fergusonii</i>	Baja California Sur	San Lázaro	24°43'07''N	112°11'2''W	20.11m	3 horas

8.2 Extracción de veneno

Antes de la extracción del veneno, los conductos venenosos fueron medidos para estimar indirectamente una relación entre su longitud y su concentración proteica. La cuantificación se llevó a cabo en un NanoDrop™ 2000/2000c utilizando una longitud de 280 nm. En total, se utilizaron siete conductos de veneno para realizar la extracción de proteínas. De tal manera que se contaba con un conducto de veneno representativo de las cinco localidades de muestreo. Empero, las localidades Piaxtla y San Lázaro, son un caso particular, ya que en la primera se tienen dos conductos de individuos machos representativos; y en la segunda, se obtuvo el conducto de veneno de una hembra.

Tabla 5. Longitud y cuantificación de proteína de los conductos de veneno.

Localidad	Longitud (cm)	Concentración de proteína (mg/ml)
Macho de Piaxtla	16.5	21.9
Macho de Piaxtla	11.5	16.58
Macho de San Lázaro	10	10.81
Macho de Santo Domingo	13	6.32
Macho de Isla Altamura	25	28.28
Macho de Mármol de Salcido	15.5	24.15
Hembra de San Lázaro	10	5.84

Después de medir los conductos, se realizó la extracción de veneno por el método físico de sonicación para homogenizar el tejido, con ayuda de un polyTron Dremel BioSpec products, Inc. Para eliminar el exceso de tejido celular se hicieron lavados del homogeneizado en solución de extracción, centrifugando a 14,000 g a 25°C durante dos minutos. Estos lavados se realizaron de dos a tres veces para asegurar la eliminación de restos de tejido celular que pudieran interferir con las lecturas de cromatografía o tapar la columna de sílica.

8.3 Soluciones para extracción de veneno total y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC)

- Solución de extracción (v/v) (40% de acetonitrilo, 2% de ácido trifluoracético).
- Solución de fase A (v/v) (99.90% de H₂O, 0.1% de ácido trifluoracético).
- Solución de fase B (v/v) (90% de acetonitrilo, 0.085% de ácido trifluoracético).
- Solución de fase C (v/v) (90% acetonitrilo).

8.4 Fraccionamiento del veneno

Los extractos crudos de veneno se llevaron a una concentración promedio de 7 mg de proteína en 1 ml de solución de extracción, excepto para un macho de la localidad de Santo Domingo y una hembra de San Lázaro, donde se utilizó un volumen de 904 μ l y 835 μ l respectivamente. Para tal efecto, el solvente se evaporó en un concentrador Thermo SAVANT SpeedVac SPD 1010. Posteriormente, cada dilución de veneno total se inyectó en un equipo de cromatografía *Agilent*. Los componentes del veneno se fraccionaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, también conocida como RP-HPLC por sus siglas en inglés. Se utilizó una columna analítica *Vydac* C18 (4.6 mm x 250 mm, tamaño de partícula 5 μ m, 300 Å de tamaño de poro). Las condiciones de cada fraccionamiento y subfraccionamiento se establecieron mediante diversos protocolos a través de una mezcla entre fases móviles (solución A y solución B) que eluyen los diferentes componentes de la muestra a un porcentaje dado ⁵⁸. Cada una de las fracciones podría corresponder a una conotoxina de interés, por lo que cada señal dentro del cromatograma fue colectada manualmente en tubos Eppendorf de 1 ml. Una vez que se fraccionó el veneno de cada individuo, todas las muestras se llevaron a sequedad, de igual forma, con un concentrador Thermo SAVANT SpeedVac SPD 1010, para su posterior etiquetado y almacenamiento a -20°C.

8.5 Protocolos utilizados para HPLC

Para cada extracto de veneno crudo, solamente se utilizó un protocolo de fraccionamiento. Del minuto 0 al minuto 5 se usó un paso isocrático de 95% de fase A contra 5% de fase B. Después del minuto 5 el porcentaje de solución B aumentó 1% cada minuto hasta llegar a un porcentaje de 100% en 100 minutos. El flujo se mantuvo constante y fue de 1 ml por minuto. Las señales de cada perfil cromatográfico se registraron con un detector UV utilizando longitudes de onda de 220 nm y 280 nm respectivamente. Cada fracción de veneno que fue de interés, se subfraccionó por medio de un nuevo protocolo de purificación. También se inició con un paso isocrático de 40% de fase B y 60% de fase A durante los primeros 5 minutos.

Posteriormente, la solución de fase móvil B aumentó en 1% cada 3 minutos, hasta llegar a un valor de 50% en 35 minutos. Nuevamente, todos los componentes obtenidos se liofilizaron y se almacenaron a -20°C.

8.6 Obtención del peso molecular por espectrometría de masas MALDI-TOF

Durante el fraccionamiento de veneno, las señales mayoritarias que eluyeron aproximadamente en el minuto 50, se purificaron y se mandaron al Laboratorio de Servicios Analíticos, del Instituto de Química de la UNAM, para la identificar el peso molecular de cada uno de sus componentes a partir de su relación masa-carga (m/z). Se utilizó la técnica de MALDI-TOF para todas las muestras^{59 60}. Además, los espectros de masas también permitieron analizar la pureza de cada uno de péptidos que se aislaron, ya que había algunas muestras que contenían una mezcla de péptidos que se traducían en la presencia de diferentes señales de m/z en sus espectros de masas. Para el caso de los péptidos que se mandaron a secuenciar, se recurrió a una segunda repurificación; y por lo tanto, a una nueva medición de espectrometría de masas MALDI-TOF. De esta forma, podríamos asegurarnos de que el péptido se encontraba puro y no se observaría una mezcla de señales durante la secuenciación.

8.7 Obtención del peso molecular por ESI

Debido a que se ha observado variabilidad biológica en los perfiles cromatográficos de las hembras de *C. fergusonii* (ver apéndice) colectadas en tres de las cinco las zonas de muestreo, solamente se decidió obtener el peso molecular de una señal mayoritaria con tiempo de elución de 50 minutos y que pertenece a la localidad de San Lázaro. En esta ocasión la muestra fue enviada al Laboratorio de Proteómica de la Universidad de Melbourne en Australia, que está a cargo del Dr. Jonathan Mangum. Para la obtención del peso molecular se utilizó la técnica de espectrometría de masas por electronebulización (ESI-MS), ya que posee la ventaja de tener una alta sensibilidad y resolución de las señales que se leen para una muestra en particular^{61 10}.

8.8 Secuenciación de péptidos por degradación de Edman

La estructura primaria del péptido o los péptidos de interés se determinaron en el Laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Aproximadamente, se envió una cantidad de 1 nmol por cada muestra. Se usó un secuenciador automático de proteínas Shimadzu para un procedimiento de secuenciación por degradación de Edman, por 50 ciclos y consecuentemente, la determinación de 50 aminoácidos. Sin embargo, y como se observará más adelante, este método tiene la desventaja de no poder reaccionar con aquellos péptidos que se encuentren modificados en el N-terminal⁶².

8.9 Construcción de un modelo tridimensional del péptido de interés

A partir de obtener una secuencia primaria del o los péptidos de interés, se generaron modelos tridimensionales por homología utilizando la plataforma de SWISS-MODEL⁶³. El extenso número de pasos que se requiere para obtener un modelo por homología y la complejidad para resolver cada uno de los parámetros fisicoquímicos dentro de la validación del modelo, se reducen básicamente a 4 pasos principales dentro del servidor SWISS-MODEL: 1) Selección del molde; 2) Alineamiento entre la secuencia blanco y el molde; 3) Generación del modelo; 4) Evaluación del modelo de acuerdo a la similitud entre secuencias, la geometría de los residuos y el estado energético de la proteína (Figura 8).

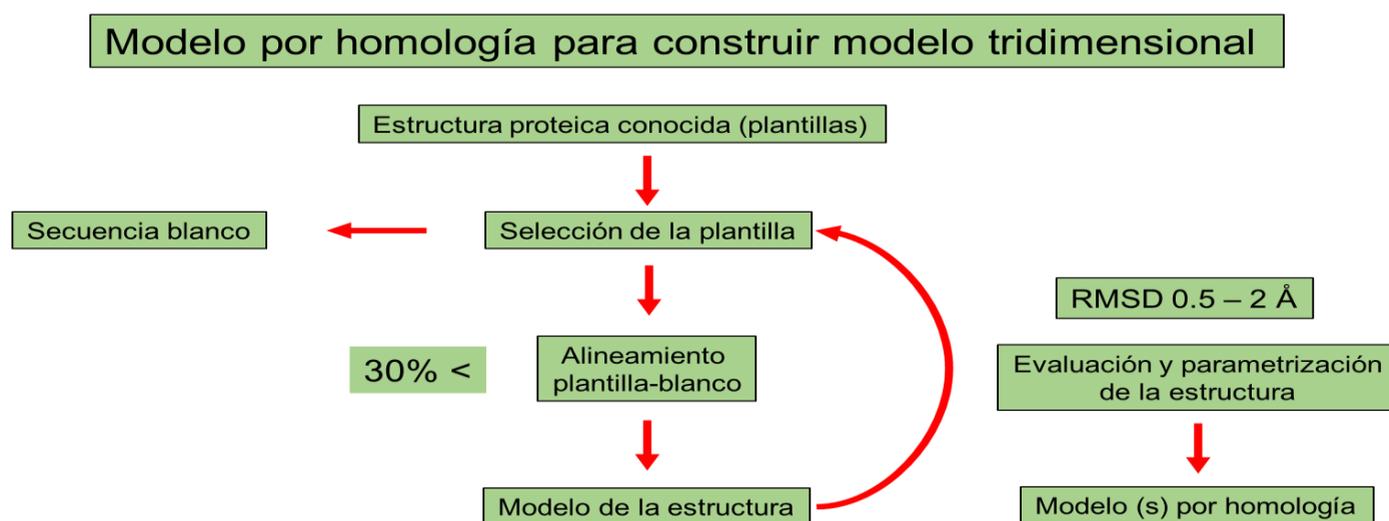


Figura 8. Proceso conceptual para la elaboración de un modelo tridimensional por homología de una proteína en el servidor SWISS-MODEL⁶³.

8.10 Acoplamiento molecular entre una conotoxina y dos canales de sodio activados por voltaje

Una vez que se obtuvo el modelo por homología de una conotoxina perteneciente a *C. fergusonii*, se analizaron las posibles interacciones energéticas a través de un modelo de *docking* molecular^{64 65} de este péptido con dos canales de sodio activados por voltaje. Para dicho análisis, se utilizó el subtipo Nav1.4 de humano (sensible a TTX) con el código de acceso en PDB *6agf*^{66 67} y el subtipo Nav1.5 (insensible a TTX) de rata con el código *6uz0*⁶⁸. Cabe mencionar que ambas estructuras fueron resueltas por la técnica de microscopía electrónica. El servidor *ClusPro 2.0*, disponible en la red, es una herramienta que se utiliza para realizar simulaciones computacionales que permitan evaluar o inferir las interacciones que se dan entre una proteína y otra. El servidor requiere dos archivos PDB para poder cargarlos en la plataforma y correr el proceso de *docking* molecular^{69 70 71 72}.

9. RESULTADOS

9.1 Fraccionamiento del veneno total de la especie *Conus fergusonii*

Se obtuvo el veneno total de los individuos pertenecientes a la especie *C. fergusonii* (un macho de cada localidad y una hembra de la localidad de San Lázaro) para realizar el perfil cromatográfico a través de la técnica de cromatografía en fase reversa (HPLC-RP). Se corrieron las muestras de al menos un individuo representante de cada una de las localidades (Piactla, Santo Domingo, Mármol Sinaloa, Isla Altamura y San Lázaro). Además, se realizó el perfil cromatográfico de dos individuos de la misma localidad para comparar los componentes del veneno fraccionado. Es importante mencionar que también se hizo una corrida por duplicado de aquellas muestras donde se tenía una cantidad suficiente de veneno crudo. Esto con el fin de comprobar la eficiencia de nuestro gradiente de elución y la reproducibilidad de nuestros resultados, utilizando la misma cantidad de muestra (7 mg). Previo a cada fraccionamiento de veneno total, se realizó la corrida de un control negativo, utilizando como muestra únicamente solución de extracción (Figura 9).

Una vez que se obtuvieron todas las fracciones de veneno y después de analizar las diferencias entre todos los organismos de *C. fergusonii*, se seleccionó al menos una señal que puede corresponder a un grupo de compuestos con la misma polaridad y que se observa en todos los perfiles cromatográficos. Una vez seleccionada dicha señal se subfraccionó para su posterior análisis. A pesar de la variabilidad observada, suponemos que los componentes (señales) mayoritarios que tuvieron un tiempo de retención aproximado de 50 minutos deberían ser las mismas conotoxinas presentes en todos los individuos de *C. fergusonii* o, en su caso, deberían pertenecer a la misma familia de conotoxinas (Figuras 10-16).

9.2 Subfraccionamiento del componente en común

Se seleccionó a la fracción o fracciones mayoritarias que eluyen aproximadamente en 50 minutos, como el componente en común. Por lo cual, se subfraccionó de nueva cuenta con en el equipo de HPLC, utilizando los protocolos que se describen en Métodos. Cabe mencionar, que en esta ocasión se usó solución A como control negativo (1 ml), ya que cada uno de los componentes que se inyectaron en el equipo estaban diluidos en dicha solución (Figura 17). A manera de ejemplo, sólo se presenta un perfil cromatográfico del subfraccionamiento de veneno; el cual pertenece a la señal mayoritaria 30 de un macho *C. fergusonii* de la localidad San Lázaro (Figura 18).

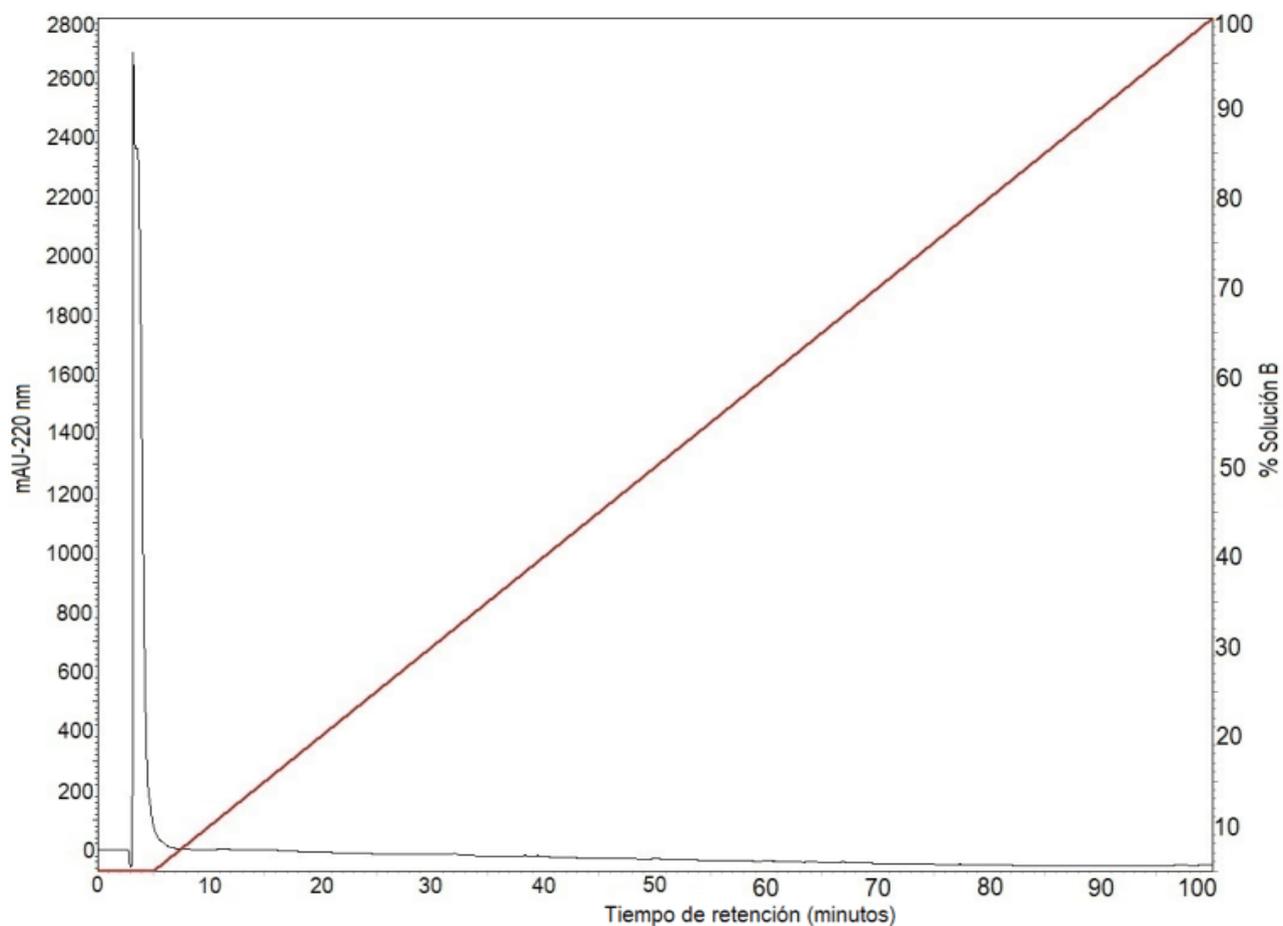


Figura 9. Corrida cromatográfica del control negativo. Se utilizó como control negativo 1 ml de solución de extracción. El eje vertical izquierdo, representa la absorbancia en unidades de miliabsorbancia (mAU) a 220 nanómetros, mientras que el eje vertical derecho, se observa el porcentaje de fase móvil B. El eje de las abscisas representa la duración de la corrida en minutos.

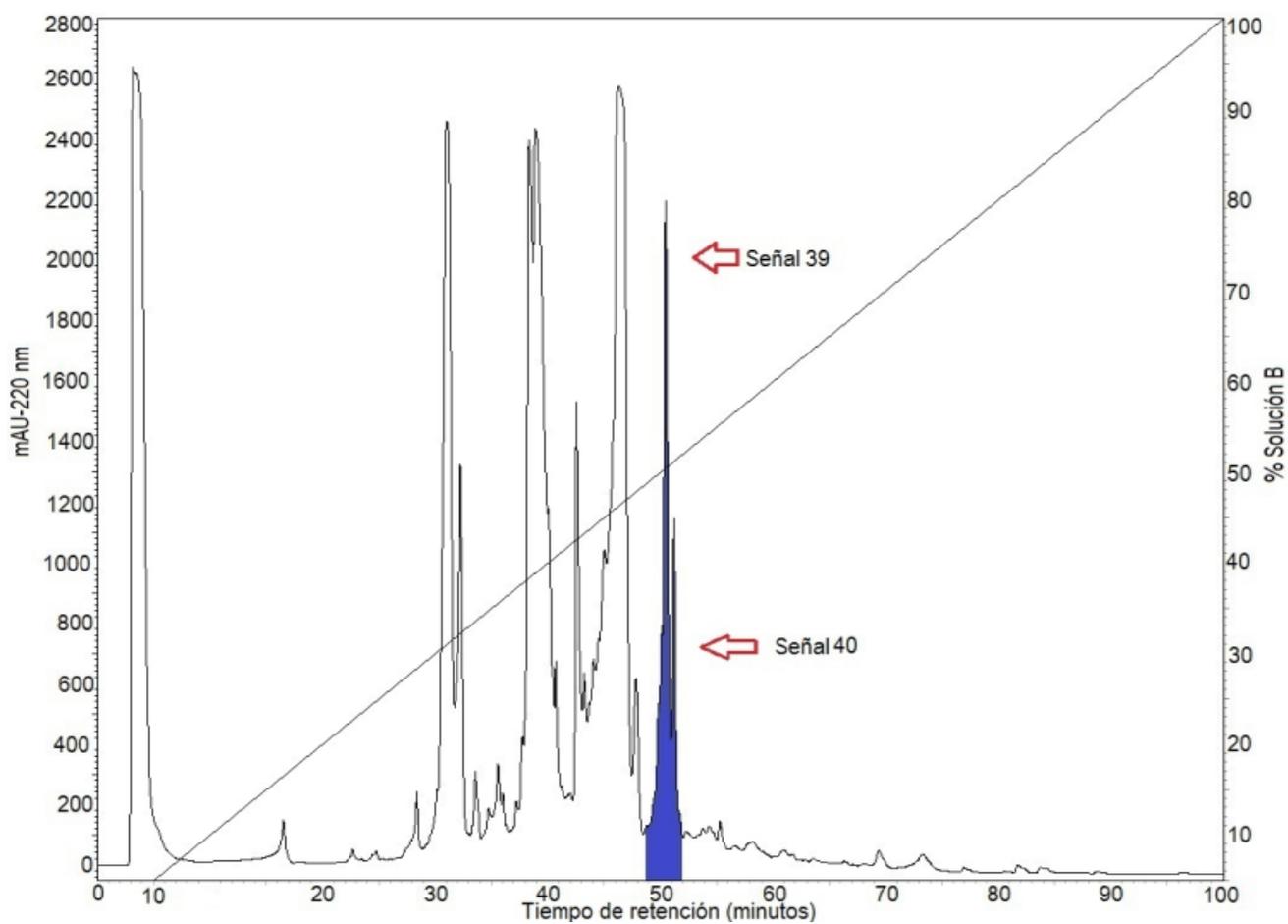


Figura 10. Cromatograma de un individuo la especie *C. fergusoni*. Se representa el perfil cromatográfico del veneno de un macho de la localidad de Piaxtla. Se señala con azul el componente en común que presentaron todos los fraccionamientos (minuto 50 aproximadamente).

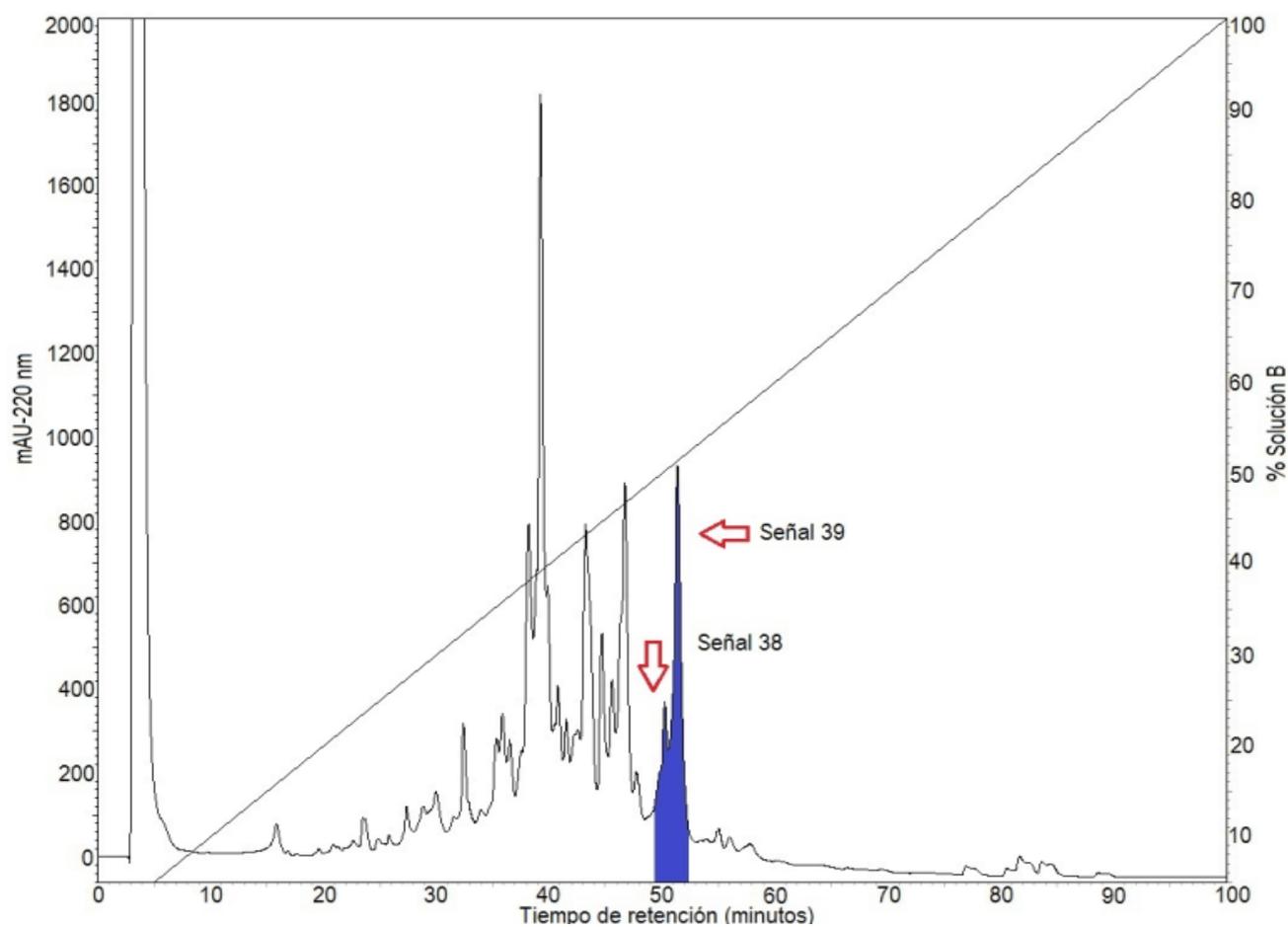


Figura 11. Perfil cromatográfico de un macho perteneciente a la localidad de Piaxtla. En color azul se observan las señales mayoritarias que corresponden a un componente en común con tiempo de elución de 50 minutos.

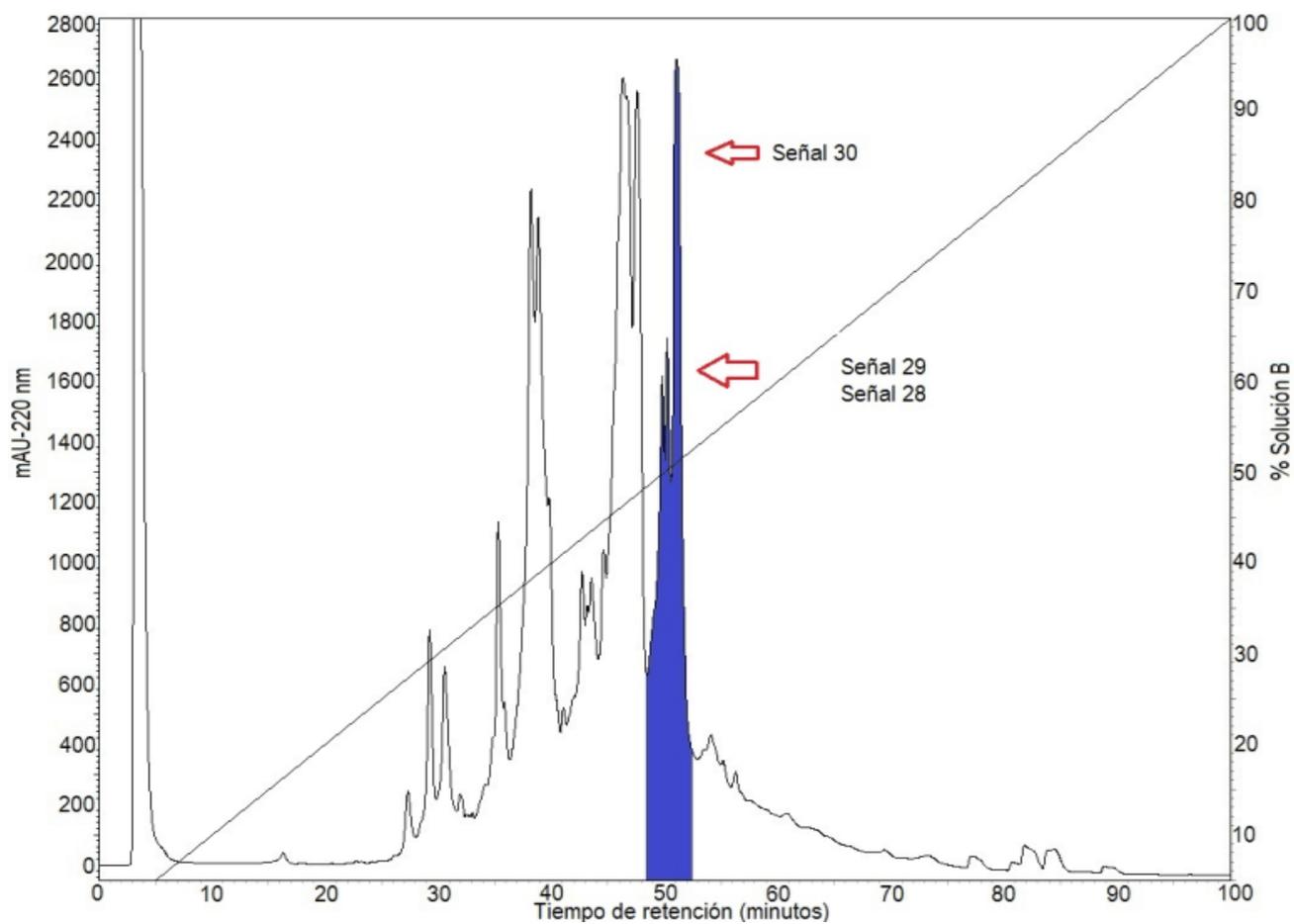


Figura 12. Perfil cromatográfico de un macho perteneciente a la localidad de San Lázaro. En color azul se muestra el componente en común con tiempo de elución de 50 minutos aproximadamente.

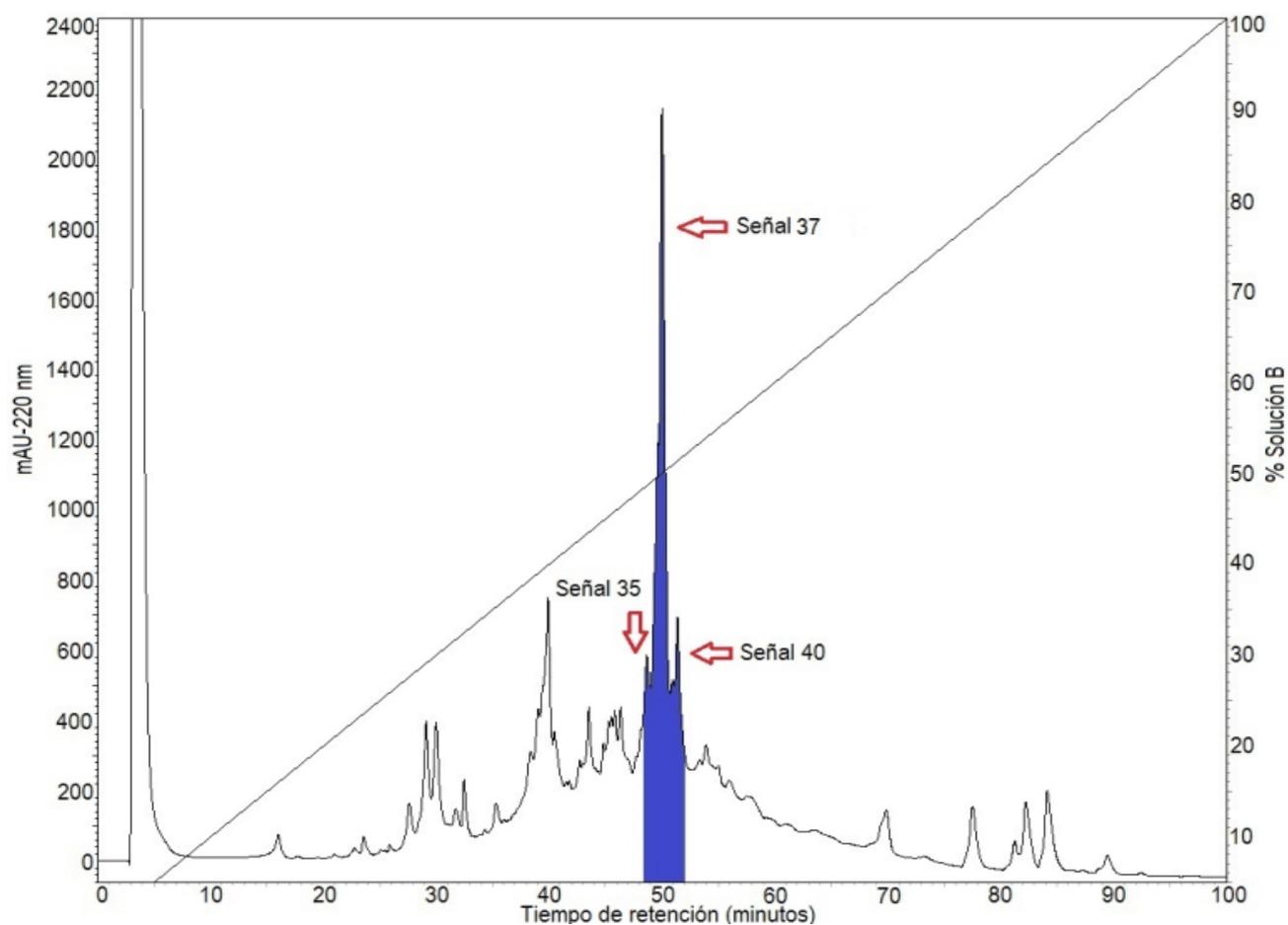


Figura 13. Perfil cromatográfico de un macho de *C. fergusonii*, perteneciente a la localidad de Santo Domingo. En color azul se muestra el componente en común con tiempo de elución de 50 minutos.

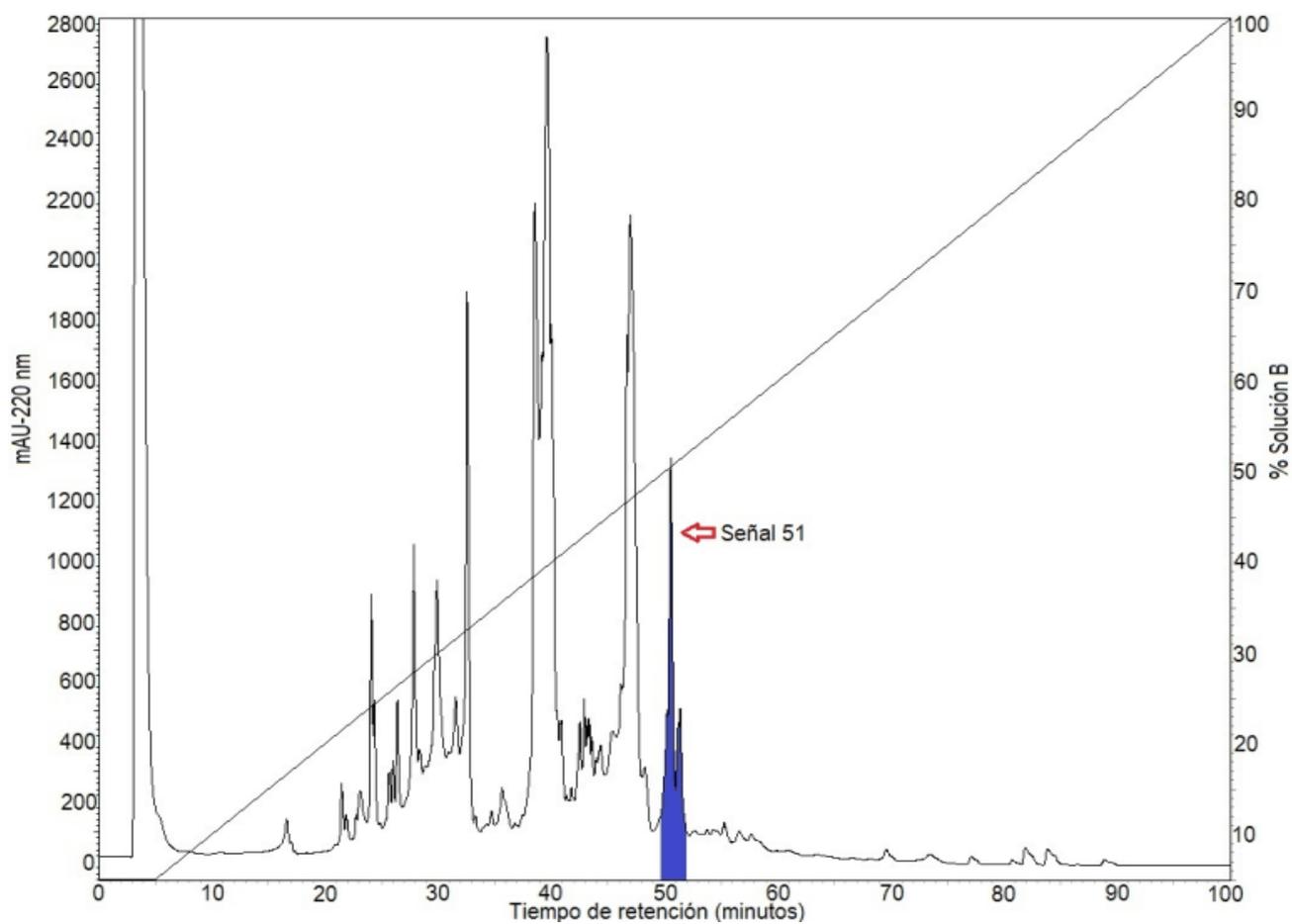


Figura 14. Perfil cromatográfico de un macho de *C. fergusonii*, perteneciente a la localidad Mármol de Salcido. En color azul se muestran las fracciones de veneno que corresponden al componente en común.

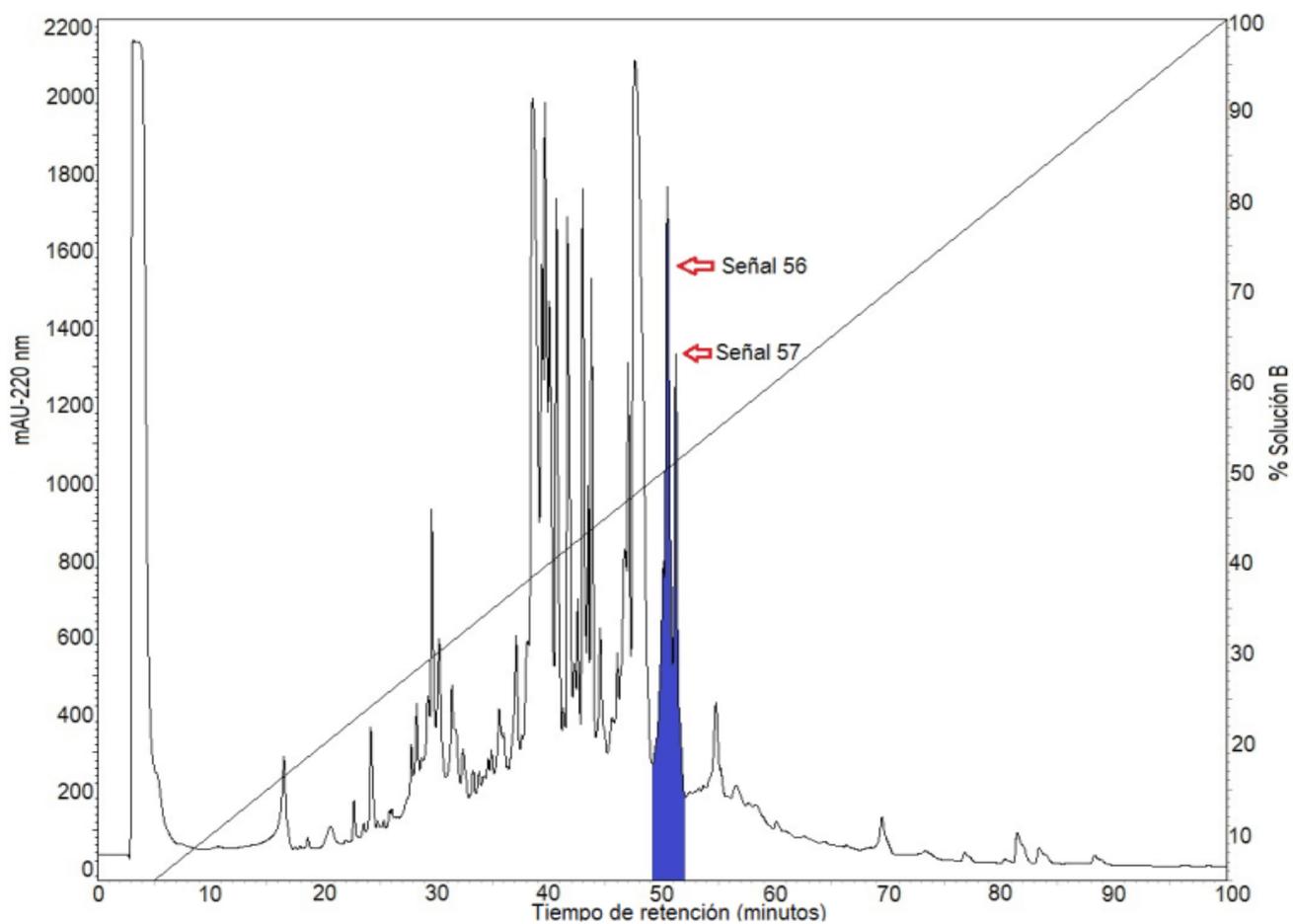


Figura 15. Perfil cromatográfico de un macho de *C. fergusonii*, perteneciente a la localidad Isla Altamura Angostura. En color azul se muestran las fracciones de veneno que corresponden a un componente en común.

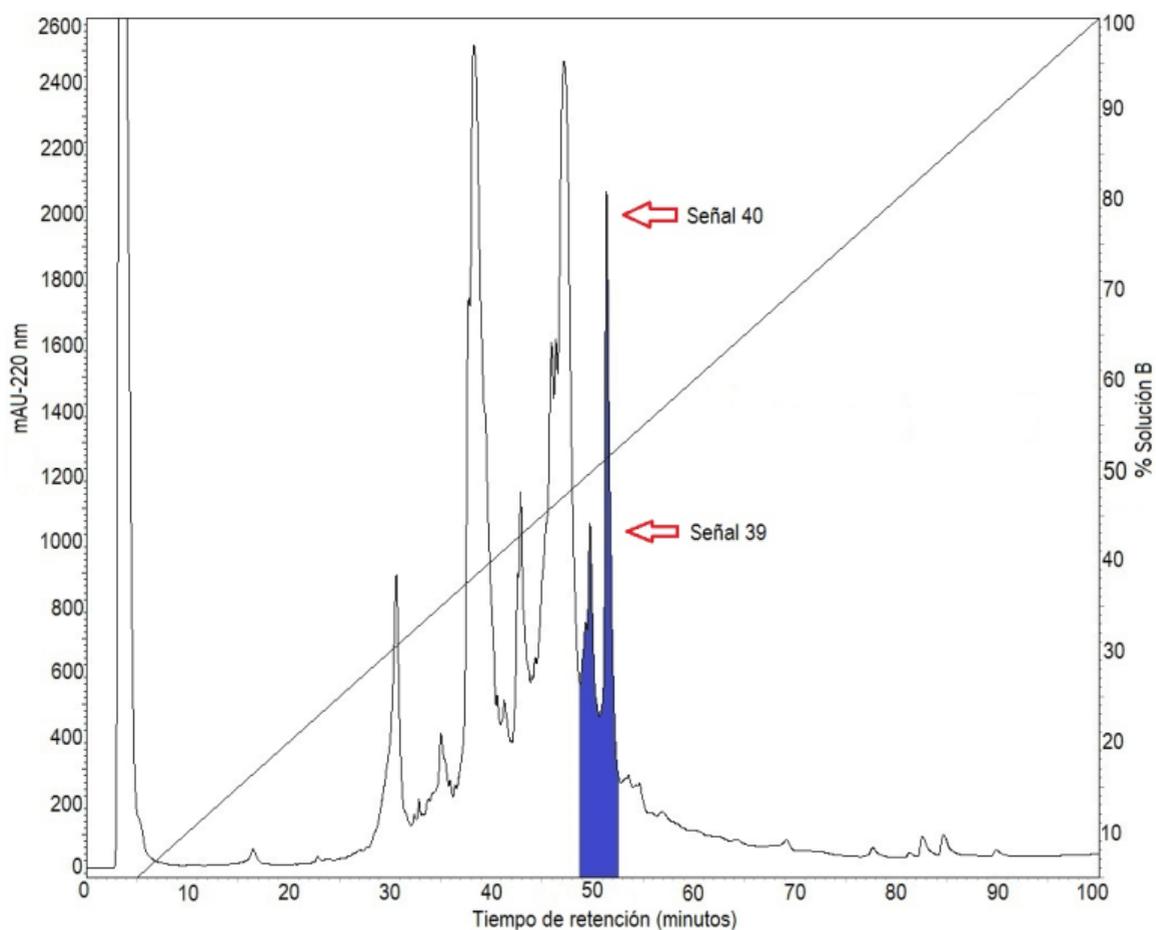


Figura 16. Perfil cromatográfico de una hembra de *C. fergusonii*, perteneciente a la localidad de San Lázaro. En color azul se encuentran las fracciones de veneno que corresponden a un componente en común con tiempo de elución promedio de 50 minutos; tal y como ocurre con los perfiles cromatográficos de los machos.

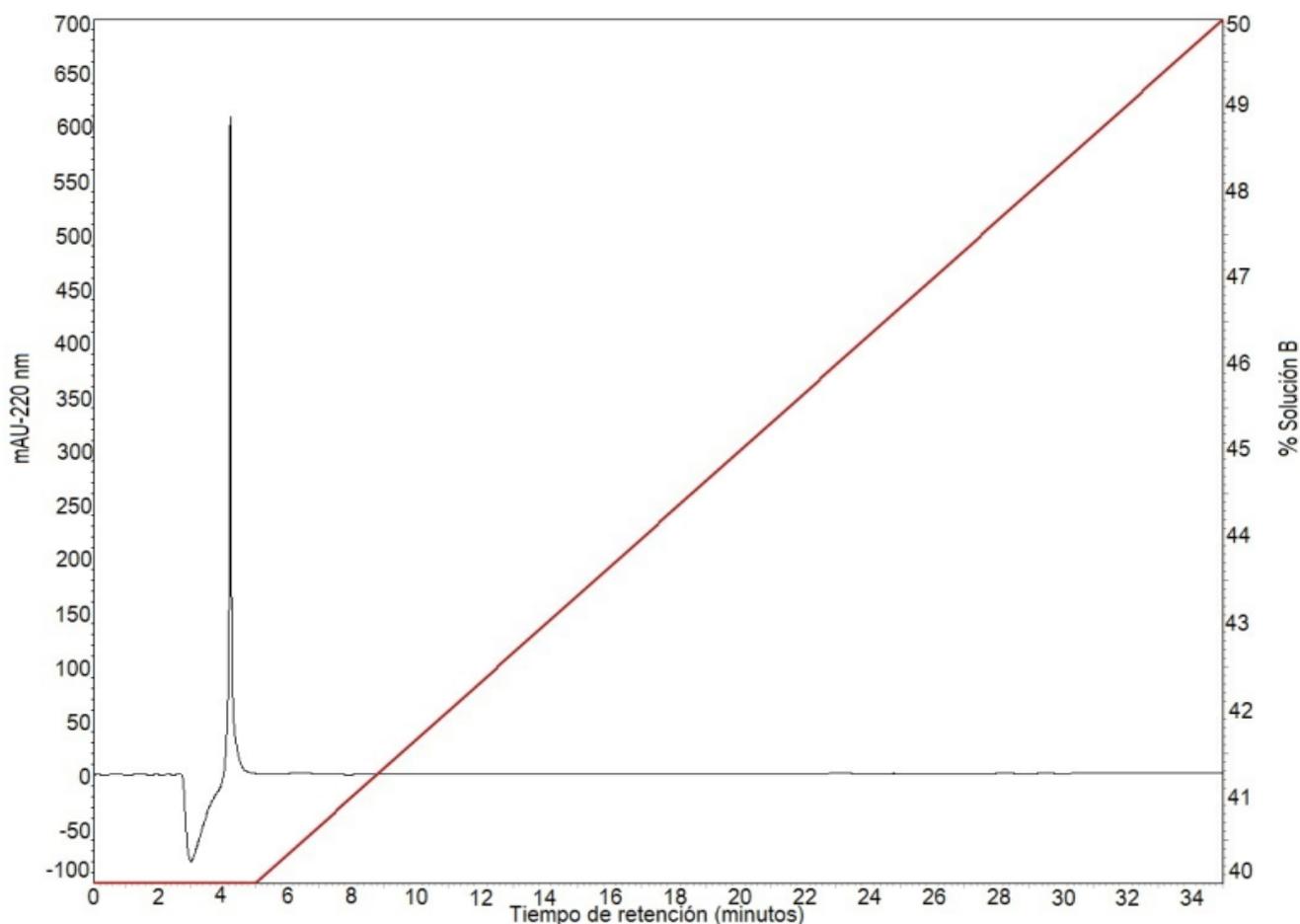


Figura 17. Protocolo de subfraccionamiento para las señales mayoritarias que eluyeron alrededor del minuto 50, obtenidas de los perfiles cromatográficos de machos y hembras de *C. fergusonii*. Se presenta el perfil cromatográfico de un blanco que contiene únicamente la fase móvil A y es usado como control negativo de nuestros experimentos. Se parte de un gradiente de 40% de fase móvil B que se mantiene durante 5 minutos. Posteriormente, un porcentaje de fase móvil B aumenta cada 3 minutos hasta llegar a una concentración de 50%. Las señales se registraron a una longitud de onda de 220 nm.

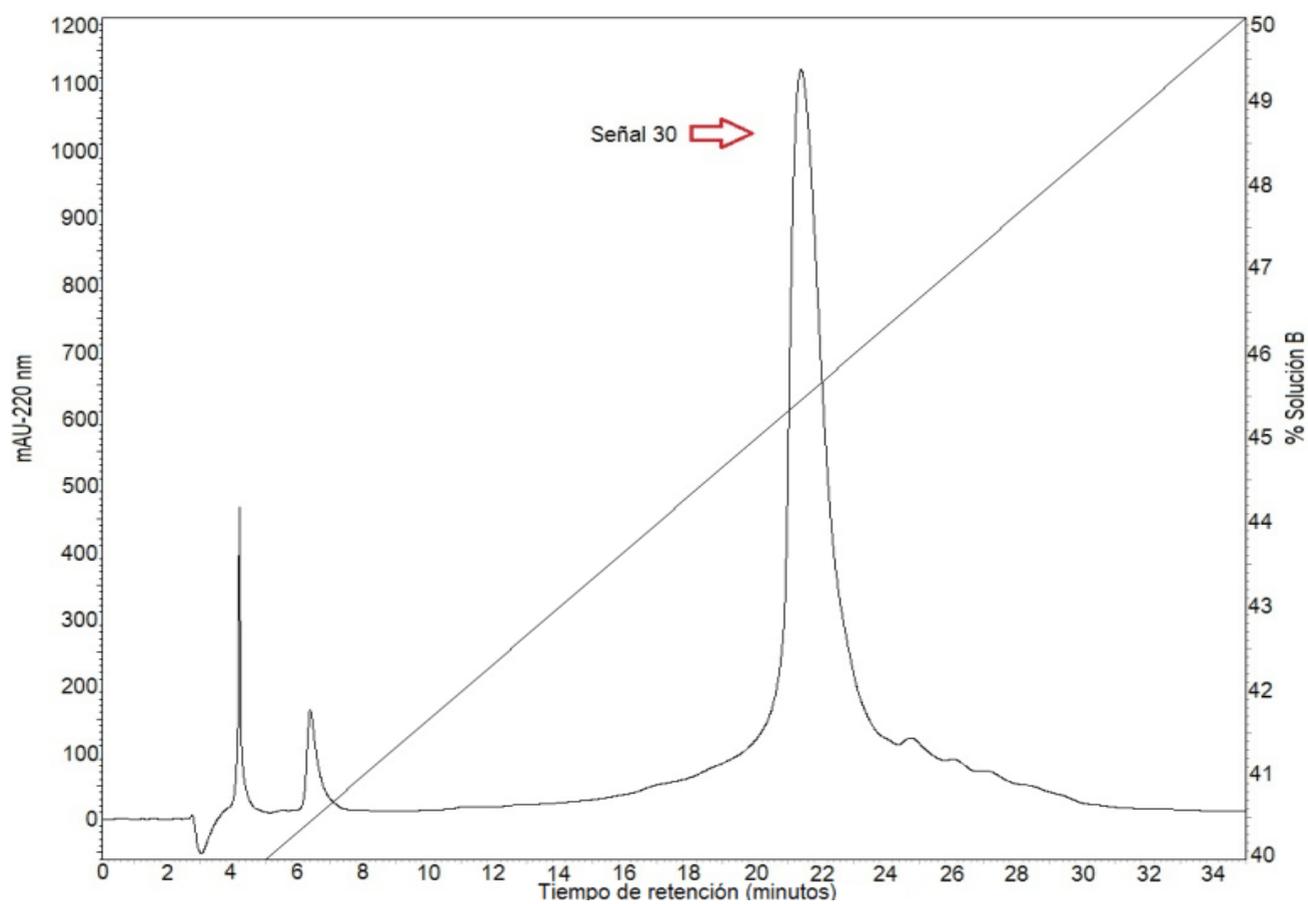


Figura 18. Ejemplo representativo del perfil cromatográfico del subfraccionamiento de uno los componentes mayoritarios. Dicho perfil cromatográfico corresponde a un macho *C. fergusonii* de la localidad de San Lázaro.

9.3 Espectrometría de masas de las señales mayoritarias purificadas

Después que se obtuvieron las purificaciones del componente de interés para cada organismo de *C. fergusonii* (Cromatograma representativo de la figura 18), se intentó determinar, como un primer acercamiento, la masa molecular de los compuestos a partir de la espectrometría de masas con la técnica de MALDI-TOF. Cabe mencionar que estos experimentos se realizaron en el laboratorio de servicios analíticos del Instituto de Química de la UNAM. Se procuró que todas las muestras enviadas tuvieran una cantidad menor a 0.3 nmol para evitar la saturación de la matriz donde se carga el analito. Al igual que con los perfiles cromatográficos, solamente se presenta un espectro representativo de la espectrometría de masas (Figura 19). El peso molecular de todas las subfracciones de veneno, se encuentran en las figuras suplementarias de este trabajo.

Las masas correspondientes del posible componente en común para los machos de las cinco localidades se muestran en la Tabla 6. En general, se obtuvo un peso molecular promedio entre 4500-4900 m/z, a excepción de la localidad de Altamura Angostura, donde solamente se logró observar una señal en el espectro de masas correspondiente a 3000 m/z. Aunque la única forma de saber si se trata de péptidos similares es a través de la secuenciación, podemos observar un patrón de peso molecular en las señales mayoritarias correspondientes al minuto 50 de los perfiles cromatográficos de machos pertenecientes a *C. fergusonii*. Incluso, este patrón también se observó en el subfraccionamiento de veneno de una hembra perteneciente a la localidad de San Lázaro, que se obtuvo con la técnica de ESI (Figura 20).

Tabla 6. Peso molecular del posible componente en común para los machos y hembras de *C. fergusonii*. La localidad de Piaxtla marcada con asterisco (*), hace referencia a un segundo individuo colectado en esa misma localidad.

<i>C. fergusonii</i>	Señal	Localidad	Peso (m/z)
Macho	29	San Lázaro	4739.431
Macho	30	San Lázaro	4738.866
Macho	40	Piaxtla	4754.129
Macho *	38	Piaxtla	4502.306
Macho *	39	Piaxtla	4948.376
Macho	37	Santo Domingo	4781.498
Macho	40	Santo Domingo	4835.177
Macho	51	Mármol de Salcido	4499.744
Hembra	39	San Lázaro	4707.884

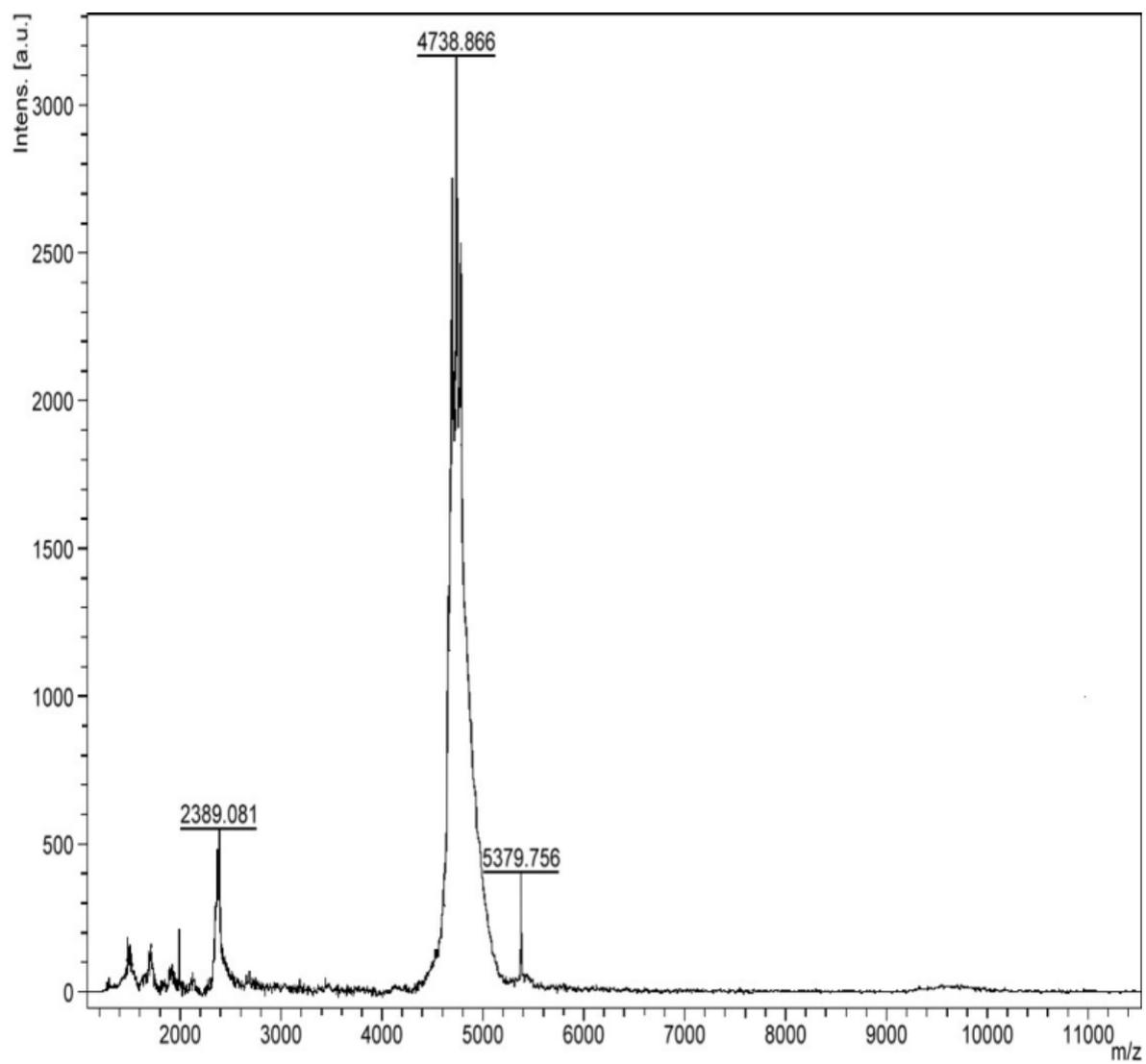


Figura 19. Espectro de masas de la señal 30 de un macho de la localidad de San Lázaro. En el eje de las ordenadas se observa la intensidad de la señal (a.u.), mientras que en el eje de las abscisas es la relación masa/carga de los compuestos presentes en la muestra.

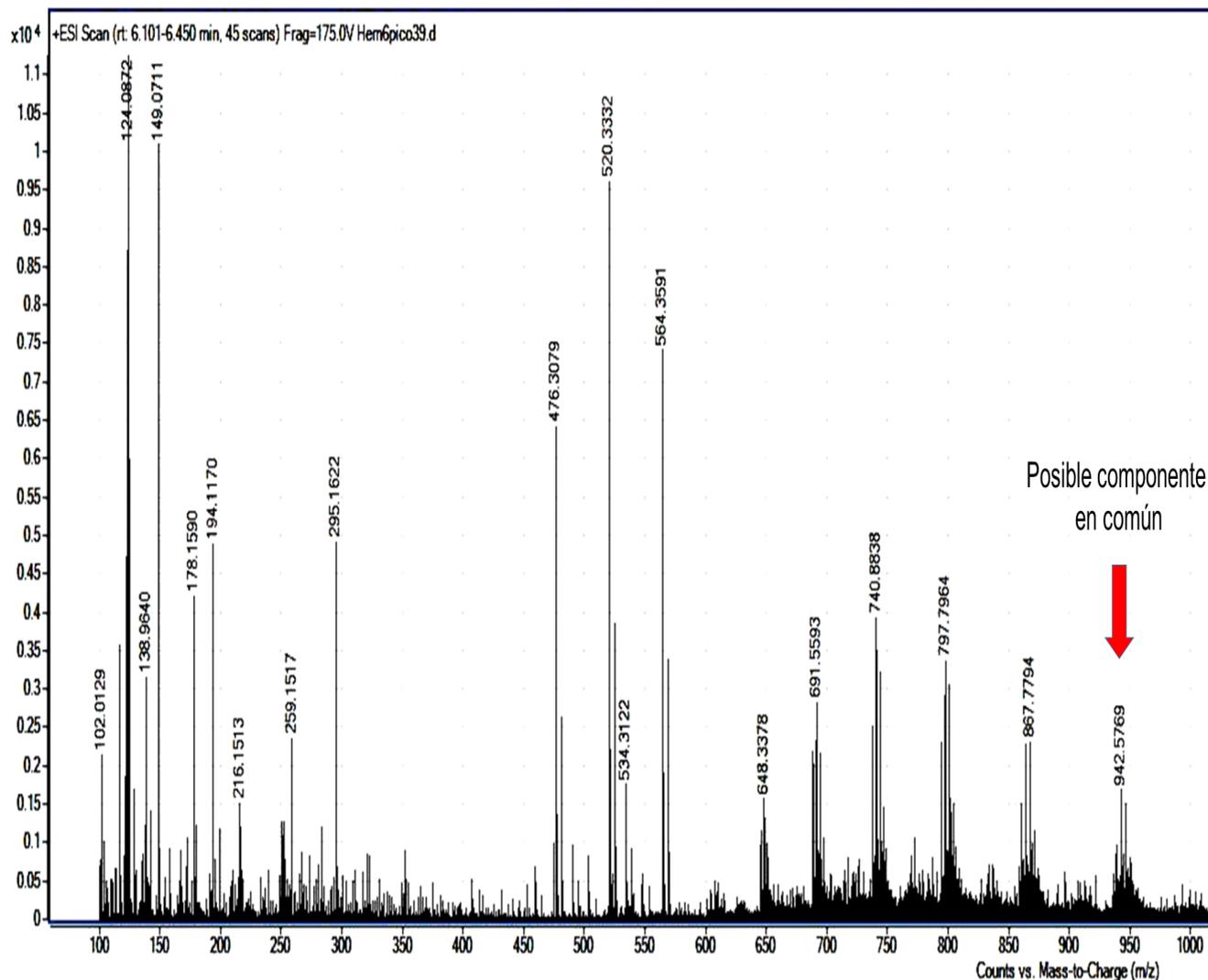


Figura 20. Espectro de masas obtenido del fraccionamiento de veneno de una hembra *C. fergusonii* perteneciente a la localidad de San Lázaro. Datos obtenidos en el Laboratorio de Proteómica del Dr. Jonathan Mangum. En un equipo de HPLC adaptado a un espectrómetro de masas ESI se inyectaron 2 μ l de veneno total con un gradiente que va de 0-5% de fase móvil B (acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico) durante 3 minutos y de 5-95% durante 10 minutos. A partir de una lectura de 280 nm se registraron 4 señales mayoritarias en el cromatograma (Datos no mostrados). Sin embargo, solamente una de ellas presentó una abundancia de compuestos ionizados con multicarga, que al ser resueltas por el software *MassHunter* arrojaron un fragmento con peso molecular de 942.5769^{+5} , y por lo tanto, al obtener el producto del peso por la carga y restar la masa de 5 protones, se tiene un péptido de 4707.884 m/z.

9.4 Purificación de la señal 30 del macho que pertenece a la localidad San Lázaro

Debido a la pérdida considerable de material que existe en cada paso de purificación, se decidió purificar una sola muestra y mandar a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. La muestra referente a la señal 30 del perfil cromatográfico de un macho perteneciente a la localidad de San Lázaro fue nuestra mejor candidata. Se purificó con las mismas soluciones y equipo cromatográfico con la salvedad que se utilizó una columna *Vydac* C8 (5 μm de tamaño de partícula y 80 \AA de tamaño poro etc.) por su menor capacidad de retención y disminución en el tiempo de análisis. Dicha capacidad, genera señales más definidas en el cromatograma. En la figura 21 se muestra el perfil cromatográfico de la purificación.

Se realizó a la par, un estudio de espectrometría de masas MALDI-TOF y solo se aprecia una señal mayoritaria con un peso molecular de 4854.805 en relación a su masa/carga. Este resultado puede corroborarse en la figura 22. Aunque se trata de la misma muestra, en los dos análisis de espectrometría de masas (subfraccionamiento y purificación) se observa una diferencia de peso molecular equivalente a 115.939 m/z. Esto con respecto a la señal mayoritaria de 4738.866 m/z de la figura 19. De momento, sólo podemos atribuir este fenómeno a dos razones: A una reacción de trifluoracetilación en los residuos de lisina, donde se ha observado la unión covalente de un residuo de ácido trifluoracético con un aumento de masa de 113.01 m/z. La segunda razón, podría atribuirse a la calibración del equipo MALDI-TOF donde se realizó este análisis.

Afortunadamente, este análisis solamente es un primer acercamiento para tratar de dilucidar la naturaleza de nuestro componente en común. Debido a que se obtuvo una sola señal mayoritaria en el segundo análisis de masas; y dado que se tenía una concentración suficiente, se optó por mandar a secuenciar este péptido, a través de la técnica degradación de Edman. En cuanto a la señal mayoritaria 39 del perfil cromatográfico de la hembra *C. fergusonii* perteneciente a la localidad de San Lázaro (con peso molecular de 4707.884 m/z), también fue mandada a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Desafortunadamente, la secuenciación por degradación de Edman no arrojó ningún resultado para los dos péptidos.

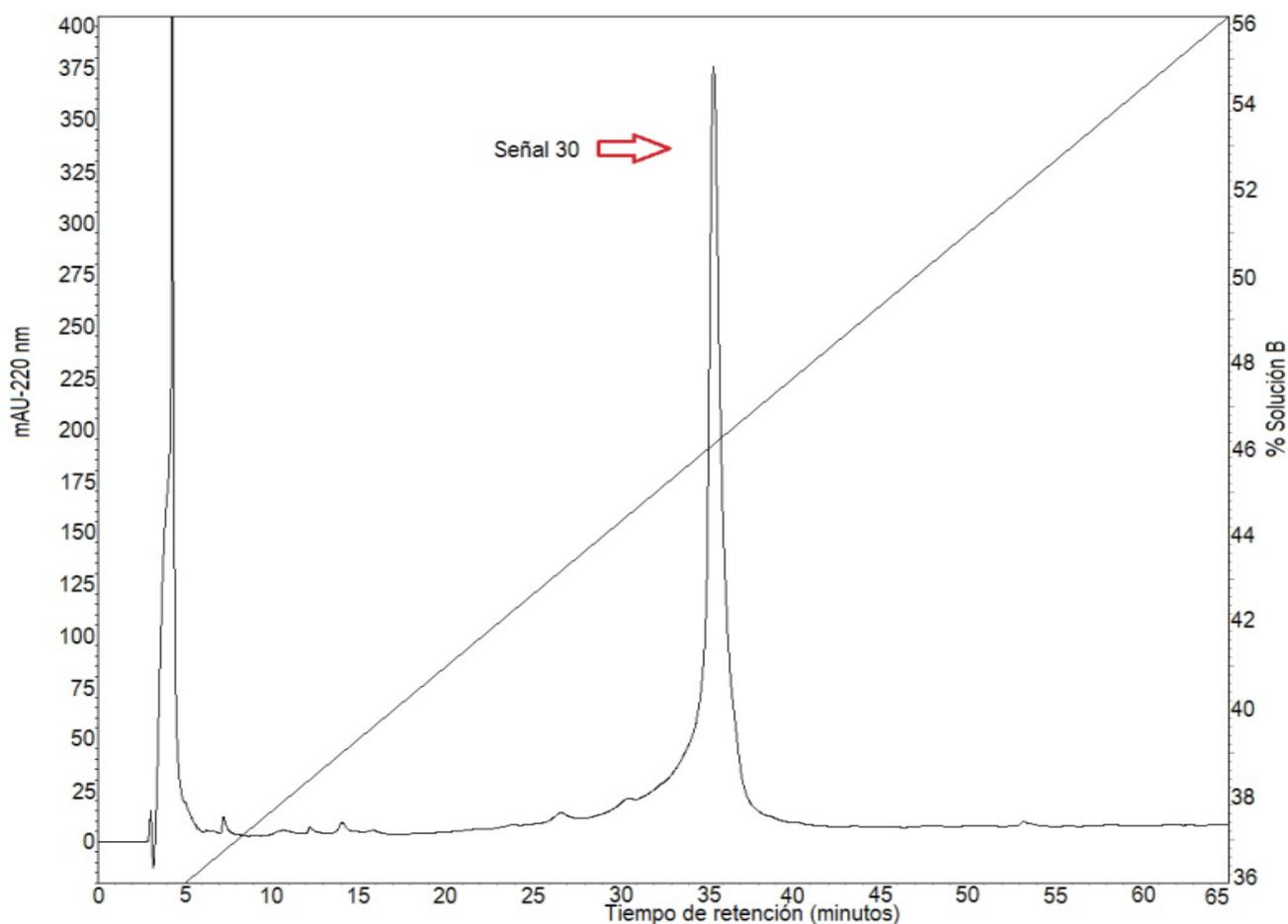


Figura 21. Protocolo de purificación de la señal 30 perteneciente a un macho de la localidad San Lázaro. Para dicho protocolo de repurificación se cambió a una columna C8 y se aumentó el tiempo de la cromatografía. Esto con el fin de obtener una mejor separación de los componentes. Se parte de un gradiente de 36% de solución B durante 5 minutos. A partir del minuto 6 aumenta un porcentaje cada 3 minutos hasta llegar a una concentración de 56% de solución B durante 60 minutos.

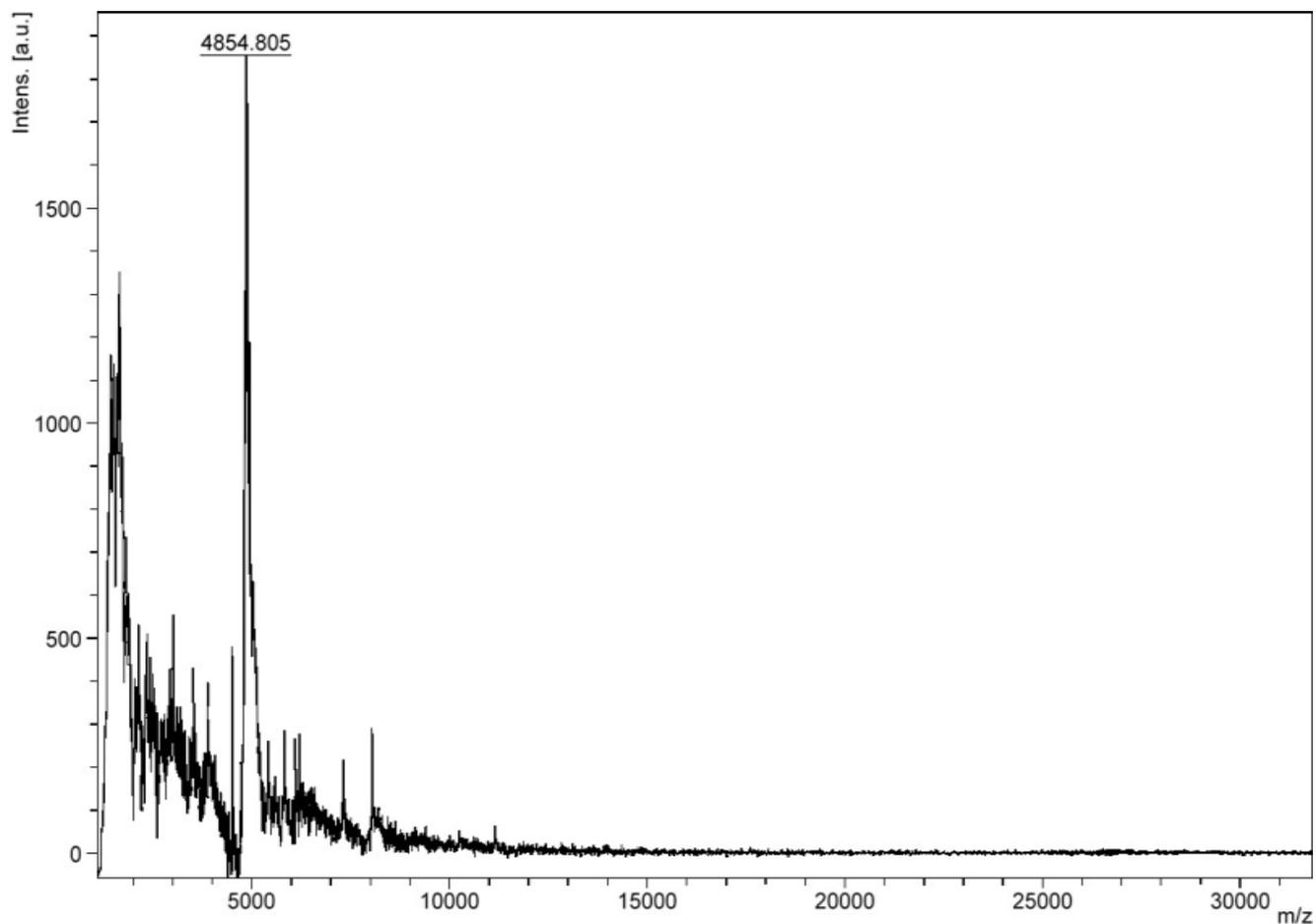


Figura 22. Espectrometría de masas por MALDI-TOF referente a la segunda purificación de la señal 30, que corresponde al macho *C. fergusonii* de la localidad San Lázaro. Se observa una señal mayoritaria bastante definida con un peso molecular de 4854.805 en relación a su masa/carga. También es evidente la lectura de un segundo componente al inicio del espectro y aunque no se observa su peso molecular, un segundo análisis con el software mMass versión 5.5.0 ⁷³ mostró un peso molecular de 1660.512 (datos no mostrados), por lo tanto se trata de un péptido diferente.

9.5 Determinación de las secuencias por inferencia de peso molecular

A pesar de no haber obtenido una secuencia parcial, y con el propósito de utilizar la información proporcionada por los espectros de masas y el transcriptoma de *C. fergusonii* que contiene 167 conotoxinas; se realizó un análisis bioinformático para filtrar las posibles secuencias que tuvieran un peso molecular de alrededor de 4700 m/z. Por lo tanto, se utilizó la herramienta *ConoPrec precursor analysis* que se encuentra en el servidor de *ConoServer*^{74 75}. Esto con el fin de predecir probabilísticamente cuál es el número de aminoácidos en promedio que debería tener un péptido con un peso molecular similar, así como el número de cisteínas y puentes disulfuro con los que debería contar. Gracias al análisis anterior, fue posible hallar dos conotoxinas pertenecientes a la superfamilia N y/o a una superfamilia divergente (Tabla 7). Además, la herramienta *ConoPrec precursor analysis* también fue capaz de inferir de una forma más clara, las regiones pertenecientes a la secuencia señal, propéptido y péptido maduro. De esta manera, la masa molecular promedio teórica de la región del péptido maduro es de 4738.45 y 4914.43, respectivamente.

Tabla 7. Determinación de la superfamilia de conotoxinas con base en la secuencia señal de los péptidos de interés de *C. fergusonii*.

Entrada 3975	Secuencia de aminoácidos	Superfamilia	Peso teórico (fuente <i>ionsource</i>)
Secuencia señal	MSTLGMMLLIILLLLLPLAA	N y/o divergente MSTLGMTLL-	
Propéptido	FDGDGPAIPGDRGVNLLRK		
Toxina madura	IRTPSSGCSPKPPCDSGKWCCLTCCPSSDYTCGRAGPLGQQVPVCV		4738.45
Entrada 2334	Secuencia de aminoácidos		
Secuencia señal	MSTLGMLLLIAPLLPLANP	N y/o divergente MSTLGMTLL-	
Propéptido	ADNGDGQAKPRSRNLRSLAFGRTPRRLDKR		
Toxina madura	GCDPTEGCQTTVCDTSTGPCCCQPDYNCQTQPSGSRACVRVCPHNCP		4914.43

9.6 BLAST y alineamiento de secuencias en *UniProt*

Una vez que se logró inferir las posibles secuencias de aminoácidos del componente en común y las posibles superfamilias a las que pertenecen; el siguiente paso fue dilucidar las relaciones filogenéticas de este carácter o tipo de conotoxinas con otras especies del género *Conus*. Esto a partir de una serie de alineamientos que permitieron construir arboles filogenéticos con especies de diferentes zonas biogeográficas y determinar información tridimensional importante de estas proteínas, así como su posible blanco molecular.

Los alineamientos necesarios para encontrar estructuras homólogas que ya han sido resueltas por difracción de rayos X o por microscopía electrónica, se llevaron a cabo en la plataforma de *UniProt*^{76 77} y en la plataforma del *National Center for Biotechnology Information* y su algoritmo de alineamiento local (BLAST) con el programa *blastp* y la matriz *blosum62*^{78 79}. Sin embargo, se utilizaron los resultados obtenidos de la primera base de datos, debido a que provee una mayor información respecto a relaciones filogenéticas, modelos tridimensionales, regiones asociadas a secuencias señal, propéptidos y péptidos maduros. También, se toman en cuenta características de las proteínas asociadas con alfa hélices, hojas beta, dominios, motivos, filtros de selectividad, y asas intra y extracelulares.

Las figuras que muestran los resultados de los alineamientos aparecen con los números de acceso de *UniProt* que corresponden a una especie en particular (tabla 8). En la Figura 23 se presenta un alineamiento múltiple de esta secuencia, con el fin de encontrar las relaciones filogenéticas de este carácter con otras especies del género *Conus* y el hallazgo de la secuencia señal, el propéptido y el péptido maduro. Cabe mencionar que el servidor *UniProt* también permite dilucidar este tipo de regiones con base en la información de otras conotoxinas presentes en la base de datos.

Tabla 8. Códigos de acceso pertenecientes a cada una de las especies del género *Conus* que se utilizaron para el BLAST y los alineamientos de secuencias con respecto a la conotoxina N 3975.

Códigos de acceso de las especies del género <i>Conus</i>				
<u>A0A142C1H9</u> <i>C. betulinus</i> ⁸⁰	<u>A0A0K8TUI2</u> <i>C. tribblei</i> ⁸¹	<u>A0A0K8TUU2</u> <i>C. lenavati</i> ⁸²	<u>A0A0K8TTN8</u> <i>C. lenavatii</i>	<u>A0A291C2G6</u> <i>C. praecellens</i> ⁸³
<u>A0A142C1K1</u> <i>C. betulinus</i> ⁸⁴	<u>A0A0C9SFL6</u> <i>C. tribblei</i> ⁸⁵	<u>A0A0C9S5U2</u> <i>C. tribblei</i>	<u>A0A142C1I0</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A0K8TUA2</u> <i>C. lenavati</i>
<u>A0A0C9R731</u> <i>C. tribblei</i> ⁸⁶	<u>A0A5P8I0R0</u> <i>C. magus</i>	<u>A0A0C9RYH5</u> <i>C. tribblei</i>	<u>P0DM18</u> <i>C. marmoreus</i>	<u>P0DM20</u> <i>C. marmoreus</i> ⁸⁷
<u>A0A125S9F0</u> <i>C. imperialis</i> ⁸⁸	<u>P0DM19</u> <i>C. magus</i> ⁴⁵	<u>A0A142C1E3</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A1P7ZCQ2</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A1P7ZCQ6</u> <i>C. betulinus</i>
<u>A0A1P7ZCQ1</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A1P7ZCQ8</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A0K8TUL0</u> <i>C. tribblei</i>	<u>A0A1P7ZCQ4</u> <i>C. betulinus</i>	<u>D6C4H8</u> <i>C. californicus</i> ⁸⁹

Debido a que la herramienta *ConoServer precursor analysis* ya definió las regiones pertenecientes a nuestra primera secuencia problema (péptido señal, propéptido y péptido maduro); solamente se presentan las relaciones evolutivas de una conotoxina N con otras 25 secuencias que codifican para una conotoxina en particular de 8 especies diferentes de caracoles marinos del género *Conus*. Sin embargo, es importante mencionar que realmente se obtuvo un “match” con 50 proteínas diferentes (algunas con genes parálogos que no codificaban para conotoxinas), pero para fines prácticos, en este trabajo sólo se presentan 25 de estos resultados. Además, solamente se utilizó la base de datos *UniProtKB*, ya que los resultados pueden variar al incluir otros servidores como *Swiss-Prot* y *PDB 3D-Structures*.

```

B20210325A94466D2655679D1.. 1 -MSTLGMLLILLLLLPLAAFADGDPGPAI--PGDRGVNLLRKIRT-----PSSGCSPKPP 51
A0A142C1H9 A0A142C1H9_CONBE 1 MMSALGMMLL-LHLLPLVAFDGDGPTI--RGRNRARFLKRMVT-----RTC--NPETP 49
A0A0K8TUI2 A0A0K8TUI2_9CAEN 1 -MSTLGMLPILLLLLPLAAFADGDPPTI--QGQSAKLLKIVTK-----EMC--QHS DP 49
A0A0K8TUU2 A0A0K8TUU2_CONLV 1 -MSTLGMLPILLLLLPLVAFADGDPPTI--QGQSAKLLKIVTK-----EMC--QHS DP 49
A0A0K8TTN8 A0A0K8TTN8_CONLV 1 -MSTLGMLPILLLLLPLVAFDGDGPTI--QGQSAKLLKIVTK-----EMC--QHS DP 51
A0A291C2G6 A0A291C2G6_CONPC 1 -MSTLRMMLILLLLLPMAAFADDRPTI--RGQSAKFLKSITK-----REC--DQGRP 49
A0A142C1K1 A0A142C1K1_CONBE 1 -MSALGTMLLI-LLLLPLAAFADGDPPTI--RGHSSNKLWRSINR-----REC--DQNR 48
A0A0C9SFL6 A0A0C9SFL6_9CAEN 1 -MSTLGMLPILLLLLPLAAFADGDPPTI--QGQSAKLLKIVTK-----REG-EQAGR 51
A0A0C9S5U2 A0A0C9S5U2_9CAEN 1 -MSTLGMLPILLLLLPLAAFADGDPPTI--QGQSAKLLKIVTK-----REG-EQAGR 51
A0A142C1I0 A0A142C1I0_CONBE 1 MMSTLKMMLLILLLLLPLATFSDGQAI--PGDGVSPMSSRIRLLGGDKKSGRSP-RS 57
A0A0K8TUA2 A0A0K8TUA2_CONLV 1 -MSTLGMLPILLLLLPLVAFADGDPPTI--QGQSAKLLKIVTK-----REG-EQAGR 51
A0A0C9R731 A0A0C9R731_9CAEN 1 -MSTLGMLPILLLLLPLAAFADGDPPTI--QGQSAKLLKIVTK-----RDMCDQGRD 52
A0A5P8I0R0 A0A5P8I0R0_CONMA 1 -MSTLKMMLLILLLLLPMATFSDGQAI--PGGGIPSAVNSRV---GGDEKSGRSLEKR 53
A0A0C9RYH5 A0A0C9RYH5_9CAEN 1 -MSTLGMLPILLLLLPLAAFADGDPPTI--QGQSAKLLKIVTK-----RDMCDQGRD 52
P0DM18 NF1_CONMR 1 -MSTLKMMLLILLLLLPLATFSDGQAI--PGGGIPSAVNSRVGRLLGGDEKSGRSLEKR 57
P0DM20 NF3_CONMR 1 -MSTLKMMLLILLLLLPMATFSDGQAI--PGGGIPSAVNSRV---RGDEKSGRSLEKR 53
A0A125S9F0 CNG_CONIM 1 -MSTLGMLLILLLLLPLATFADGPTM--RGHRSAKLLAHTTR-----DSC--PSGTN 49
P0DM19 NF2_CONMR 1 -MSTLKMMLLILLLLLPMATFSDGQAI--PGGGIPSAVNSRV---GGDEKSGRSLEKR 53
A0A142C1E3 A0A142C1E3_CONBE 1 -MSTLGMVLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHRRHMDHGRSAVKR 59
A0A1P7ZCQ2 A0A1P7ZCQ2_CONBE 1 -MSTLGMVLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHRRHMDHGRSAVKR 59
A0A1P7ZCQ6 A0A1P7ZCQ6_CONBE 1 -MSTLGMVLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHRRHMDHGRSAVKR 59
A0A1P7ZCQ1 A0A1P7ZCQ1_CONBE 1 -MSTLGMVLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHRRHMDHGRSAVKR 59
A0A1P7ZCQ8 A0A1P7ZCQ8_CONBE 1 -MSTLGMVLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHRRHMDHGRSAVKR 59
A0A0K8TUL0 A0A0K8TUL0_9CAEN 1 -MPKLAMMLLV-LLILPLPCFDAGGQAA--QGDGHGDGMD---RYLLRDRNVQATCLPE 53
A0A1P7ZCQ4 A0A1P7ZCQ4_CONBE 1 -MSTLGMVLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHRRHMDHGRSAVKR 59
D6C4H8 CUM1_CONCL 1 -MTTLGMTMLVLLLLPLATCLDGDGERS--PWDSLLRALRSDPQ-----A---CEPT 46
* * : : * ::* .

```

Figura 23. Alineamiento de secuencias entre la conotoxina de la superfamilia N perteneciente a la especie *C. fergusonii* con número de terminación en el código 679D1, y otras conopéptidos del género *Conus*. Para este análisis se utilizó Clustal-Omega y el algoritmo HAlign de la plataforma UniProt; usando únicamente la base de datos UniProtKB. Se generó una matriz automática pam30 con un *E-threshold* de 1.; la incorporación de *gaps* y un *hit* máximo de 50 resultados. Como puede observarse se presenta un “match” con 25 proteínas diferentes. En color rosa, se observa el péptido señal de cada una de las entradas; así como los residuos que coinciden en todas las secuencias (*); una conservación fuerte (:) en esa posición; y una conservación débil (.)

Por otra parte, se eliminaron las regiones propuestas como péptido señal y propéptido de la conotoxina N perteneciente a *C. fergusonii* con el número de entrada en el transcriptoma 3975 y nuevamente se realizó un alineamiento de secuencias. Esto para observar específicamente las relaciones filogenéticas de este carácter, aunque en esta ocasión, utilizando la región altamente variable (péptido maduro). Dicho análisis nos proporcionaría información más precisa. Cabe mencionar que al tratarse de una región con una alta tasa de mutación y ser una conotoxina divergente o una superfamilia muy poco estudiada, se tuvieron que modificar algunas condiciones. En esta ocasión, durante el BLAST se generó una matriz automática *pam70* con un *E-threshold* de 10. Los resultados de este alineamiento se presentan a continuación (Figura 24):

B20210328A94466D2655679D1..	1	-----IRTPSSGCSFKPPCDSGKWCC	22	
A0A142C1V2	A0A142C1V2_CONBE	1	-----SINRRECEQSGRTCDSDTWCCD	22
A0A142C1K1	A0A142C1K1_CONBE	1	MSALGTMLLI-LLLLPLAAFDDGPTI-RGHSSNKLWRSINRRECD-QNRECESGKWCCD	57
A0A0C9SFL6	A0A0C9SFL6_9CAEN	1	MSTLGMLPILLLLLPLAAFDDGPTDGGQWGSAKLLKSITKREGEQAGRPCDSSGKWCCD	60
A0A0C9S5U2	A0A0C9S5U2_9CAEN	1	MSTLGMLPILLLLLPLAAFDDGPTDGGQWGSAKLLKSITKREGEQAGRPCDSSGKWCCD	60
A0A0K8TUU2	A0A0K8TUU2_CONLV	1	MSTLGMLPILLLLLPLVAFDDGPTI-QGQRS AKLLKIVTKEMCQ-HSDPCSSGKWCCD	58
A0A291C2G6	A0A291C2G6_CONPC	1	MSTLRMMLLILLLLLPMAAFADDRPTI-RGQRS AKFLKSITKRECD-QGRPCDSSGKWCCD	58
A0A0K8TUI2	A0A0K8TUI2_9CAEN	1	MSTLGMLPILLLLLPLAAFDDGPTI-QGQRS AKLLKIVTKEMCQ-HSDPCSSGKWCCD	58
			* * *	
.				
B20210328A94466D2655679D1..	23	TCCPSSDYTCGRAGP-LGQQVPCV----	46	
A0A142C1V2	A0A142C1V2_CONBE	23	ECCDSSDCTCKTVDIGNGVIVQACDCTGGK	52
A0A142C1K1	A0A142C1K1_CONBE	58	QCCARSNCECRSEDVGGGVNIRVDCD----	83
A0A0C9SFL6	A0A0C9SFL6_9CAEN	61	DCCETSNCCEQKNNVGITFCAC-----	82
A0A0C9S5U2	A0A0C9S5U2_9CAEN	61	DCCETSNCCEQKNNVGYGICASP--C----	84
A0A0K8TUU2	A0A0K8TUU2_CONLV	59	ECCSSRCRCRTTNHE-DIMKSTKAC----	83
A0A291C2G6	A0A291C2G6_CONPC	59	DCCKRSNCGERWELL-DGIRYRVDCD----	83
A0A0K8TUI2	A0A0K8TUI2_9CAEN	59	ECCSSRCRCRTTNHE-DIMKSTKAC----	83
			** * *	

Figura 24. Determinación del péptido maduro de la conotoxina N perteneciente a *C. fergusonii* y sus relaciones filogenéticas con las conotoxinas maduras de otras especies. Durante este alineamiento, el BLAST y alineamiento arrojaron una similitud en la secuencia de siete proteínas pertenecientes a cuatro especies diferentes del género *Conus*. Como puede observarse, aquellos residuos de aminoácidos coloreados en una escala de grises son los que coinciden con la secuencia de la conotoxina N de nuestro interés (código de entrada 679D1).

Por último, se regresó a las condiciones iniciales de BLAST (base de datos UniProtKB, una matriz automática *pam70* con un *E-threshold* de 1) para filtrar de una manera más exhaustiva las relaciones filogenéticas de la conotoxina N, comparada únicamente con secuencias que tuvieran una estructura secundaria similar; particularmente un patrón de cisteínas con 8 residuos. Como consecuencia, el alineamiento solamente presentó similitud con una conotoxina divergente de la especie *C. betulinus* y una identidad de secuencia de 48.4% (Figura 25).

```

B20210328A94466D2655679D1.. 1 -----IRTPSSGCSFKPPQDSGKWCCLTC
A0A142C1H9 A0A142C1H9_CONBE 1 MMSALGMMLLLHLLPLVAFDGDGPTIRGRNARFLKRMITRTQNPETPCSSNKWCODEC
                                     * : * *: **.******
                                     *

B20210328A94466D2655679D1.. 25 CPSSDYTCGRAGPLGQQVPVQV-
A0A142C1H9 A0A142C1H9_CONBE 61 CERSDCGKKEGGSTIKIYVDCD
                                     * ** * * :: **

```

Figura 25. Alineamiento de secuencias entre dos péptidos maduros correspondientes a la especie *C. fergusonii* y *C. betulinus* (conotoxina N, con el número de entrada en transcriptoma 3975).

Aunado al análisis de secuencias realizado con la primera conotoxina N, se prosiguió con el mismo procedimiento para nuestra segunda secuencia problema, que también pertenece a la superfamilia N con el número de entrada en el transcriptoma 2334. Por lo tanto, lo primero que se hizo fue un *BLAST* con una matriz *PAM70*, un *threshold* de 1 y un número máximo de resultados (*hits*) de 50. Aunque se observó similitud con 32 conotoxinas de 11 especies diferentes, de igual forma solamente se presentan 25 resultados. Cabe mencionar que realmente se arrojó un resultado con 41 “matches”; pero 9 de estas coincidencias pertenecían a genes parálogos de otros *phyla*.

Los resultados de los alineamientos se presentan en la Figura 26 y 27. De igual forma que con la primera conotoxina N, primero se realizó un alineamiento con toda la secuencia para tratar de dilucidar las relaciones filogenéticas con base en el péptido señal y propéptido (códigos de acceso de cada especie descritos en la Tabla 8). Una vez que se encontró similitud con otras especies del género *Conus*, el siguiente paso fue generar un alineamiento únicamente utilizando la secuencia del péptido maduro. Es necesario recordar que este paso se hizo con el propósito de filtrar de una manera más exhaustiva las relaciones evolutivas de este carácter (al menos en términos estructurales), ya que se trata de una región altamente variable en términos de mutaciones que se han introducido a lo largo de millones de años.

Tabla 9. Códigos de acceso pertenecientes a cada una de las especies del género *Conus* que se utilizaron para el BLAST y los alineamientos de secuencias con respecto a la conotoxina N 2334.

Códigos de acceso de las especies del género <i>Conus</i>				
<u>Q3YED7</u> <i>C. magus</i> ⁸⁰	<u>A0A0K8TUA2</u> <i>C. lenavati</i> ⁸¹	<u>V5V8G3</u> <i>C. flavidus</i> ⁸²	<u>V5V7U7</u> <i>C. flavidus</i>	<u>V5V8E2</u> <i>C. flavidus</i> ⁸³
<u>A0A0K2S6Y2</u> <i>C. episcopatus</i> ⁸⁴	<u>A0A346CIZ6</u> <i>C. ermineus</i> ⁸⁵	<u>A0A5P8I0V1</u> <i>C. magus</i>	<u>A0A142C1I2</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A0C9SFL6</u> <i>C. tribblei</i>
<u>A0A0C9S5U2</u> <i>C. tribblei</i> ⁸⁶	<u>A0A142C1E3</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A1P7ZCQ8</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A0C9SEK7</u> <i>C. tribblei</i>	<u>A0A1P7ZCQ1</u> <i>C. betulinus</i> ⁸⁷
<u>V5V9Y7</u> <i>C. caracteris</i> ⁸⁸	<u>A0A1P7ZCQ4</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A142C1E4</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A1P7ZCQ2</u> <i>C. betulinus</i>	<u>A0A1P7ZCQ6</u> <i>C. betulinus</i>
<u>V5V8D7</u> <i>C. quercinus</i>	<u>A0A125S9F0</u> <i>C. imperialis</i>	<u>D3JWK7</u> <i>C. californicus</i>	<u>V5V897</u> <i>C. quercinus</i>	<u>A0A142C1K6</u> <i>C. betulinus</i>

```

B20210328A94466D2655679D1.. 1 -MSTLGMILLI-APLLPLANPADNGDGQA-KP-RS----RNLRLSLAFGRTPRRLDKR--- 49
Q3YED7 Q3YED7_CONMA 1 -MAKL---TVL-LLVAAVLLSQTQVLVQGDGET-PQ-----RARFFTA-RK-FSGVNK 44
A0A0K8TUA2 A0A0K8TUA2_CONLV 1 -MSTLGMMLPI LLLLLPLVAFADDGPTDGQGW-----GSAKLLKSIIT-KREGEQA--G 49
V5V8G3 V5V8G3_CONFL 1 -MHTLEM LLLL-LLLLPLAPGEGDGDG--QAVAGDRNPGEARSTHKKRFLQRPARRIHRH--R 54
V5V7U7 V5V7U7_CONFL 1 -MHTLEM LLLL-LLLLPLAPGEGDGDG--QAVAGDRNPGEARSTHKKRFLQRPARRIHRH--R 54
V5V8E2 V5V8E2_CONFL 1 -MHTLEM LLLL-LLLLPLAPGEGDGDG--QAVAGDRNPGEARSTHKKRFLQRPARRIHRH--R 54
A0A0K2S6Y2 A0A0K2S6Y2_CONEP 1 MMSKLGAMFVL-LPLFTLASSQEKGDVQAGKT-QK-----S-DFYRTLTR-SARGCT 48
A0A346CIZ6 A0A346CIZ6_CONER 1 MMSKMGAMFVL-LLLFTLASSQEGDVQARKT-HL-----KSVFRTLPR-SGLTCT 49
A0A5P8I0V1 A0A5P8I0V1_CONMA 1 MMSKMGAMFVL-LLLFTLASSQEGDVQARKI-RL-----RNDFLRTSRMIFTRGGC 50
A0A142C1I1 A0A142C1I1_CONBE 1 -MHTLEM LLLI-LLLLPLATGEGDGDG--RAVGGDRSPSEAHRTYKRLLRPARPVDRR--E 54
A0A0C9SFL6 A0A0C9SFL6_9CAEN 1 -MSTLGMMLPI LLLLLPLAFAADDGPTDGQGW-----GSAKLLKSIIT-KREGEQA--G 49
A0A0C9S5U2 A0A0C9S5U2_9CAEN 1 -MSTLGMMLPI LLLLLPLAFAADDGPTDGQGW-----GSAKLLKSIIT-KREGEQA--G 49
A0A142C1E3 A0A142C1E3_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHLRR-HMDHGRS--A 56
A0A1P7ZCQ8 A0A1P7ZCQ8_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHLRR-HMDHGRS--A 56
A0A0C9SEK7 A0A0C9SEK7_9CAEN 1 --MMSTMLLI I-LLLVLASLEQNLGDGSTQKD-RD----LNAVSSHFI RLLRGTTKR--- 49
A0A1P7ZCQ1 A0A1P7ZCQ1_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHLRR-HMDHGRS--A 56
V5V9Y7 CQ62_CONCB 1 -MHTLEM LLLV-LLLVLAPGEGDGDG--QAVGGDRNPSEARRAYKRLLRPARMDRG--G 54
A0A1P7ZCQ4 A0A1P7ZCQ4_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHLRR-HMDHGRS--A 56
A0A142C1E4 A0A142C1E4_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPKLHLRR-HVDHGRS--A 56
A0A1P7ZCQ2 A0A1P7ZCQ2_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPRLHLRR-HMDHGRS--A 56
A0A1P7ZCQ6 A0A1P7ZCQ6_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPNLHLRR-HMDHGRS--A 56
V5V8D7 V5V8D7_CONQU 1 -MHTLEM LLLL-LLLLPLAPGEGDGDG--QAVAGDRNPSEARSTYKRFQRPARRIDRR--D 54
A0A125S9F0 CNG_CONIM 1 -MSTLGM LLI LLLLLPLATFADDGPTMR-GH-----RSAKLLAH-T-TRDSCPS--G 47
D3JWK7 CUM2_CONCL 1 MMSTKGITLFLCLLLLALATSVNGGQ---GTR-RS----RMTRALHGGRRPSARYDAP--- 49
V5V897 V5V897_CONQU 1 -MHTLEM LLLL-LLLLPLAPGEGDGDG--QAVAGDRNPSEARSTYKRFQRPARRIDRR--E 54
A0A142C1K6 A0A142C1K6_CONBE 1 -MSTLGMV LLLLLLLLLPLGNSDGDGDRQAMDRDRDTAGEARSAPKLHLRR-HVDHGRS--A 56

```

Figura 26. Alineamiento de la secuencia completa (secuencia señal, propéptido y péptido maduro) de una conotoxina N con el número de entrada 2334 en el transcriptoma perteneciente a *C. fergusonii*. Se presenta un “match” con 25 resultados y 11 especies diferentes que presentan una posible relación filogenética con *C. fergusonii*. En color rosa se presentan las regiones que pertenecen al péptido señal.

```

B20210328A94466D2655679D1.. 1 -----GCDPTEGCQTT 11
AOA0C9SEP0 AOA0C9SEP0_9CAEN 1 MSTLGTLLLIALLLPLVNPADNGDQAKPRTRNLRSLGLGRTPRRLDKRGCDPTDGCQTV 60
POC8W0 CJA_CONDI 1 MSTLGIILLPIALLLPLANPAENGDGQAMPRTNLRSLSFGRTLRRLEKRGCDPTDGCQTT 60
*****:****.

B20210328A94466D2655679D1.. 12 VCDTSTGPPCCQPDYNCQTQPSGSRACVRV-CPHNCP- 47
AOA0C9SEP0 AOA0C9SEP0_9CAEN 61 VCDTSTGPPCCPSGYKQQTQLSGTTACVLD-CAHNCP- 96
POC8W0 CJA_CONDI 61 VCETDTGPPCCCKPNFTCCQISNSGTRKSCSCSGQPSDCPV 98
**:*:***** .:.* . **:*  :**

B20210328A94466D2655679D1.. 1 -----GCDPTEGCQTT 11
AOA0C9SEP0 AOA0C9SEP0_9CAEN 1 MSTLGTLLLIALLLPLVNPADNGDQAKPRTRNLRSLGLGRTPRRLDKRGCDPTDGCQTV 60
POC8W0 CJA_CONDI 1 MSTLGIILLPIALLLPLANPAENGDGQAMPRTNLRSLSFGRTLRRLEKRGCDPTDGCQTT 60
*****:****.

B20210328A94466D2655679D1.. 12 VCDTSTGPPCCQPDYNCQTQPSGSRACVRV-CPHNCP- 47
AOA0C9SEP0 AOA0C9SEP0_9CAEN 61 VCDTSTGPPCCPSGYKQQTQLSGTTACVLD-CAHNCP- 96
POC8W0 CJA_CONDI 61 VCETDTGPPCCCKPNFTCCQISNSGTRKSCSCSGQPSDCPV 98
**:*:***** .:.* . **:*  :**

```

Figura 27. Alineamiento de la secuencia madura de una conotoxina N con el número de entrada 2334 en el transcriptoma de *C. fergusonii* En esta ocasión, solamente se utilizó la región madura del péptido y se arrojó un “match” con dos especies: *C. imperialis* (AOA0C9SEP0) y *C. distans* (POC8W0) respectivamente. En color rosa se presenta el péptido señal; en color rojo el propéptido y en color morado la toxina madura. En la escala de grises y marcados con un asterisco, se observan todos los residuos que se repiten en las tres secuencias.

9.7 Modelo por homología de una conotoxina perteneciente a *C. fergusonii*

En el siguiente paso de nuestro análisis se intentó obtener un modelo por homología del péptido que resultara de nuestros alineamientos. Se recuerda nuevamente que no se obtuvo ninguna secuencia por el método de la degradación de Edman de ninguna de las dos muestras que se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Por lo tanto, como un primer acercamiento para conocer la naturaleza de la estructura tridimensional de las conotoxinas N y/o divergentes del veneno de *C. fergusonii*, que probablemente están presentes en nuestro componente en común (señales mayoritarias dentro de los perfiles cromatográficos con un tiempo de elución de 50 minutos), se decidió obtener un modelo por homología de ambos péptidos descritos anteriormente.

Idealmente, se pretendió elegir aquellos modelos que tuvieran el mayor porcentaje de cobertura en cuanto a la secuencia. Por lo tanto, utilizando nuevamente la información de los alineamientos de secuencias encontramos que, desafortunadamente, no existen demasiadas estructuras resueltas de conotoxinas N y/o divergentes MSTLGMTLL-, ya sea por la técnica de resonancia magnética o por cristalografía. Además, no existe ningún modelo tridimensional que se parezca, al menos en términos de secuencia, con los péptidos maduros de *C. fergusonii*. Incluso, de los péptidos maduros que mostraron una similitud alta (Figura 25 y 27), solamente se tiene información de los transcriptomas pertenecientes a cada especie, pero no se cuenta con información estructural. Sin embargo, y dado que se tiene un mínimo de información estructural respecto a estas nuevas conotoxinas, el servidor de *SWISS MODEL* solamente arrojó un modelo parcial para cada una de ellas.

Los siguientes parámetros para evaluar los modelos generados en función de la estereoquímica de la proteína de interés pueden ser visualizados y analizados a detalle con diferentes herramientas computacionales como *PROCHECK*, *WHATCHECK*, *CHIMERA* y *MolProbity*. De manera general, *SWISS-MODEL*, presenta un gráfico con los siguientes parámetros:

- La Estimación de la Calidad Global del Modelo (*GMQE*) que correlaciona el grado de identidad del alineamiento de secuencia y el porcentaje de cobertura que se requirió de la secuencia blanco para construir el modelo por homología. Los valores van de 0-1; por lo que se requiere llegar a la unidad para obtener un puntaje perfecto.
- El Análisis de Energía del Modelo Cualitativo (*QMEAN*) para dar puntaje a las interacciones energéticas de C β , además de la desviación de C β . En este caso, los valores presentados tienen que estar lo más cercano posible al cero. Es importante mencionar como una regla general, que *SWISS-MODEL* indica con un símbolo de *thumbs-down* (mano abajo) que el modelo deja de ser confiable con valores que sean más negativos que menos cuatro.
- La energía derivada de la distancia que existe entre todos los átomos de la proteína (*clashes*). Este valor también tiene que estar lo más cercano posible de cero para alcanzar un puntaje perfecto. Se pretende mostrar que en la estructura no exista demasiada cercanía entre los átomos, ya que esto incrementaría significativamente el estado energético de la proteína.
- La solvatación que permite analizar interacciones energéticas generadas por el colapso hidrofóbico. Específicamente, se evalúa la interacción entre las cadenas laterales de cada residuo de la proteína y el agua ⁹⁰.

- *Outliers* de rotámeros que analiza las posibles conformaciones que adquiere la cadena lateral de cada residuo dentro de la proteína. De esta manera, se pretende escoger aquellos ángulos de torsión que favorecen el estado de mínima energía.
- *Ramachandran plots* que evalúa aquellas geometrías permitidas dentro de los ángulos phi (Φ) y psi (Ψ) correspondientes a los enlaces pépticos contiguos que un aminoácido puede formar. Tanto *SWISS-MODEL* como *Molprobability* dan un porcentaje máximo del 100% ⁹¹.

9.8 Selección del molde para construir el modelo parcial de la conotoxina N de *C. fergusonii* con el número de entrada 3975.

SWISS-MODEL arrojó un modelo tridimensional de una conotoxina de la superfamilia N 3975, utilizando como molde otra conotoxina de la superfamilia I y de la familia I3 aislada del caracol marino *C. geographus* con el número de acceso *6cei* (también conocida como *GXIA*) y que fue resuelta por NMR (Tabla 10 y Figura 28). Esta toxina ya fue resuelta hace tres años, no se tienen indicios sobre su posible blanco molecular. Aunque se reportó un dominio ICK+1, además de una triple hoja beta con un *backbone* similar al que se presenta en diferentes toxinas de tarántulas que suelen unirse al sensor de voltaje de canales iónicos de sodio y potasio. Por lo tanto, podría decirse que se tiene suficiente información estructural. El molde es una secuencia de 32 aminoácidos y en la Figura 28, se observa el arreglo de la secuencia completa (secuencia señal, propéptido y péptido maduro), así como la estructura secundaria de la conotoxina I3 con su arreglo característico de 8 cisteínas.

9.9 Modelo parcial de la conotoxina N de *C. fergusonii* con el número de entrada 3975

El modelo de la conotoxina (Figura 29) presentó gran similitud estructural con respecto a la plantilla que se utilizó. Se observan 3 hojas beta, o específicamente, dos hojas y un giro beta. Cabe mencionar que no se tomaron en cuenta los 47 aminoácidos del péptido maduro de la conotoxina N perteneciente a *C. fergusonii*; sino que *SWISS-MODEL* solamente usó 32 residuos y un *gap* para alinear la secuencia y resolver el modelo por homología con una cobertura del 70% de nuestra secuencia problema. Una de las principales diferencias con respecto a la plantilla (además de la longitud de la secuencia madura), es que la conotoxina N no está modelada con 4 puentes disulfuro, sino con 3.

Tabla 10. Se muestra la plantilla que se filtró y que se encontró como potencial molde.

Modelo	Archivo	Construcción	Ligando	GMQE	QMEAN	Cobertura
01	PDB	ProMod3 3.2.0	Ninguno	0.25	-2.63	0.70
Plantilla	Identidad secuencia	Estado-Oligo	Base de datos	Método	Similitud Secuencia	Descripción
6cei.1.A	25.00	Monómero	User alignment	NMR	0.37	GXIA

A

10 20 30 40 50
 MKLFLAIVLI LMLQLSTGA ETSDNHASRS TTALRDWLLG PKAKRCAVTH
 60 70
 EKCSDDYDCC GSLCCVGICA KTIAPCK

B

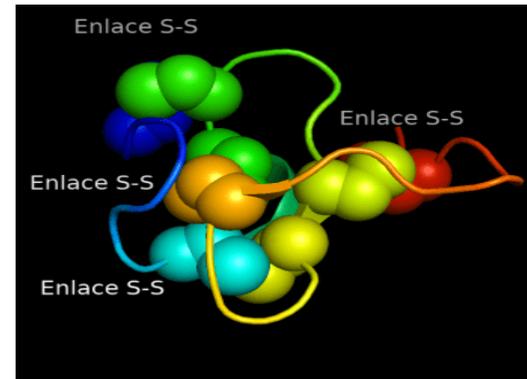
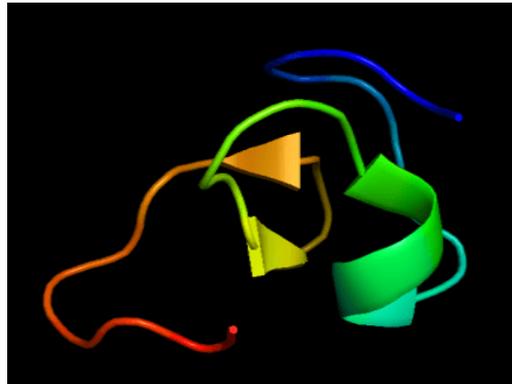
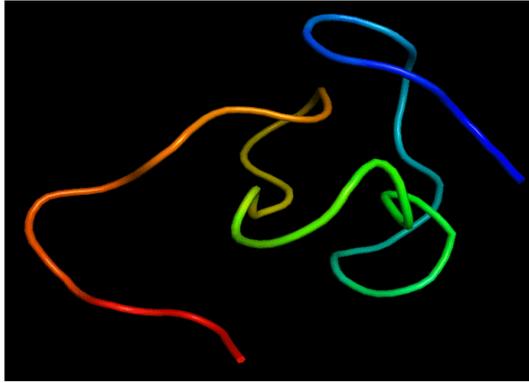
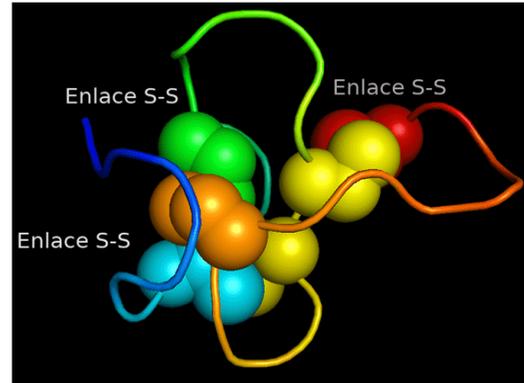
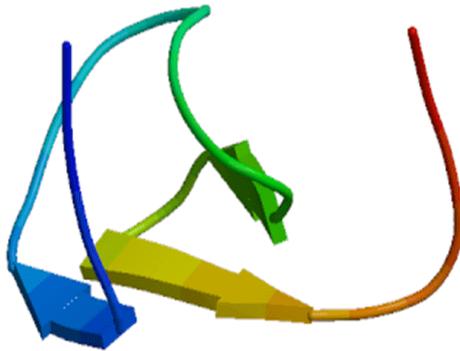


Figura 28. Molde utilizado para construir el modelo tridimensional de la conotoxina N 3975. A) Se observa la secuencia primaria de la conotoxina I3, incluyendo la secuencia señal en color rojo (aminoácidos 1-20); el propéptido en color azul (aminoácidos 20-45) y el péptido maduro en color negro (aminoácidos 46-77). B) Se observa la estructura tridimensional de la conotoxina GXIA mediante el visualizador *Pymol*. En la parte izquierda de este panel, se muestran las distintas cadenas de aminoácidos, coloreadas en arcoiris. Se destaca un giro β y dos láminas β antiparalelas; mientras que en el modelo del lado derecho, se destacan la unión de los cuatro puentes disulfuro en forma de esferas.

A**B****C****D**

Estimadores Globales de la Calidad

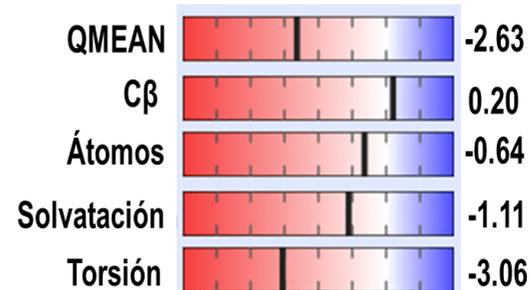


Figura 29. Modelo por homología de una conotoxina de la superfamilia N perteneciente a la especie *C. fergusonii*. A pesar de que durante el alineamiento de secuencias, SWISS-MODEL no encontró plantillas que hicieran un “match” para generar un modelo confiable; se decidió utilizar otra herramienta del servidor conocida como *Target-Template Alignment*, ya que sí se arrojaron 8 plantillas de baja calidad. Casualmente, una de esas plantillas consistía en una conotoxina I aislada de *C. geographus* con el número de acceso 6cei. Al realizar un alineamiento independiente se obtuvo un puntaje con 37% de similitud; por lo que se prosiguió a generar un modelo tridimensional por homología. En el panel A se observan las cadenas de aminoácidos en diferente color, que no muestran ningún giro beta. En el panel B, el modelo destaca tres de los cuatro puentes disulfuro que debe contener la conotoxina con el patrón de cisteínas XI. En el panel C nuevamente se muestra el modelo tridimensional de la conotoxina N visualizado en la plataforma de SWISS-MODEL. Sin embargo, en esta ocasión se alcanzan a observar algunas conformaciones de hojas beta formadas por las cadenas laterales de algunos residuos. En el panel D, se muestran algunos parámetros que evalúan la calidad del modelo que se generó. El valor de QMEAN está por debajo de menos cuatro; por lo que se puede hablar de un modelo confiable. La geometría de los carbonos beta (β), así como la distancia entre los átomos y la solvatación de los ángulos de carbonos alfa tienen valores cercanos a cero. Por lo tanto, son parámetros aceptables. El valor de la torsión es el que más se aleja del cero; sin embargo, sigue dentro del rango aceptado. Otros parámetros como el gráfico de Ramachandran, se muestran en el apéndice de este trabajo.

9.10 Selección del molde para construir el modelo parcial de la conotoxina N de *C. fergusonii* con el número de entrada 2334

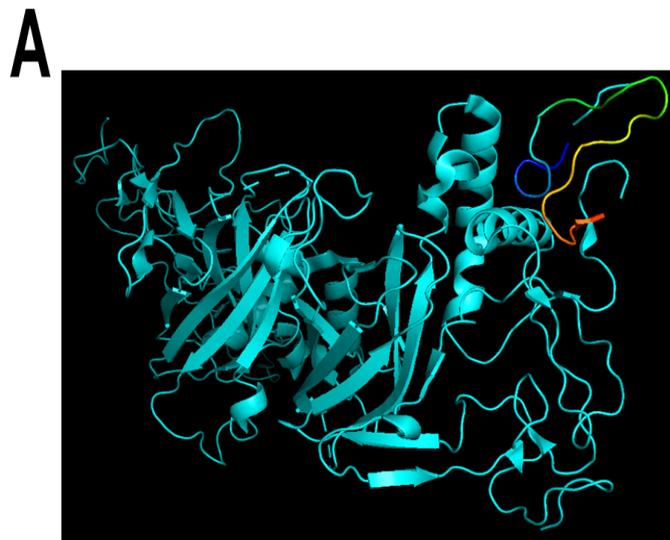
Como ya se ha mencionado anteriormente, no existe suficiente información estructural correspondiente a conotoxinas N con 10 residuos de cisteínas y por lo tanto 5 puentes disulfuro. El servidor SWISS-MODEL arrojó 23 plantillas, de las cuales 22 eran de baja calidad, pero una de ellas presentó un porcentaje de identidad del 40% y un porcentaje de similitud del 41%. En el caso del modelo tridimensional de la conotoxina N de *C. fergusonii* con el número de entrada 2334; SWISS-MODEL utilizó como molde un gen parálogo perteneciente a una proteína beta-2 laminar con el código de acceso 5lf2 en PDB (Figura 30). Esta proteína es la mayor constituyente de todas las membranas basales y fue resuelta por difracción de rayos X con una resolución de 1.85 Å. Además, pertenece a la especie *Rattus norvegicus*. Cabe mencionar que una de las regiones que pertenece a un asa que conecta una de las alfa hélices con las hojas beta de la proteína, es la que SWISS-MODEL utilizó para generar el modelo tridimensional de la conotoxina. Específicamente, solo se utilizaron 25 residuos de la proteína beta-2 laminar y dos *gaps* para generar el alineamiento correspondiente antes de generar el modelo por homología. Los aminoácidos que se utilizaron se encuentran sombreados en la secuencia mostrada de la figura 30B.

9.11 Modelo parcial de la conotoxina N de *C. fergusonii* con el número de entrada 2334

Fue posible generar un modelo por homología directamente, sin utilizar la herramienta *Target-Template Alignment*. Específicamente, el modelo de la conotoxina N 2334 de *C. fergusonii* presentó una gran similitud con respecto a la plantilla correspondiente a la proteína beta-2 laminar (Tabla 11). A pesar de que el molde que se usó para generar este modelo es una región abundante en cisteínas por conectar cadenas alfa; la cobertura del modelo sólo alcanzó un 53%. Entonces, únicamente se observa la conformación de dos puentes disulfuro (Figura 31). Sin embargo, los parámetros globales de la calidad del modelo, así como la identidad y similitud de la secuencia son altamente aceptables.

Tabla 11. Se muestra la plantilla que se filtró y que se encontró como potencial molde.

Modelo	Archivo	Construcción	Ligando	GMQE	QMEAN	Cobertura
01	PDB	ProMod3 3.2.0	Ninguno	0.22	-0.90	0.53
Plantilla	Identidad secuencia	Estado-Oligo	Base de datos	Método	Similitud Secuencia	Descripción
5lf2.1.A	40.00	Monómero	HHblits	X-ray	0.41	Beta-2 laminar



B

460	470	480	490	500
RCQQCRDGGFF	GLSASNPRGC	QRCQCNSRGT	VPGGTPCDSS	SGTCFCRRLV
510	520	530	540	550
TGDGCDRCLP	GHWGLSHDLL	GCRPCD	CDVG GALDPQCDEA	TGQCPCRPHM
560	570	580	590	600
IGRRCEVQP	GYFRPFLDHL	TWEAEGAHGQ	VLEVERLVT	NRETPSWTGV

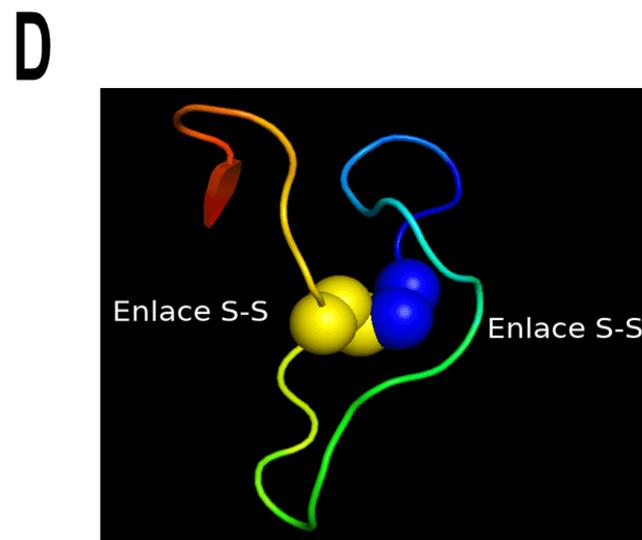
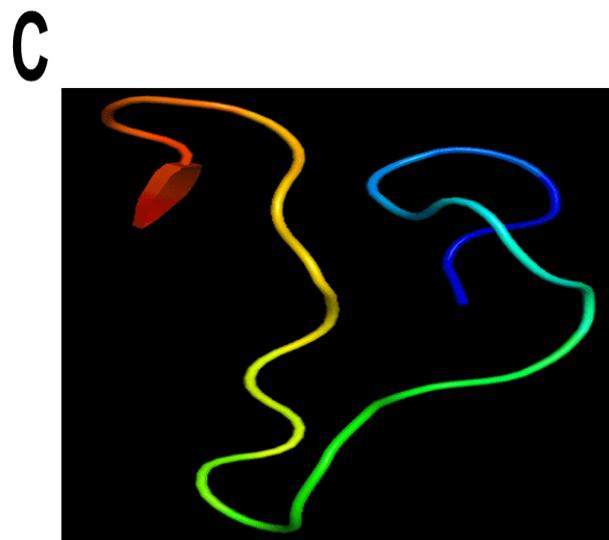


Figura 30. Molde utilizado para construir el modelo tridimensional de la conotoxina N 2334. En el panel A), se observa la estructura resuelta por difracción de rayos X de la proteína beta-2 laminar. Coloreada en modo de arcoíris está diferenciada la región de la proteína que se utilizó como molde para construir el modelo por homología de la conotoxina N 2334. El resto de la proteína se encuentra coloreada en color magenta. En el panel B), se observa la secuencia primaria de la proteína beta-2 laminar. Subrayada en color naranja está la secuencia utilizada como plantilla para el alineamiento con nuestra secuencia problema. En el panel C) se muestra una visualización en *Pymol* de aquella región de la proteína beta-2 laminar que fue aislada y utilizada como molde. No se define la formación de ninguna alfa hélice ni hoja beta; solamente se observa un giro. En el panel D), se muestra la formación de dos puentes disulfuro que le dan estabilidad a la estructura secundaria de la región proteica.

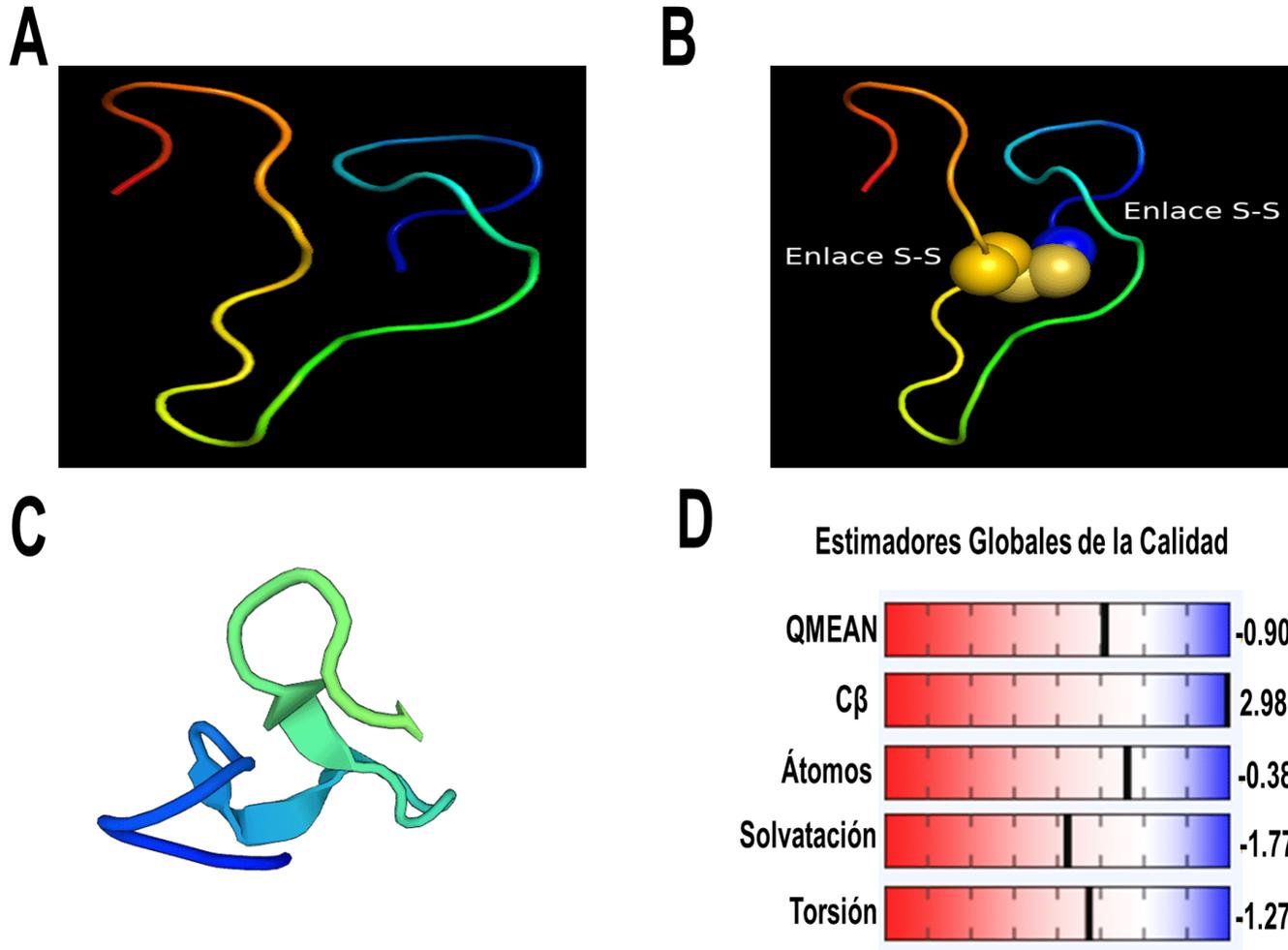


Figura 31. Modelo tridimensional por homología de la conotoxina N 2334 de *C. fergusonii*. En el panel A) se visualiza en *Pymol* el modelo por homología. Las diferentes cadenas alfa se colorean en modo de arcoíris y como puede observarse es una estructura similar al molde de la proteína beta-2 laminar. En el panel B) se visualiza la misma estructura, pero identificando la formación de dos puentes disulfuro vistos en modo de esferas, los cuales coinciden con los dos puentes disulfuro del molde. Panel C) Visualización del modelo de la conotoxina N 2334 directamente del servidor *SWISS-MODEL*. A diferencia de *Pymol*, aquí sí es posible observar la formación de láminas beta (β). En el panel D) se muestran los valores globales de la calidad con un QMEAN de -0.90, lo cual nos habla de un modelo confiable. La geometría de los carbonos beta (β), así como la distancia entre los átomos, la solvatación de los ángulos de carbonos alfa y la torsión de los enlaces presentan valores cercanos a cero. Por lo tanto, son parámetros aceptables. Otros parámetros como el gráfico de Ramachandran también se muestran en el apéndice de este trabajo.

9.12 Acoplamiento molecular de la conotoxina 3975 con los canales Nav 1.4 y Nav 1.5

El análisis de acoplamiento molecular (“docking” molecular) requiere de una comprensión estructural y funcional de las proteínas de interés, ya que pueden modificarse algunos parámetros como la remoción de ciertas regiones de la proteína, o construir homo-multímeros en función de la dispersión de los ángulos de aquellas estructuras que han sido resueltas por difracción de rayos X. De hecho, es menester tratar de utilizar los cristales que se han obtenido de las estructuras, debido a que nos ofrecen una mejor resolución en el nivel atómico (2 Å)⁹².

Cuando se carece de una estructura resuelta por rayos X, se puede optar por usar una estructura surgida de la resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) o en su defecto, algún modelo construido por homología. Aunque no es lo más ortodoxo, se tiene que ser consciente de que en la actualidad es difícil resolver el cristal de una proteína; sobre todo, cuando se encuentra inmersa en la membrana y sufre algunos cambios conformacionales de acuerdo a su función. Por supuesto que una vez que se define la interacción entre proteínas o entre ligando y proteína; se debe desconfiar tanto del modelo como de los sitios de unión, porque no se puede correlacionar al cien por ciento con las estructuras nativas y sus estados energéticos en cada conformación.

De manera general, el protocolo establecido por el servidor *ClusPro 2.0* se basa en tres simples pasos para el usuario. Aunque ninguna fase de la metodología es trivial, se puede hacer un resumen de la misma, una vez que se han cargado los archivos PDB de las proteínas de interés.

- 1) Se define un “acoplamiento de medio rígido” (*rigid body docking* por sus siglas en inglés); lo cual significa que ninguno de los ángulos de enlace, la longitud de los enlaces; así como la torsión de los enlaces se verán modificados entre el receptor (en nuestro caso un canal iónico) y el ligando. Durante este paso, el receptor se coloca dentro de un “grid” (caja de búsqueda) en el origen de las coordenadas x , y , z ; mientras que el ligando se coloca en un *grid* móvil (70000 rotaciones) para que se puede posicionar en regiones particulares del receptor. Este acoplamiento, genera un estado energético que se evalúa por medio de una correlación con la función de la Transformada Rápida de Fourier (*FFT* siglas en inglés).

- 2) A partir de esta función, con un algoritmo denominado *PIPER* se puede muestrear un grupo de 1000 estructuras de interacción (una mala traducción para el término *docked-structures*) con la energía más baja y un valor de 10Å en la desviación cuadrática media de la raíz de interfaz (IRMSD). Esto significa que se seleccionan primero los residuos interface del ligando, los cuales se encuentran a una distancia de 10Å con respecto a cualquier átomo del receptor. Evidentemente, también se considera el valor de la raíz de desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés). Dicho valor, intenta reproducir la distancia entre la conformación nativa de un ligando en el receptor y la conformación predicha por el servidor. Sin embargo, esto sólo se aplica para los cristales de estructuras que han sido resueltas por difracción de rayos X ⁹³.
- 3) Por último, se consigue un tercer grupo de hasta 30 modelos, los cuales son llevados a una minimización de energía con una restricción de 300 pasos, manteniendo fijo los carbono alfa o backbone y aplicando un potencial de CHARMM quien se encarga de evaluar las fuerzas intermoleculares o fuerzas de *Van der Waals*. De esta manera, se pretende eliminar un solapamiento energético entre los átomos (*sterically clashing atoms*). Sin embargo, este proceso no produce cambios significativos sobre la geometría de los complejos proteicos, pero termina con un nuevo grupo de 10 modelos.

Dado que uno de los objetivos consistía en observar el efecto del veneno de *C. fergusonii* sobre canales de sodio activados por voltaje y dado que la conotoxina N con el número de entrada 3975 del transcrito presentó el patrón de cisteínas XI predicho por la herramienta de *Conoserver precursor analysis*; se decidió analizar si esta conotoxina podría interactuar al menos en términos de mecánica molecular (no así con ensayos electrofisiológicos) con algún subtipo de canales de sodio activados por voltaje. Dicho patrón de cisteínas se ha reportado como una característica estructural de la familia de conotoxinas I1-I3, y de hecho, en la literatura también se describe a los canales de sodio y potasio como posibles blancos moleculares de este tipo de péptidos ^{86 94}.

A través del servidor *ClusPro2.0* se generaron dos modelos de “*docking*” molecular. En ambos se utilizaron a los canales activados por voltaje Nav 1.4 y Nav 1.5 para interactuar con la estructura de la conotoxina 3975 generada con el servidor *SWISS-MODEL*, de acuerdo a las características antes mencionadas (Figura 32 y 33). También ya se ha mencionado que el servidor *ClusPro2.0* genera mil modelos que posteriormente serán filtrados hasta obtener treinta o menos. Dado que el propósito de este trabajo no es evaluar algún sitio de unión en particular ni hacer énfasis en la metodología del “*docking*” molecular, no se analizarán todos los modelos ni los valores de todos los coeficientes que se utilizaron para generarlos. Solamente se presenta un modelo por canal basado en el máximo número de *clusters* (soluciones idénticas con la misma orientación y/o posición del ligando) encontrados y en el coeficiente de balance para evaluar los parámetros energéticos de la interacción.

9.13 Interacción energética entre la conotoxina N3975 con el canal Nav 1.4 y el canal Nav 1.5

En el caso particular del canal Nav 1.4, se eligió el modelo con el número de acceso 630757.000.10 basado en el “coeficiente de balance” que presentó un *cluster* de 280 miembros, con un puntaje de mínima energía de -992.7 en el centro. Mientras que la estructura con la energía más baja obtuvo un puntaje de -1169.4 que también contiene 280 miembros (ver apéndice, Tabla 14). Para el canal Nav 1.5, se eligió el modelo con el número de acceso en la plataforma 630760.000.10 con el *cluster* más alto de 225 miembros y un puntaje de energía mínima de -1021.2 en el centro. La estructura con la energía más baja, obtuvo un puntaje de -1159.7 con el mismo número de miembros (ver apéndice, tabla 15). Ambos modelos se muestran en las Figuras 34 y 35.

9.14 Conotoxina N y/o divergente 3975 y canales Nav1.4 y Nav1.5 visualizados en Pymol

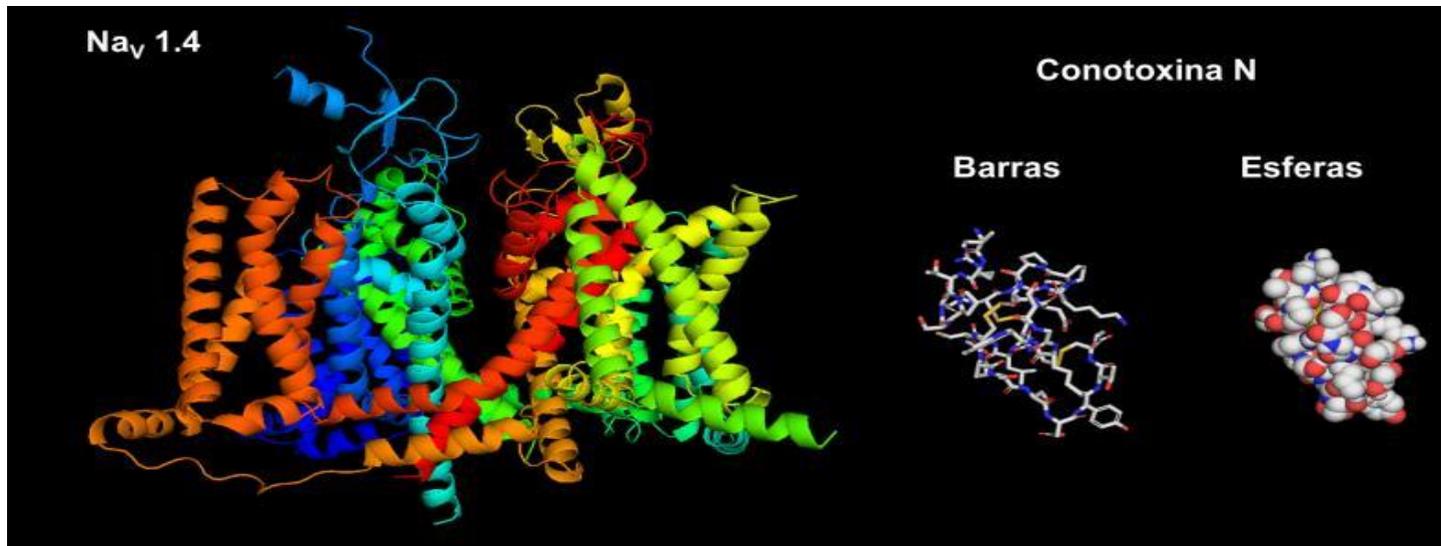


Figura 32. Modelo tridimensional del canal Nav1.4 visualizado en *Pymol* como “*cartoon*”. Además, también se presenta la conotoxina N 3975 obtenida a través del modelado por homología con SWISS-MODEL. Su visualización está en forma de barras (“*sticks*”) y esferas. En color amarillo se puede observar tres de los cuatro puentes disulfuro que se modelaron; mientras que un residuo de cisteína queda libre por falta de modelo.

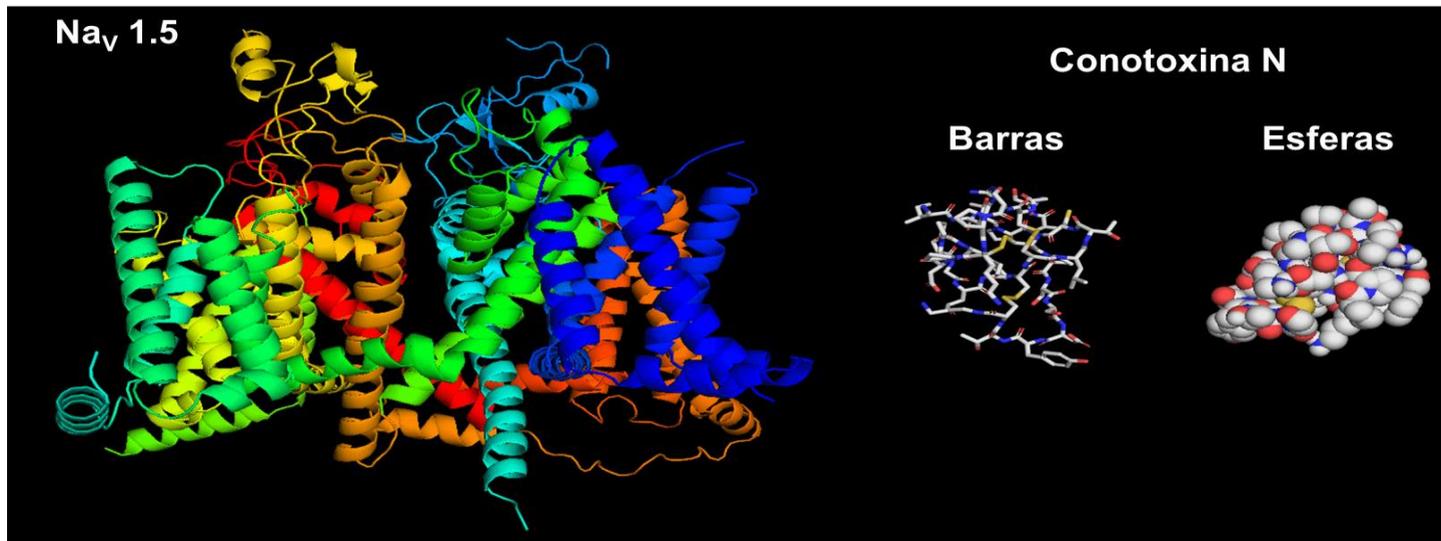


Figura 33. Modelo tridimensional del canal Nav1.5 visualizado en *Pymol* como “*cartoon*”. Además, también se presenta la conotoxina N 3975 obtenida a través del modelado por homología con SWISS-MODEL. Su visualización está en forma de esferas y barras (“*sticks*”).

9.15 Visualización de la conotoxina N 3975 interactuando con los dominios fragmentados de los canales Nav 1.4 y Nav 1.5 respectivamente

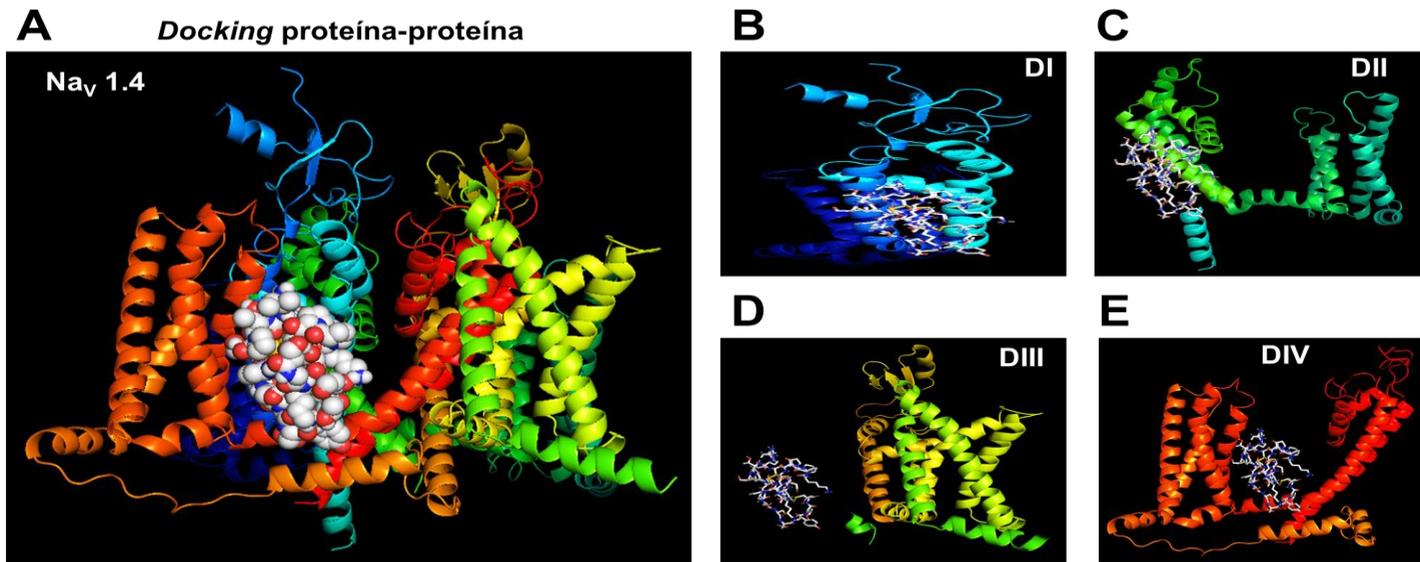


Figura 34. A) Modelo de acoplamiento molecular entre la conotoxina N 3975 y el canal Nav 1.4 B) Conotoxina N con el dominio I. C) Conotoxina N con el dominio II. D) Conotoxina N con el dominio III. E) Conotoxina N con el dominio IV.

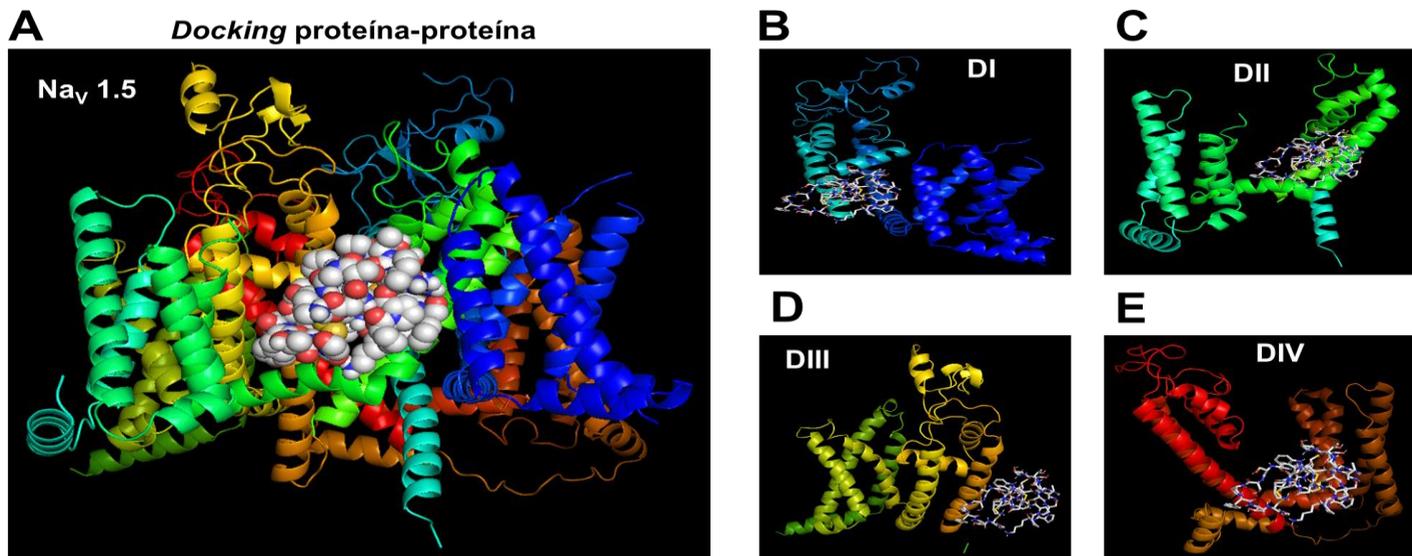


Figura 35. A) Modelo de acoplamiento molecular entre la conotoxina N 3975 y el canal Nav 1.5 B) Conotoxina N con el dominio I. C) Conotoxina N con el dominio II. D) Conotoxina N con el dominio III. E) Conotoxina N con el dominio IV.

10. DISCUSIÓN

10.1 Hipótesis sobre el área de influencia de los individuos colectados de la especie *C. fergusonii*

Tomando en cuenta los puntos de muestreo donde fueron colectados los individuos de las poblaciones de la especie *C. fergusonii* y aunado al hecho de que son organismos con escasa motilidad, ya que no logran trasladarse más de veinte metros en un año^{95 96}; se generó un mapa para ubicar la zona de influencia de la especie (Figura 36, Mapa 1). Esto, con el fin de visualizar el solapamiento de las diferentes localidades y establecer si existe flujo génico entre las poblaciones de *C. fergusonii*. Dicha zona de influencia se obtuvo a partir de investigar la velocidad promedio de las corrientes de California y el Golfo de California; donde encontró una variación de entre 10 y 40 cm/s⁻¹ respectivamente^{97 98 99}.

Cabe mencionar, que únicamente se tomaron las velocidades de corrientes geostroficadas y la velocidad de entrada y salida en el Golfo de California. Por lo tanto, no se analizaron las velocidades de marea, ni el efecto de otros fenómenos que pueden modificar las velocidades como los cambios abruptos de temperatura, surgencias y estaciones del año. Entonces, como una primera aproximación para este tipo de trabajos y dado que no existen reportes previos que indiquen la velocidad de nado promedio de larvas de *C. fergusonii* en el Golfo de California, se decidió tomar el valor de 30 cm/s⁻¹ como velocidad de la corriente horizontal, ya que es el promedio de los valores que se han reportado anteriormente.

Una característica notable de los caracoles marinos del género *Conus*, es que pueden tener un desarrollo directo, donde las fases juveniles pasan un mínimo o ningún tiempo en la columna de agua. Por lo tanto, una vez que han dejado el huevo, se arrastran lejos de él, para incorporarse con la comunidad bentónica⁹⁵. En el caso de los *Conus* que poseen un desarrollo indirecto, este se realiza por medio de una larva trocófora que pasa un máximo de veinte días en el *plancton* que es arrastrado por la corriente de agua. De esta manera la larva inicia el proceso de metamorfosis que traerá consigo la fase juvenil conocida como velígera (*veliger* por su traducción en inglés), la cual se alimentará constantemente en el *plankton*, hasta que llegue a la fase adulta y, tras perder su capacidad para nadar podrá asentarse en el fondo oceánico.^{43 100}

En el caso particular de *C. fergusonii*, al ser un neogasterópodo, se caracteriza por ser gonocórico (unisexual) y el embrión se desarrolla por medio de las larvas planctónicas trocófora y velígera^{41 101 102}. Entonces, considerando que una de estas larvas pasaría veinte días como máximo transportándose y alimentándose del plancton sobre la columna de agua, y aunado a que lo

haría con velocidad promedio de 30 cm/s^{-1} , podríamos inferir una distancia media recorrida de 518.4 km a la redonda. Lo que se propone es una zona de influencia de más de 500 km de diámetro en torno a cualquier dirección del punto de muestreo de los diferentes individuos de la especie *C. fergusoni* que se muestrearon en el Golfo de California y Golfo de Ulloa.



Figura 36. Mapa 1. Área de influencia de las poblaciones de *C. fergusoni* colectadas en el Golfo de California. Datos no publicados. Se estimó una zona de influencia promedio de 500 km alrededor de cualquier punto de colecta. Este mapa se generó con el software ArcGIS10.3

En cuanto a la distribución biogeográfica de *C. fergusoni*, podemos mencionar que son organismos con una baja motilidad durante su fase adulta como para recorrer más de veinte metros. El movimiento de las larvas a través de la columna de agua nos permite inferir que existe intercambio de material genético entre las poblaciones que fueron colectadas en las cinco localidades de muestreo. Sin embargo, este flujo génico sería mínimo debido al hecho de que las larvas solamente permanecen un máximo de 20 días en el zooplancton. Por lo tanto, es posible que las diferencias cualitativas presentadas en los perfiles cromatográficos (número y concentración de componentes) se deban a la distancia entre localidades y por supuesto a factores ecológicos relacionados con los caracoles *Conus*: competencia, depredación, alimentación, condiciones ambientales, etc.

En este trabajo se plantea hablar de subespecies o diferentes poblaciones de la misma especie por el aislamiento geográfico entre ellas; pero se requieren más estudios sobre genética de poblaciones para confirmar esto. Incluso, podría decirse que también se presentaron algunos datos cuantitativos sobre la espectrometría de masas, de aquellos componentes que consideramos comunes para todos los individuos *C. fergusonii*. De esta manera, tenemos pesos moleculares que no son idénticos, pero que sus diferencias están dadas por el peso en *Daltons* de un aminoácido, o la diferencia de masa que se da por una modificación postraduccional.

Aunque el simple peso molecular de las señales mayoritarias que se analizaron en el minuto 50 del tiempo de elución no es sustancial para inferir la naturaleza de los péptidos con los que tratamos, ya sea en términos de secuencia de aminoácidos y diferencias determinadas por modificaciones postraduccionales, sí nos mostró que en cuatro de las cinco poblaciones de *C. fergusonii* hay un componente en común. Si bien, no se trata de la misma conotoxina con una secuencia idéntica, al menos podría tratarse de una misma familia de conotoxinas. De esta forma, podríamos hablar de la síntesis de una familia de conotoxinas que es crucial para la supervivencia del caracol; ya sea en términos de defensa o para cazar presas potenciales. Aunque por el tamaño de *C. fergusonii* y por la aparente capacidad de bloquear canales N_{av} , es muy probable que no solamente sea vermívoro; sino que también se comporte como piscívoro. Esta suposición coincide con la teoría que propone a este grupo como descendiente evolutivo de los *Conus* que se alimentaban de gusanos ¹⁰³. Por lo tanto, es evidente que a pesar de la variabilidad, dicho componente en común se repite en cada cromatograma observado, incluso en las hembras.

10.2 Determinación de la superfamilia de dos conotoxinas aisladas de *C. fergusonii*

Como ya se observó, una de las conotoxinas descrita en la Tabla 6 corresponde a una de las dos secuencias de conotoxinas N contenidas en el transcrito. Sin embargo, también se podría tratar de una superfamilia divergente, ya que los alineamientos de secuencias realizados en *ConoServer* mostraron un porcentaje de 94.4% para ambas superfamilias. Cabe mencionar que dicha conotoxina tiene un peso molecular calculado de 4738.45 m/z y coincide con el peso molecular mostrado en el espectro de masas de la figura 19. Además, *ConoServer precursor analysis* predice el patrón de cisteínas XI para los 4 puentes disulfuro que se enlazan con el siguiente orden I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII ¹⁰⁴.

La otra secuencia del transcrito y clasificada como conotoxina N tiene un peso molecular de 4914.43. Esto de acuerdo a *ConoServer precursor analysis* y *IonSource*. Este peso parece corresponder con el de otra señal mayoritaria contenida en el perfil cromatográfico de un macho *C. fergusonii* de la localidad de Piaxtla (4948.376 m/z). Tal aseveración se hace tomando en cuenta los alineamientos de secuencias (Tabla 7) y que el péptido maduro sufra de modificaciones postraduccionales. El servidor ConoServer propone que la secuencia de la conotoxina 2334 puede estar sujeta a una γ carboxilación de los residuos de ácido aspártico y/o ácido glutámico (44.009 m/z). Sin embargo, con esta modificación, el péptido obtiene una masa molecular de 4957.98. Por lo tanto, no es una relación de masa exacta y estos resultados deberían ser comparados en el futuro, cuando se obtenga la secuencia experimental del conopéptido. También, se propone un patrón de cisteínas XIX para los 5 puentes de cisteínas; pero aún no se ha encontrado evidencia de cómo se enlazan ¹⁰⁵.

10.3 Relaciones filogenéticas de las conotoxinas N y/o divergentes aisladas de *C. fergusonii*

A partir del alineamiento de secuencias también fue posible establecer relaciones filogenéticas bien demarcadas entre *C. fergusonii* y otras especies del género *Conus*. A pesar de que solamente se trata de dos caracteres, los alineamientos nos permiten especular sobre el origen evolutivo de las conotoxinas de la superfamilia N y/o divergente (MSTLGMTLL-) a nivel de secuencia señal y propéptido. Incluso, cuando la conotoxina madura es altamente variable y mutable, fue posible relacionar todas las regiones del conopéptido 3975 con 9 especies de caracoles *Conus*. Esto, dependiendo de si se utiliza toda la secuencia del transcriptoma o sólo la región correspondiente a la estructura proteica. Para el caso de la conotoxina con el número de entrada 2334, se encontraron relaciones evolutivas con 11 especies de *Conus*.

Se recuerda que los primeros alineamientos obtenidos con *UniProt* sólo muestran los primeros 25 resultados, ya que el objetivo solamente era identificar y definir las relaciones evolutivas del propéptido, péptido señal y péptido maduro. Sin embargo, los resultados de los alineamientos se utilizaron nuevamente para exportar al software *Jalview* con el propósito de obtener árboles filogenéticos de distancia media a través del porcentaje de identidad ¹⁰⁶. Para tal efecto, los alineamientos que arrojó el servidor de *UniProt* se agruparon por medio del porcentaje de identidad. Además, sólo se tomó en cuenta una conotoxina representativa de cada especie para que nuestro árbol filogenético no mostrara dos veces el mismo nombre (Figuras 37 y 38). Cabe mencionar que el *BLAST* y alineamiento de secuencias se ejecutó con los mismos parámetros: *Clustal-Omega* con el algoritmo *HHalign* de la plataforma *UniProt*; usando únicamente la base de datos *UniProtKB* y generando una matriz automática pam30 con un E-threshold de 1. Se permitió la incorporación de gaps y un número de "hits" máximo de 50 resultados.

Para el caso de la conotoxina 3975 de *C. fergusonii*, Jalview arrojó un “match” con 14 especies del género *Conus*, ya que en esta ocasión se tomaron en cuenta todas las especies que tenían un porcentaje de identidad mayor al 30% durante el BLAST. De esta forma, se puede visualizar una mínima relación evolutiva entre este género de caracoles marinos. Es por eso, que se puede observar un bajo porcentaje de identidad coloreado en azul en forma de gradiente (Figuras 38 y 39); sobre todo porque el alineamiento considera la región del péptido maduro que es altamente variable. De hecho, si se analiza la secuencia señal, encontraremos una similitud de hasta 94.4% con toxinas de la superfamilia N y con una familia divergente recientemente encontrada. Además, se puede apreciar que existe una longitud diferente en la mayoría de las secuencias, lo cual también puede influir sobre la calidad del alineamiento. Sin embargo, la mayoría de estos péptidos comparten la característica de poseer 8 residuos de cisteínas y cuatro puentes disulfuro. Por lo tanto, se esperaría que compartieran blancos moleculares.

Es importante mencionar que las relaciones filogenéticas se dieron con genes que no necesariamente codifican una conotoxina de la superfamilia N y/o divergente (MSTLGMTLL-), ya que las diferencias entre familias (a nivel genético) se presentan de manera muy sutil por simples cambios en uno o más residuos a lo largo de la secuencia (sobre todo en la región del péptido señal). Sin embargo, los árboles de distancia media se construyeron como si se tratara de un solo carácter o conotoxina con efecto agonista o antagonista sobre canales iónicos, ya que varias de las secuencias del alineamiento se referenciaban como proteínas con actividad sobre canales Na_v y K_v .

La filogenia de la figura 38 mostró que *C. fergusonii* tenía una relación evolutiva más cercana con *C. magus*, *C. ermineus* y *C. andremenezi*, quienes también presentan conotoxinas de 8 residuos de cisteínas como es el caso de la superfamilia V y patrón de cisteínas XV en la especie *C. ermineus*. Además, en esta última especie ya se ha reportado la presencia de δ conotoxinas y por lo tanto, deberíamos esperar que el veneno de *C. fergusonii* también actué sobre canales Na_v ¹⁰⁷. No obstante, el árbol en conjunto nos muestra a la especie *C. planorbis* como la más alejada respecto a esta relación evolutiva.

Con respecto a la filogenia de la figura 40 de la conotoxina 2334 hay diferencia de lo mostrado con la conotoxina 3975. En esta ocasión parece haber un mayor número de aminoácidos conservados en la región perteneciente al péptido maduro; sobre todo en los residuos de cisteínas. Esto, a pesar de que la conotoxina N 2334 parece contener 5 puentes disulfuro y el patrón de cisteínas XIX de acuerdo a *ConoPrec precursor analysis*. Nuevamente, la mayor relación evolutiva se da con especies que incluyen peces en su dieta y que también se distribuyen en el Océano Indo-Pacífico. Este es el caso de *C. tribblei* y *C. distans*, mientras que la especie más alejada en relación a este gen es *C. californicus* (Figura 40).

En la actualidad se encuentra a discusión el término de árbol filogenético para los métodos basados en distancia. Es importante resaltar que las matrices de distancia y divergencia entre secuencias nos hablan específicamente de una red filogenética. Sin embargo, para fines prácticos, en este trabajo sí utilizamos el concepto árbol filogenético porque se asume que hay tasas de cambio constante en cada una de las secuencias. En particular, en la región hipervariable del péptido maduro. Incluso, se parte de la idea que no existe homoplasia ¹⁰⁸ Aunque es muy difícil saber si los genes que codifican conotoxinas se adquirieron por especiación o por eventos independientes.

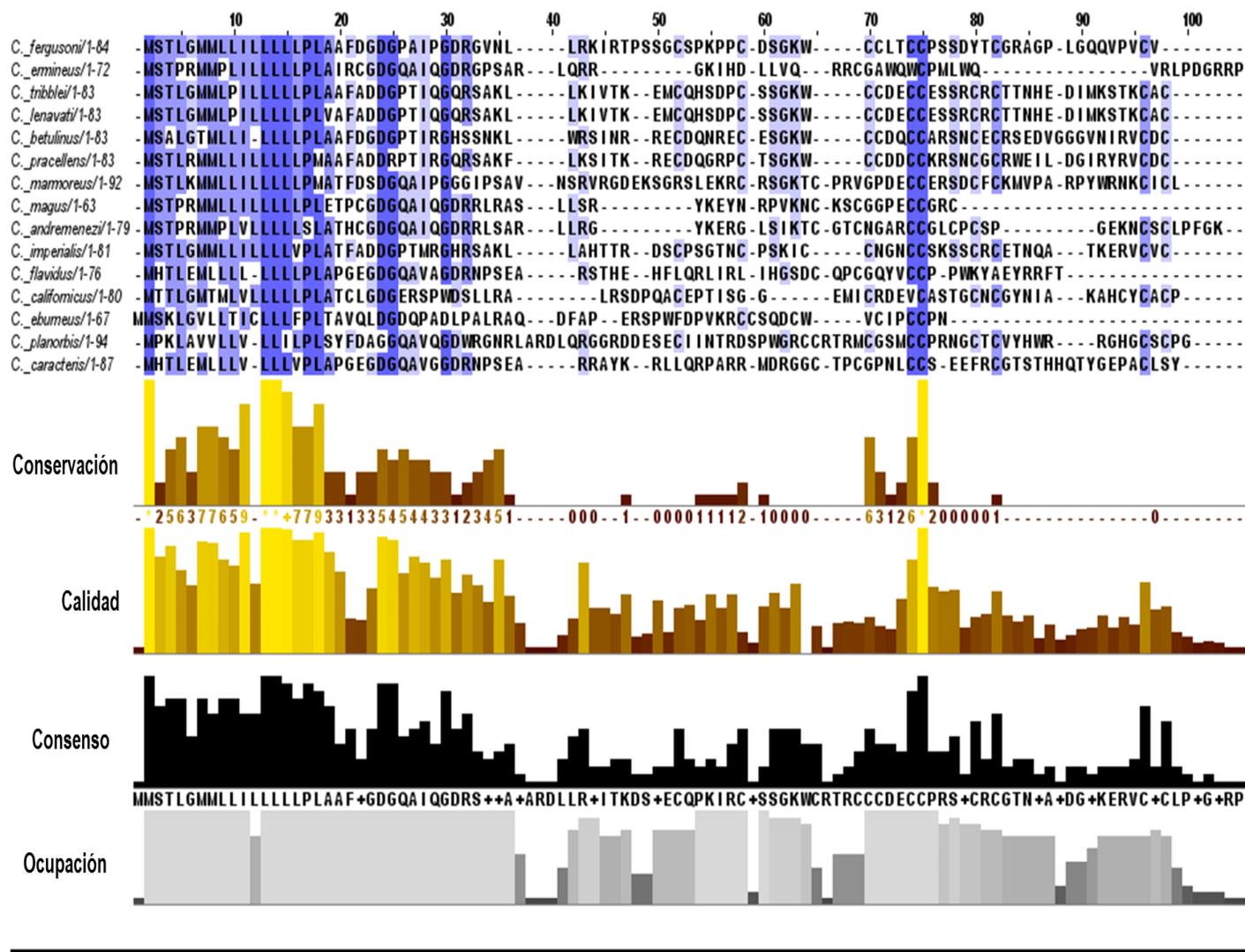


Figura 37. Alineamiento de secuencias en Jalview entre la conotoxina N 3975 de *C. fergusonii* y otras 14 especies del género *Conus*. El alineamiento se realizó tomando en cuenta un porcentaje mínimo de 30% de identidad. Como podemos observar, este carácter es altamente variable en la región del péptido maduro, con respecto al porcentaje de identidad (color azul) específicamente por la conservación de la posición de residuos de cisteínas y el patrón de puentes disulfuro. Sin embargo, los parámetros de conservación, calidad, consenso y ocupación, son más homogéneos en la región de la secuencia señal y en algunas zonas del propéptido.

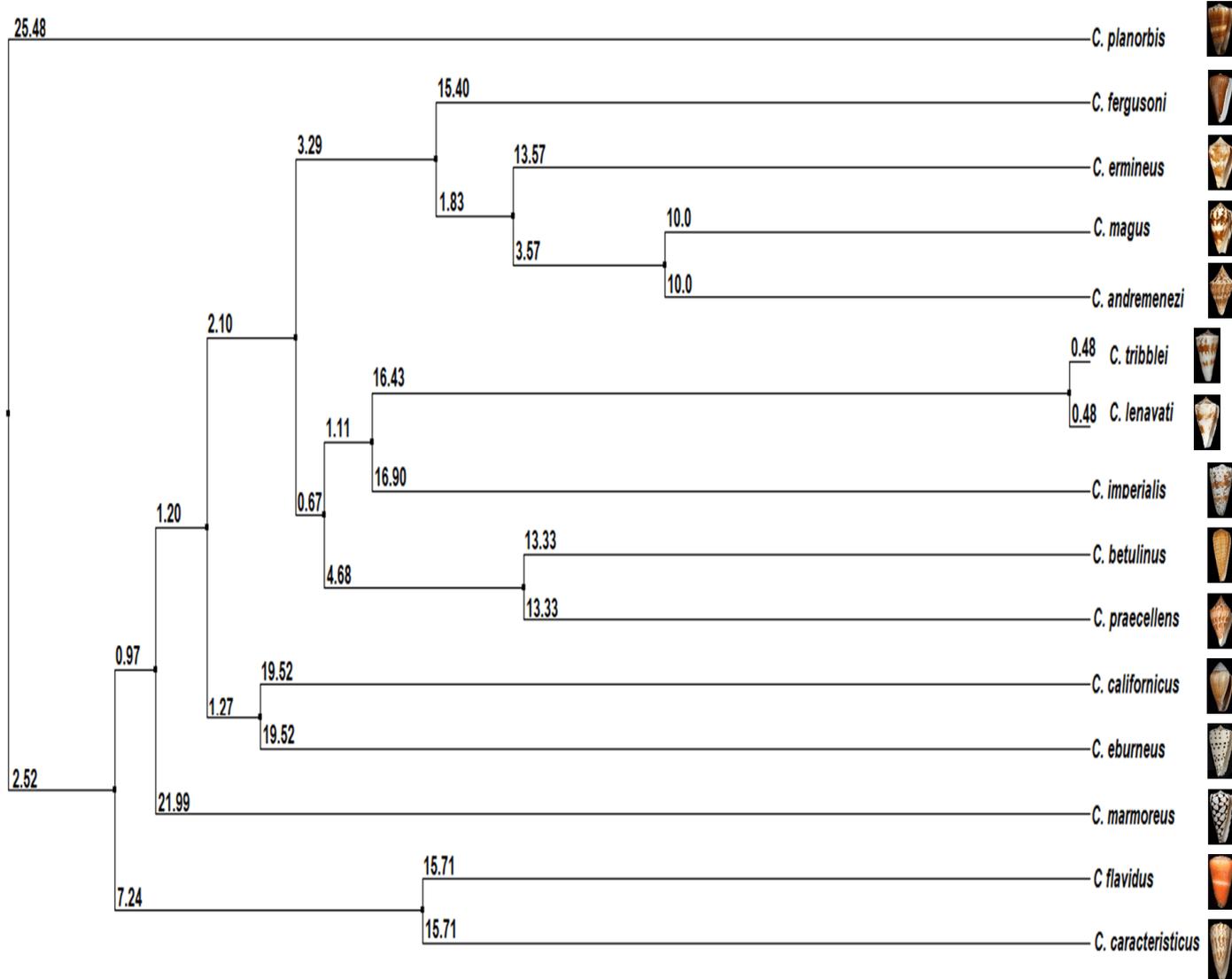


Figura 38. Árbol filogenético que evalúa las relaciones evolutivas del carácter conotoxina N, con base en la secuencia con el número de entrada 3975 del transcriptoma de *C. fergusonii*. Esta filogenia se construyó utilizando la distancia media entre las secuencias y evaluando el porcentaje de identidad de cada una de ellas. En este caso, el alineamiento del carácter (conotoxina N 3975) encontró que *C. fergusonii* tenía relación con 14 especies de caracoles del género *Conus*. La relación evolutiva más estrecha de *C. fergusonii*, la encontramos con *C. magus*, *C. ermineus* y *C. andremenezi*, quienes podrían haber adquirido este gen posteriormente. Sin embargo, la filogenia en conjunto, nos habla de un grupo que muestra un ancestro en común relacionado con *C. planorbis*. Los números en cada rama indican el resultado de la función logarítmica que emplea la distancia entre las secuencias, con base en el número de residuos que no comparten entre sí.

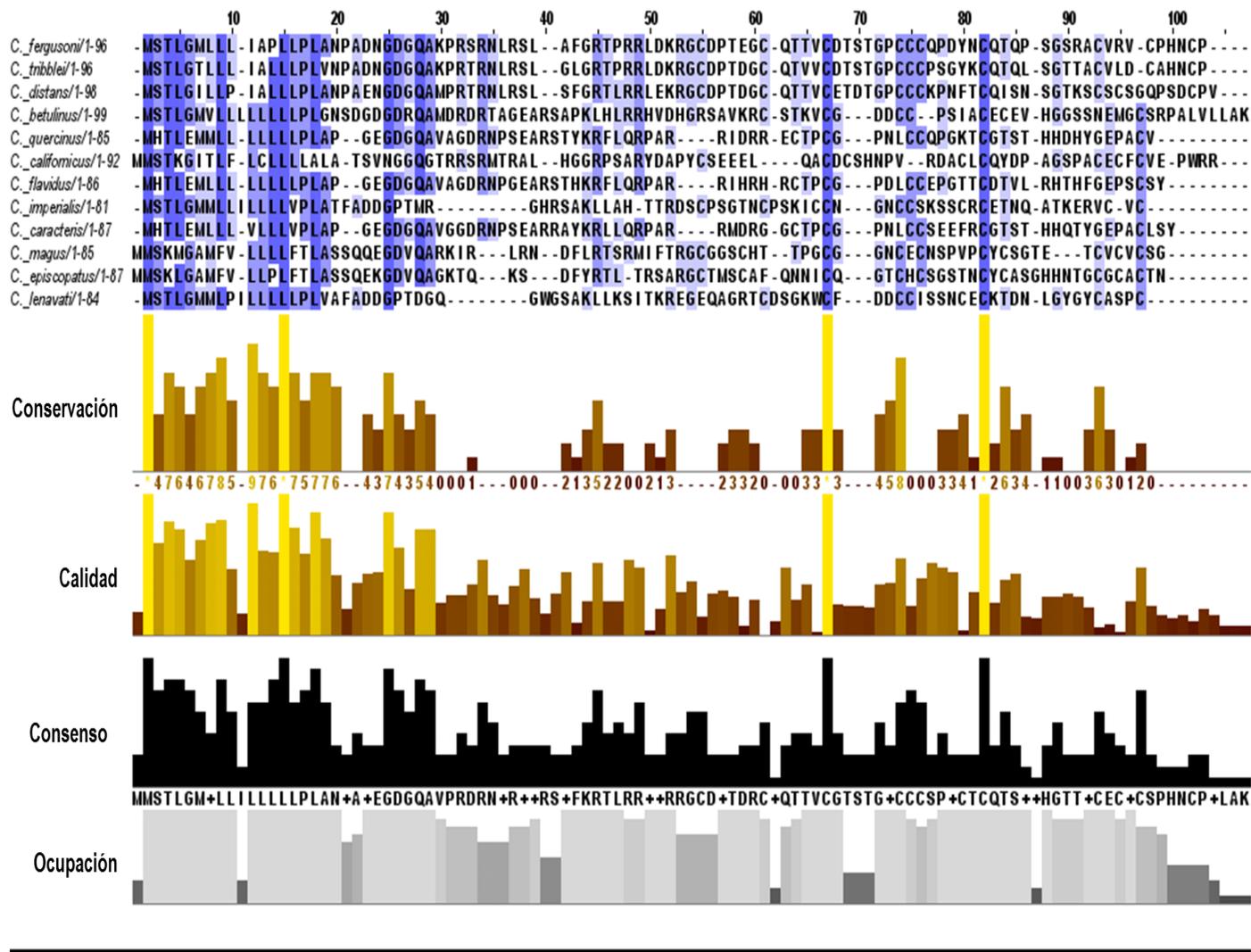


Figura 39. Alineamiento de secuencias de la conotoxina N 2334 de *C. fergusonii*. Al igual que en la Figura 37, se muestra el alineamiento de secuencias del carácter de otra conotoxina N con el número de entrada 2334 en el transcriptoma de *C. fergusonii*. Como puede observarse, para este gen, se encontró relación con 11 especies del género *Conus*. Existe un mayor gradiente de conservación en las regiones que pertenecen al péptido señal y propéptido, ya que tienen una tasa de mutación muy baja. Además, en la región de la toxina madura, suele conservarse un mayor número de cisteínas.

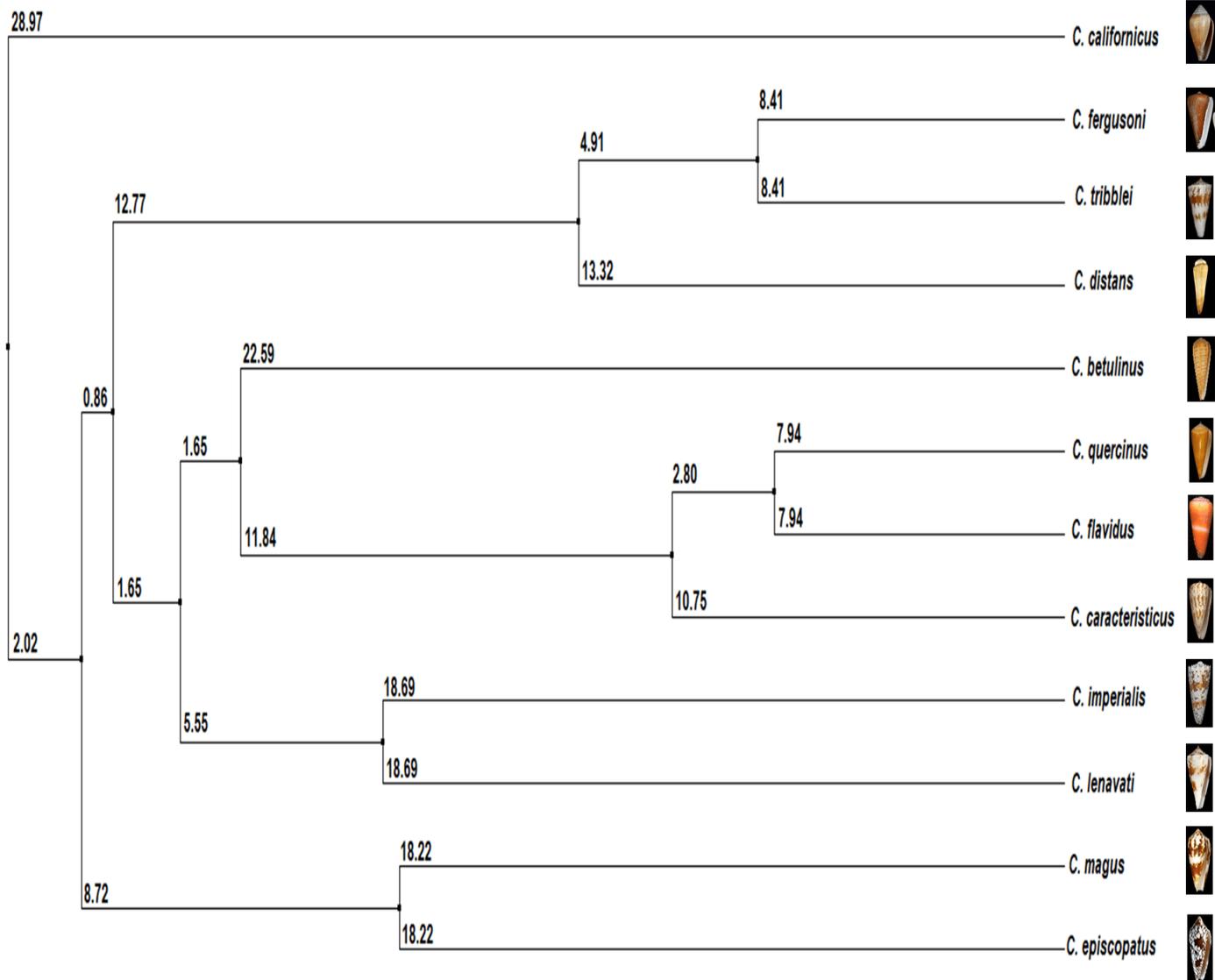


Figura 40. Árbol filogenético de distancia media construido con base en el porcentaje de identidad de las secuencias. Este carácter (conotoxina N 2334) también parece provenir de un grupo monofilético. Aunque en este caso, la especie *C. californicus* parece estar más relacionada con el ancestro en común de todo el grupo. Esto, probablemente porque los resultados del alineamiento de secuencias sólo arrojaron 11 especies diferentes. De ahí, se desprenden tres grupos de descendientes, y en el caso de nuestra especie de interés, *C. fergusonii*, parece estar más emparentada con *C. tribblei* y *C. distans*. Los números en cada rama indican el resultado de la función logarítmica que emplea la distancia entre las secuencias, con base en el número de residuos que no comparten entre sí.

10.4 Evaluación de los modelos tridimensionales de las conotoxinas 3975 y 2334

Los parámetros establecidos para evaluar los modelos tridimensionales de proteínas obtenidos por homología mostraron ser confiables debido a que los valores se encontraban dentro de un rango de referencia esperado. En primer lugar, el alineamiento de secuencias presentó un porcentaje de similitud superior al 30% para ambas secuencias (conotoxinas N y/o divergentes 3975 y 2334). El parámetro de estimación global de la calidad del modelo (*GMQE*) tuvo un resultado de 0.25 y 0.22 respectivamente. Esto, principalmente por la cobertura del modelo que fue de 75% para la conotoxina 3975 y de 53% para la conotoxina 2334. Sin embargo, gracias a los demás parámetros, todavía podemos hablar de un modelo con cierto grado de confiabilidad.

El análisis de energía del modelo cualitativo (*QMEAN*) presentó valores aceptables por encima de -4 (-2.63 y 0.90 respectivamente). De esta manera, las interacciones energéticas de los C β , en función de la geometría de los enlaces, tienen una conformación aceptable dentro del péptido. Lo mismo ocurre con la energía derivada de la distancia que existe entre los átomos y con las interacciones generadas por el colapso hidrofóbico de la proteína (solvatación), que mostraron valores cercanos a cero. Por lo tanto, el estado energético de ambas proteínas es significativamente bajo y esto favorece que los aminoácidos que las conforman puedan plegarse de esta manera en la naturaleza.

La generación de estos modelos obtenidos por homología para conotoxinas aisladas de *C. fergusonii* solamente es un primer acercamiento para identificar las conformaciones que estas pueden adquirir en el espacio y por consiguiente cómo puede darse la interacción con sus blancos moleculares. Y, aunque no es un modelo perfecto con respecto a valores de gráfico de Ramachandran y otros resultados de *MolProbability* (ver apéndice, Tablas 11 y 12), se decidió utilizar este modelo para realizar “docking” molecular con canales de Nav.

Al carecer de información estructural y en caso de no contar con estructuras resueltas por difracción de rayos X o NMR, se utilizan métodos de segunda o tercera generación como el modelado por homología y por redes neuronales ¹⁰⁹. Empero, también es posible el uso de otras técnicas *de novo* con métodos *ab initio* ¹¹⁰ que prácticamente realizan alineamientos múltiples para ir resolviendo la estructura terciaria y secundaria por fragmentos a partir de una tendencia estadística que disponga el acomodo de cada aminoácido sobre conotoxinas dentro una alfa hélice, hojas beta, o giros beta. Para tal efecto, se recomiendan los métodos de *Osguthorpe, Robson, Garnier* ¹¹¹ y *Chou-Fasman* ^{112 113}. Desafortunadamente, aún no se ha logrado refinar su

aplicación en la predicción de estructuras proteicas superiores a 150 residuos; además de tener un gran costo computacional y falta de parámetros para evaluar la confiabilidad del modelo. Por otra parte tienen la ventaja de no necesitar información estructural previa. Aunado a los algoritmos de mecánica molecular antes mencionados, estos métodos trabajan en sinergia con dinámica molecular ¹¹⁴, simulaciones Monte Carlo ¹¹⁵ y bases de datos donde se deposita información sobre estructuras secundarias elementales ^{116 117}.

10.5 Análisis del acoplamiento molecular entre la conotoxina N 3975 de *C. fergusoni* y los canales Nav1.4 y Nav1.5

El análisis de los posibles sitios de unión de la conotoxina N 3975 en los canales Nav1.4 y Nav1.5 que se obtuvieron con el servidor *ClusPro 2.0*, se visualizaron mediante *Pymol*. Se identificaron los 4 dominios de cada canal, el dominio del poro, el sensor de voltaje y aquellas regiones que por lo general se encontraban en promedio, a menos de 10 angstroms con respecto al ligando que en este caso fue la conotoxina 3975. Este tipo de análisis sirve para la búsqueda de posibles sitios de unión a fármacos y toxinas. También para identificar residuos de gran importancia para la estructura-función de los canales.

En el caso particular del canal Nav1.4 (Figura 41), podríamos inferir con base en el modelo preliminar que la conotoxina 3975 no actúa como una bloqueadora de poro, pero si interactúa cerca de este dominio; particularmente con los segmentos S5 de los dominios I, II y IV y con los segmentos S6 del dominio IV. Incluso, parece haber interacción con los residuos correspondientes a los segmentos S4+ del dominio II y IV. Cabe mencionar, que estos últimos corresponden al sensor del voltaje del canal. Por lo tanto, al momento de proponer algunos sitios de unión deberían tomarse en cuenta las argininas y/o lisinas que se encuentran en esta alfa-hélice; así como las asparaginas que se encuentran cerca de esta región del canal. El precepto anterior, parte de haber utilizado los modelos de “*docking*” que *ClusPro 2.0* arrojó para los coeficientes de balance que dan mayor importancia a interacciones electrostáticas. De hecho, ya se han reportado que algunos antagonistas secuestran el sensor de voltaje de canales Nav⁵⁶.

Específicamente, se proponen a las argininas del sensor de voltaje del dominio III en las posiciones 1135, 1138 y 1142; así como a las argininas del sensor de voltaje del dominio IV, en las posiciones 1451, 1454, 1460 y 1463 (Figura 42). Aunque, es probable que existan otras interacciones físico-químicas con otro tipo de residuos y para tal efecto, se utilizarían otros modelos y otros coeficientes. De hecho, en el dominio del poro de los segmentos S5 y S6, si se analiza la secuencia, también es posible apreciar otros residuos polares como serina, treonina y glutamina; los cuales podrían ejercer algún efecto energético sobre otros aminoácidos polares que constituyen a la conotoxina N 3975.

Se recuerda que el modelo del canal $Na_v1.4$ de humano obtenido por criomicroscopía electrónica de transmisión, se presentó como una interface entre el estado activado e inactivado. Por lo tanto, se tendría que ser cuidadoso sobre la especulación de los posibles sitios de unión, o sitios de interacción entre la conotoxina N y los canales de sodio activados por voltaje, ya que la transición de los tres estados del canal (activado, inactivado y cerrado) involucra cambios conformacionales que pueden coadyuvar o dificultar la interacción y acoplamiento entre el receptor y su ligando ¹¹⁸.

Para el caso del canal $Na_v1.5$ (Figura 43), se observó una interacción similar con la conotoxina 3975. Sin embargo, se recuerda que este canal no es sensible a TTX, a diferencia del canal $Na_v1.4$. Además, el $Na_v1.5$ que también fue obtenido por criomicroscopía electrónica de transmisión y se presentó con los sensores de voltaje parcialmente activados y la compuerta de inactivación parcialmente cerrada. Por lo tanto, la interacción entre el canal y la conotoxina N se dio a los alrededores del vestíbulo del canal y dominio del poro.

De manera general, se observó una interacción con los cuatros dominios; específicamente con los segmentos S5 y S6 de los dominios II y III. Evidentemente, a lo largo de las alfa hélices de cada dominio hay otros residuos que también pueden interactuar con la conotoxina 3975. Este es el caso de ácido glutámico (E) y asparagina (N) que también pueden afectar con interacciones electrostáticas a las lisinas y argininas que conforman la conotoxina. Aunque, de igual forma que con el canal $Na_v1.4$, se propusieron únicamente como sitios de unión, aquellos residuos del canal cargados positivamente. Por lo tanto, se sugiere a las argininas del sensor de voltaje del dominio I en la posición 219, 221, 224, 809; así como la lisina de la posición 227. En cuanto al sensor de voltaje del dominio II se proponen a las argininas de las posiciones 219, 221 y 224; así como la lisina de la posición 227 (Figura 44).

10.6 Sitios de unión propuestos para la conotoxina N 3975 en el canal Na_v 1.4

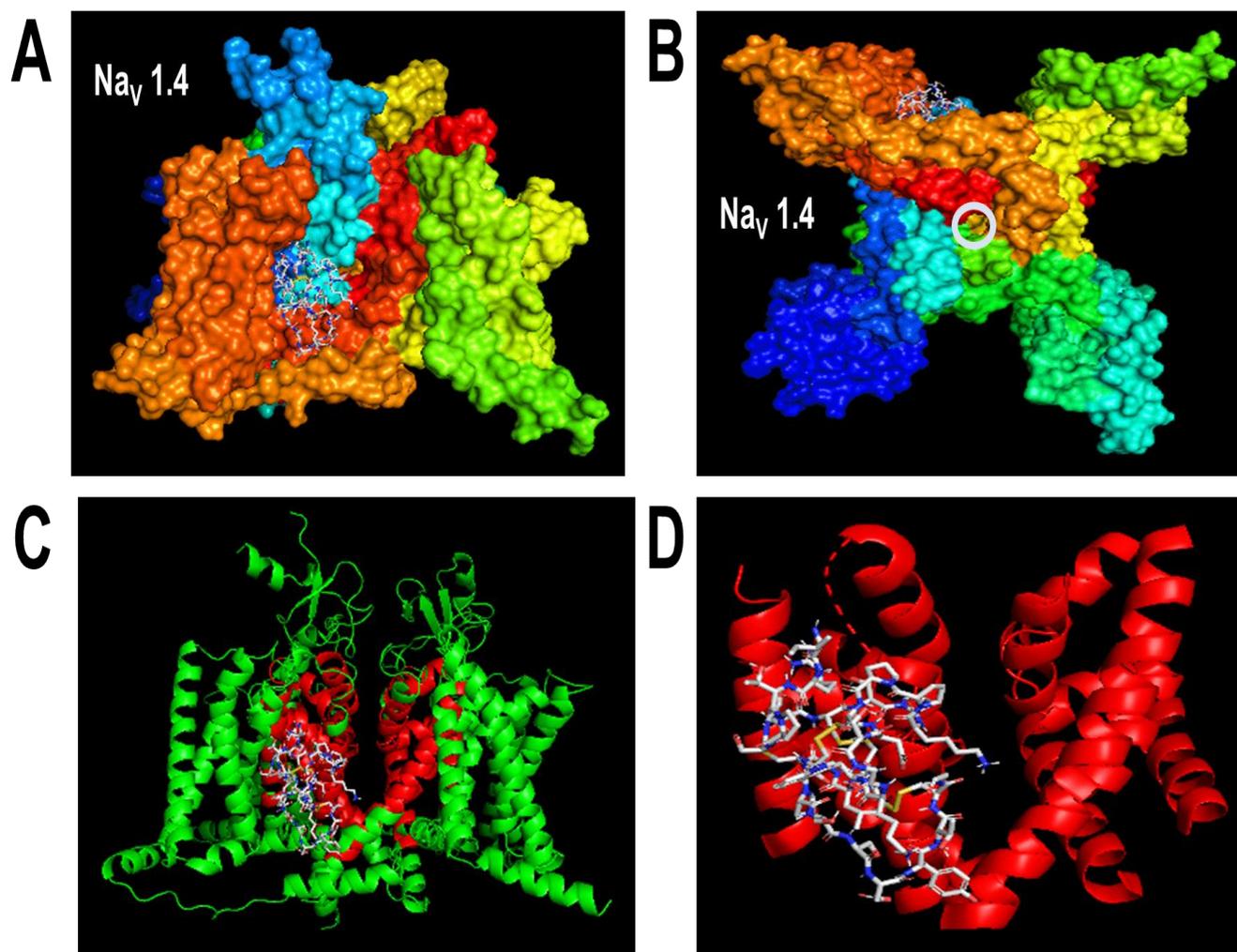


Figura 41. Modelo de “docking” molecular entre el modelo tridimensional de la conotoxina N 3975 de *C. fergusonii* y el canal Na_v 1.4. Panel A) Vista lateral del canal completo en modo de superficie y conotoxina representada en forma de barras. Las cadenas alfa de toda la proteína están coloreadas a manera de arcoíris. Panel B) Vista superior del canal completo interactuando con la conotoxina N. De esta forma, se puede apreciar el centro del canal y por lo tanto el poro de conducción de iones que se encuentra señalado con un círculo de color gris. Panel C) Se puede apreciar el dominio del poro del canal coloreado en rojo; mientras que el resto de la estructura del canal está en color verde. Además, también se puede apreciar a la conotoxina N interactuando a los alrededores del dominio del poro del canal. Panel D) Solamente se observa el dominio del poro. Particularmente, los segmentos S5 y S6 de los dominios I y IV parecen estar más cerca de la conotoxina N y por lo tanto, establecen mayores zonas de contacto entre las dos proteínas.

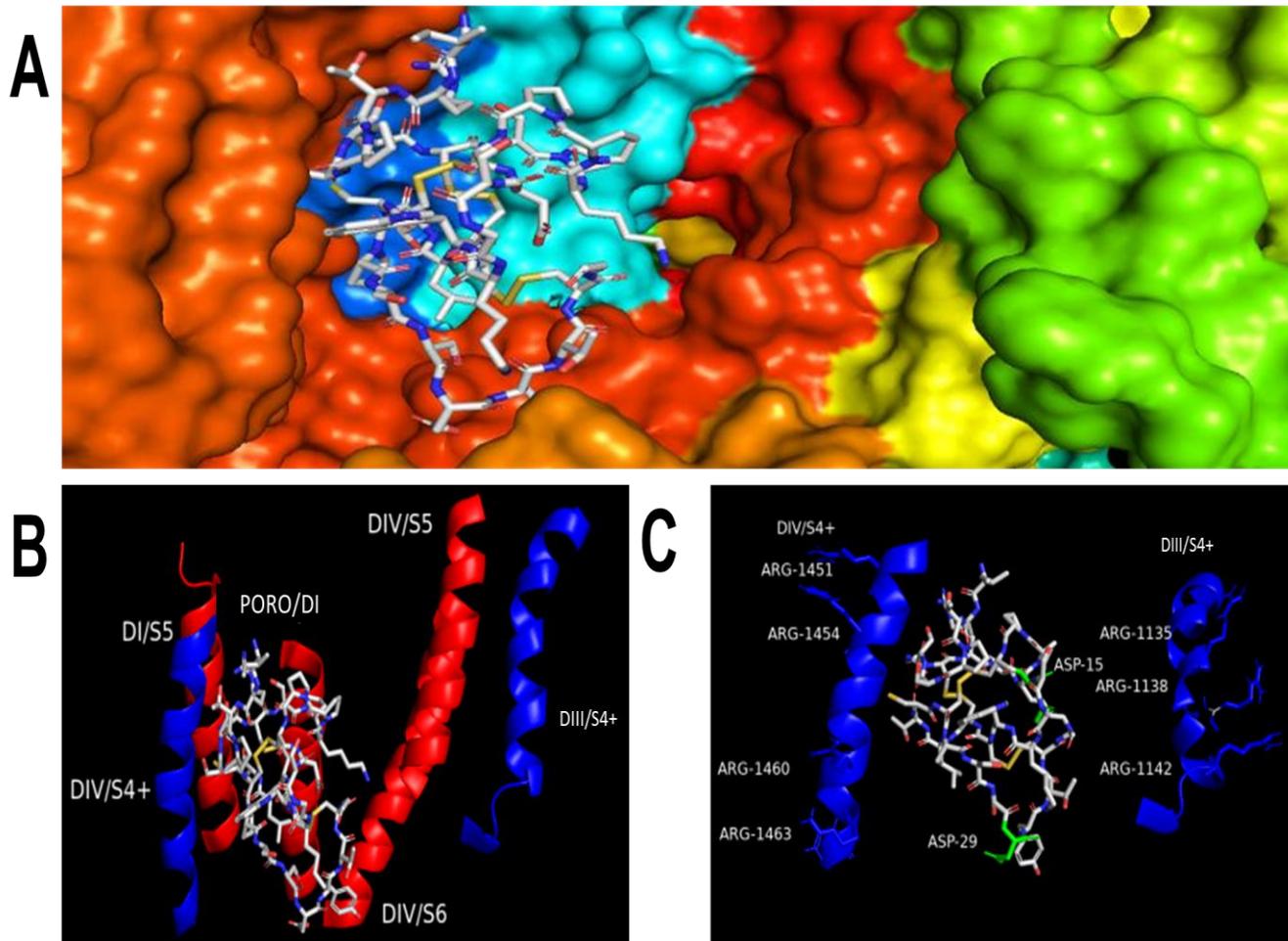


Figura 42. Probables de sitios de unión para interacciones electrostáticas entre el canal $\text{Na}_v 1.4$ y la conotoxina 3975. En el panel A, se realizó un profundo acercamiento a los sitios de contacto entre el canal $\text{Na}_v 1.4$ visualizado en modo de superficie y el modelo tridimensional de la conotoxina 3975 de la especie *C. fergusonii*. Este tipo de visualización mejora la perspectiva de la estructura secundaria de la conotoxina representada en modo de barras, así como el plegamiento de tres de los cuatro puentes disulfuro que contiene el péptido. En el panel B, solamente se observa con un mayor acercamiento a los segmentos transmembranales del canal que se encuentran más cercanos a la conotoxina N y por lo tanto, establecen mayores puntos de contacto. No solamente se muestran los segmentos del dominio del poro (S5 del dominio I, S5 S6 del dominio IV y segmento del DI que forma el poro de conducción); sino los sensores de voltaje del canal; particularmente los de los dominios III y IV. En el panel C), se observan todos los residuos de arginina (ARG) que se encuentran en la alfa hélice de los sensores de voltaje de los dominios III y IV y que están representados en forma de barras. Dentro de un modelo de “docking” molecular con coeficientes de balance, estos residuos son potenciales sitios de unión para establecer interacciones electrostáticas con la asparagina (ASN) 15 y 29 de la conotoxina N; las cuales también se muestran en forma de barras en color verde fluorescente.

10.7 Sitios de unión propuestos para la conotoxina N 3975 en el canal Na_v 1.5

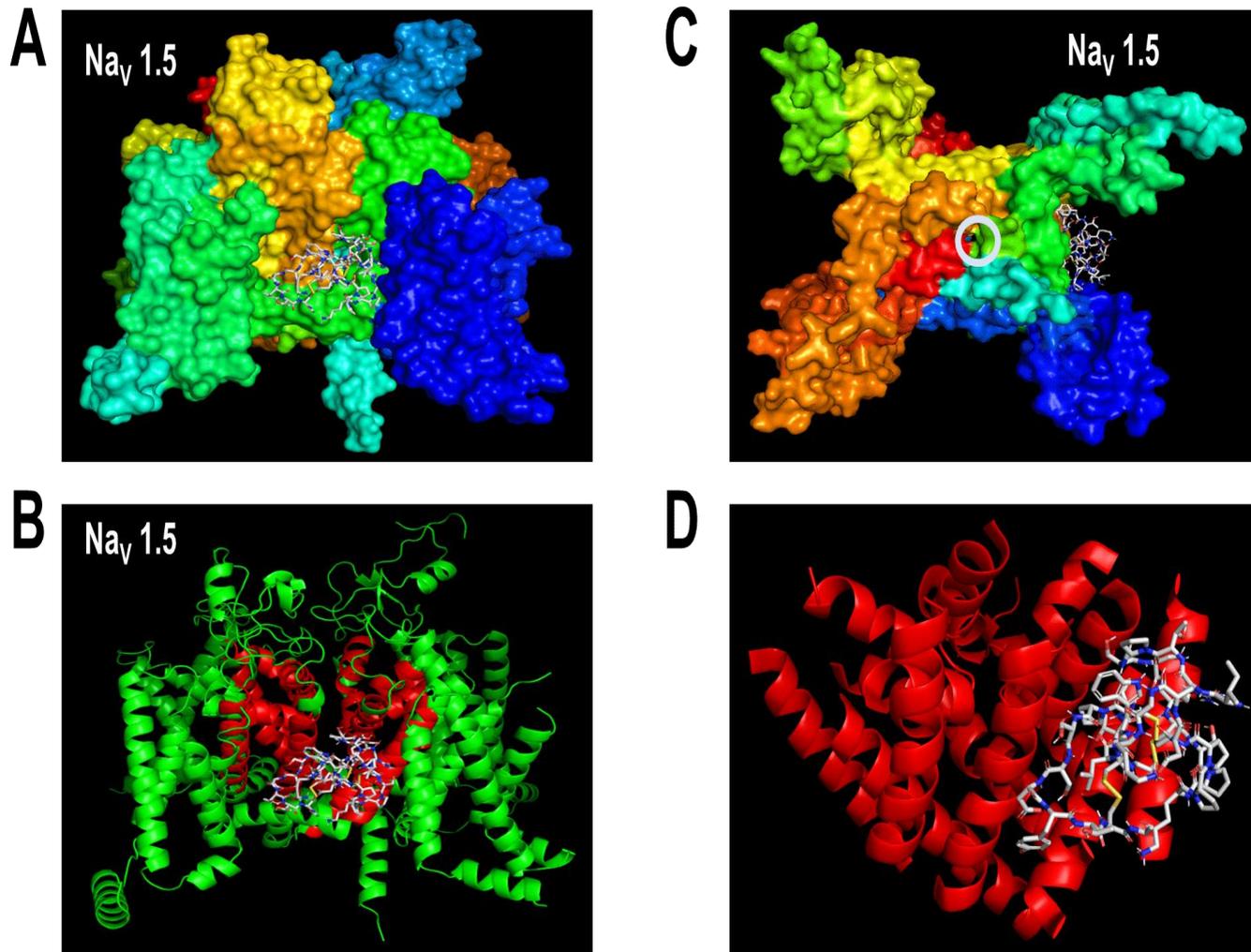


Figura 43. Modelo de “docking” molecular entre el modelo tridimensional de la conotoxina N 3975 de *C. fergusonii* y el canal Na_v 1.5. Panel A) Vista lateral del canal Na_v 1.5 visualizado en *Pymol* en modo de superficie, junto con la conotoxina N representada en forma de barras. De igual forma que en la Figura 41, las cadenas alfa de todo el canal se encuentran coloreadas a manera de arcoíris. Panel B) Vista superior del canal completo interactuando con la conotoxina N. Al observar la señalización del poro de conducción con un círculo gris, nos damos cuenta que la conotoxina N no actúa como un bloqueador de poro. Panel C) Se puede apreciar el dominio del poro del canal coloreado en rojo, mientras que el resto de la estructura del canal (segmentos transmembranales y asas intra y extracelulares) está en color verde. Panel D) Acercamiento al dominio del poro del canal. Los segmentos más cercanos a la conotoxina N son los segmentos S5 de los dominios II y III; junto con aquellas alfa hélices que estrictamente se delimitan como formadoras del poro. Por consiguiente, los mayores sitios de contacto y de interacción entre la proteína y el péptido, podrían encontrarse en estas zonas.

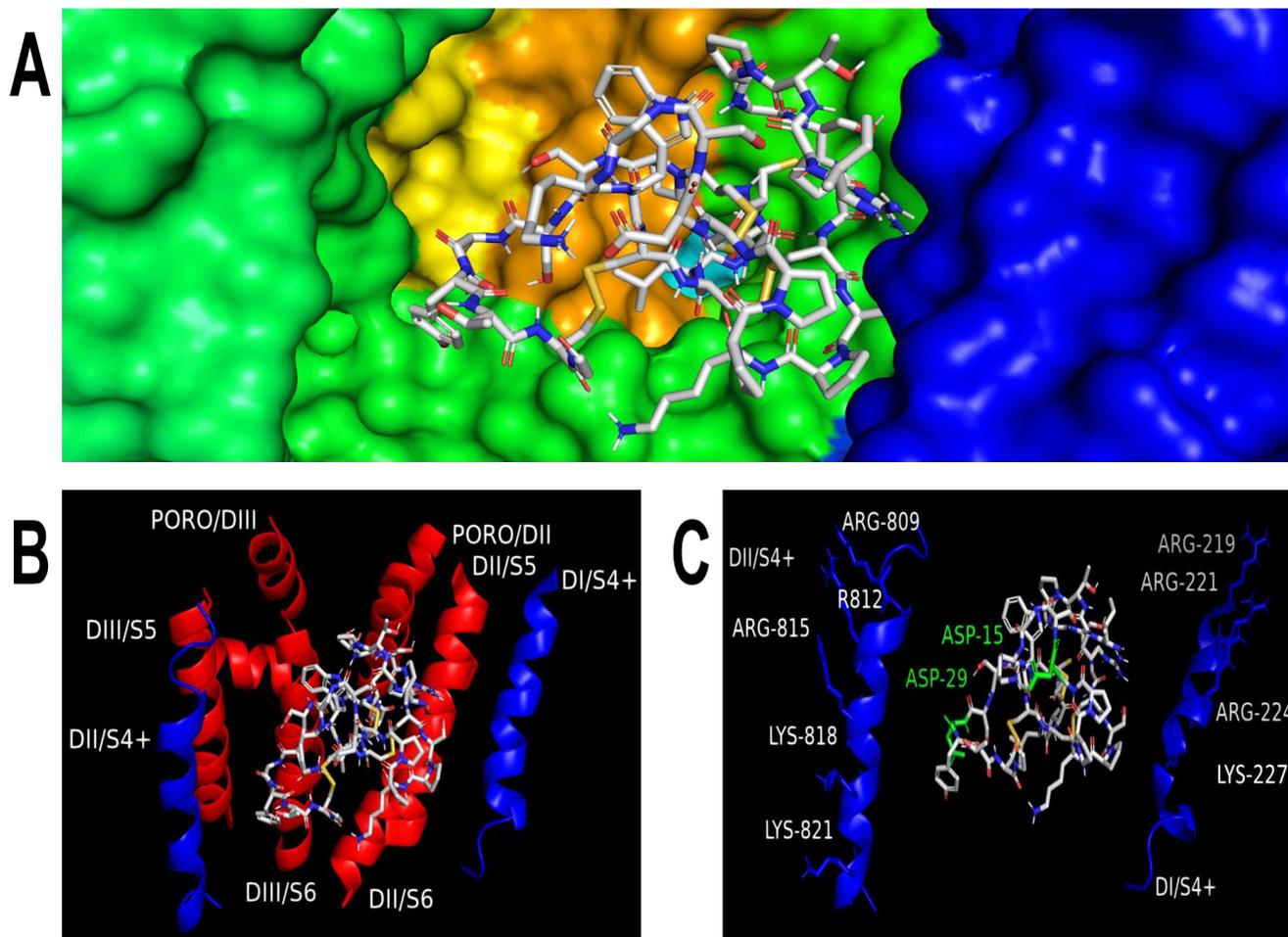


Figura 44. Potenciales sitios de unión para interacciones electrostáticas entre el canal $\text{Na}_v 1.5$ y la conotoxina 3975. Panel A) Acercamiento a los sitios de contacto entre el canal $\text{Na}_v 1.5$ visto en modo de superficie y el modelo de la conotoxina 3975 de la especie *C. fergusonii*. Al igual que en la Figura 42, se aprecia con mayor eficiencia el plegamiento de la estructura secundaria del conopéptido. En el panel B, se observan los puntos de contacto más cercanos de cada uno de los segmentos; específicamente los segmentos S5 y S6 de los dominios II y III, así como los segmentos de los mismos dominios que son conocidos por formar estrictamente el poro de conducción de iones. Además, también se observan los sensores de voltaje del canal (color azul) correspondientes a los dominios I y II. En el panel C) se muestran todos los residuos de arginina (ARG) y lisina (LYS) que se encuentran en la alfa hélice de los sensores de voltaje representados en forma de barras. Estos residuos son los potenciales sitios de unión que se proponen dentro de un modelo de *docking* molecular basado en los coeficientes de balance. Por lo tanto, al igual que con el canal $\text{Na}_v 1.4$, la interacción esperada se daría con los residuos la asparagina (ASN) 15 y 29 de la conotoxina N. Estos aminoácidos representados en forma de barras están coloreadas de verde fluorescente.

11. CONCLUSIONES

- Existe variabilidad biológica dentro de los componentes del veneno de la especie *C. fergusonii*, ya sea a nivel poblacional o determinada por el sexo.
- Existen relaciones evolutivas de *C. fergusonii* con otras especies del Océano Indo-Pacífico y del Océano Atlántico como son; *C. tribblei*, y *C. magus*, *C. distans* y *C. ermineus*, respectivamente.
- Los genes que codifican conotoxinas N y/o divergentes MSTLGMTLL- aparecieron hace millones de años por especiación, o bien surgieron por eventos de homoplasia.
- Diferentes conotoxinas de la superfamilia N y/o divergentes MSTLGMTLL- parecen estar eluyendo en un tiempo de retención de 50 minutos, bajo un gradiente de concentración de 5-100% de fase móvil B en 95 minutos.
- Probablemente, los canales de sodio activados por voltaje (tanto los que son sensibles a TTX e insensibles a TTX) sean potenciales blancos moleculares de las conotoxinas N y/o divergentes MSTLGMTLL-:
- La conotoxina 3975 podría unirse cerca del dominio de poro formado por los segmentos S5 y S6 mediante interacciones electrostáticas con el sensor de voltaje.

12. PERSPECTIVAS A FUTURO

- Es necesario confirmar por secuenciación de Edman, que la fracción con tiempo de elución de 50 minutos, corresponda con la encontrada en el transcriptoma.
- Realizar ensayos electrofisiológicos que comprueben la interacción de las conotoxinas N y/o divergentes con los diferentes subtipos de canales Nav.
- Una vez confirmada la secuencia de la conotoxina N con el número de entrada 3975, resolver su estructura por cristalografía o resonancia magnética nuclear.

13.REFERENCIAS

1. Brusca, R. C. Invertebrados. in *Invertebrados* (ed. Pardo, M. F.) 757–832 (Mc Graw-Hill, 2003).
2. Puillandre, N., Duda, T., Meyer, C., Olivera, C. M., Bouchet, P. One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *J. Molluscan Stud.* (2015). doi:10.1093/mollus/eyu055
3. Puillandre, N., Koua, D., Favreau, P., Olivera, B. M., Stöcklin, R. Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides. *J. Mol. Evol.* (2012). doi:10.1007/s00239-012-9507-2
4. Hernandez, D. Purificación y caracterización bioquímica de péptidos del veneno del caracol marino *Conus spurius atlanticus* (Clench, 1942). **1**, (2010).
5. Mansbach, R. A., Travers, T., Fair, J. M., Gnanakaran, S. Snails in silico: A review of computational studies on the conopeptides. *Mar. Drugs* **17**, (2019).
6. Gong, Z., Matzke N., Ermentrout B., Song, D. Vendetti, J., Slatkin M., Oster G. Evolution of patterns on *Conus* shells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012). doi:10.1073/pnas.1119859109
7. Duda, T. F., Kohn, A. J. Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* (2005). doi:10.1016/j.ympev.2004.09.012
8. Dutertre, S., Griffin, J., Lewis, R. J. Phyla Mollusca: The Venom Apparatus of Cone Snails. in *Marine and Freshwater Toxins* (2015). doi:10.1007/978-94-007-6650-1_8-1
9. Kohn, A. J. *Conus of the southeastern United States and Caribbean. Conus of the Southeastern United States and Caribbean* (2014). doi:10.5860/choice.187328
10. Calderón, F., Encinar, J., Sanz, A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* (2018). doi:10.1002/mas.21542
11. Paredes, C., Cardoso, F., Altamirano, K., Baltazar, P., Romero, L. The family Conidae from Peruvian Sea. *Rev. Peru. Biol.* **17**, 65–73 (2010).
12. Remigio, E. A., Duda, T. F. Evolution of ecological specialization and venom of a predatory marine gastropod. *Mol. Ecol.* (2008). doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03627.x
13. Mir, R., Karim, S., Kamal, M. A., Wilson, C. M., Mirza, Z. Conotoxins: Structure, Therapeutic Potential and Pharmacological Applications. *Curr. Pharm. Des.* (2016).
14. López E., Heimer, C., Mailo, M., Riesgo, J., Olivera, M., Aguilar, M. A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). *Toxicon* **43**, 365–374 (2004).
15. Woodward, S. R., Cruz, L. J., Olivera, B. M. Hillyard, D. R. Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO J.* (1990). doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08204.x

16. Yuan DD, Han YH, W. C., Chi, C.-W., Chi', S. articles by 'Cheng-W., CW, C. From the identification of gene organization of alpha conotoxins to the cloning of novel toxins. *Toxicon* **49**, 1135–1149 (2007).
17. Halai, R. Craik, D. J. Conotoxins: Natural product drug leads. *Natural Product Reports* **26**, 526–536 (2009).
18. Hille, B. Ion-Channels-of-Excitable-Membranes.pdf. in *Ion Channels of Excitable Membranes* (2001).
19. Kandel E. *Principles of neural science - KANDEL. MCGRAQ-HILL COMPANIES* **91**, (2000).
20. De Zoysa, M. Medicinal Benefits of Marine Invertebrates. Sources for Discovering Natural Drug Candidates. in *Advances in Food and Nutrition Research* (2012). doi:10.1016/B978-0-12-416003-3.00009-3
21. Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I., Christie, M. J. Conus Venom Peptide Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* (2012). doi:10.1124/pr.111.005322
22. Robinson, S. D. Norton, R. S. Conotoxin gene superfamilies. *Marine Drugs* (2014). doi:10.3390/md12126058
23. Ehrenstein, G. Lecar, H. The Mechanism of Signal Transmission in Nerve Axons. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1**, 347–366 (2003).
24. Rossie, S. Catterall, W. A. Regulation of Ionic Channels. *Enzymes* **18**, 335–358 (1987).
25. Brown, A. M. Birnbaumer, L. Ionic Channels and Their Regulation by G Protein Subunits. *Annu. Rev. Physiol.* (2003). doi:10.1146/annurev.ph.52.030190.001213
26. Liem, L. K., Simard, J. M., Song, Y., Tewari, K. The patch clamp technique. *Neurosurgery* **36**, 382–392 (1995).
27. Lumpkin, E. A., Marshall, K. L., Nelson, A. M. The cell biology of touch. *Journal of Cell Biology* (2010). doi:10.1083/jcb.201006074
28. Suppiramaniam, V., Bloemer, J., Reed, M. Bhattacharya, S. Ion Channels. in *Comprehensive Toxicology: Third Edition* **6–15**, 202–241 (Elsevier Inc., 2017).
29. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., Cowan, S. L. Katz, B. *Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. TRENDS in Neurosciences* (1945).
30. Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda T., *et al.* Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* (1984). doi:10.1038/312121a0
31. Catterall, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* (2000). doi:10.1016/S0896-6273(00)81133-2
32. Catterall, W. A., Goldin, A. L. Waxman, S. G. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Sodium Channels. *Pharmacological Reviews* (2003). doi:10.1124/pr.55.4.7
33. Goldin, A. L. Resurgence of sodium channel research. *Annual Review of Physiology* (2001). doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.871

34. Plummer, N. W., Meisler, M. H. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* (1999). doi:10.1006/geno.1998.5735
35. Hille, B. Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels : A four-barrier model. *J. Gen. Physiol.* (1975). doi:10.1085/jgp.66.5.535
36. Cardoso, F. C. Multi-targeting sodium and calcium channels using venom peptides for the treatment of complex ion channels-related diseases. *Biochemical Pharmacology* (2020). doi:10.1016/j.bcp.2020.114107
37. Mclean, H. Nybakken, J. On the Growth Stages on *Conus fergusonii* Sowerby, 1873, the Reinstatement of *Conus xanthicus* Dall, 1910, and a New Species of *Conus* from the Galapagos Island. *THE VELIGER* **22**, 135–143 (1979).
38. Sowerby G.B. Descriptions of five new cones. *Proc. Zool. Soc. London.* **10**, 145–146 (1873).
39. MarBEF, Union, E. *Conus* distribution. *Conus distribution* (2014).
40. Blanco, J. F., Cantera J. R. La familia Conidae (Mollusca: Gastropoda) en el pacífico colombiano. *Boletín ecotópica* 19–39 (1994).
41. Diaz, J.M.M., Gracia, C.A.M., Cantera K.J.R. Checklist of the Cone Shells (Mollusca: Gastropoda: Neogastropoda: Conidae) of Colombia. *Biota Colomb.* **6**, 73–86 (2005).
42. Ivanković, T. Hrenović, J. Surfactants in the environment. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* (2010). doi:10.2478/10004-1254-61-2010-1943
43. Kohn A.J., Perro, F.E. *Life history and biogeography: patterns in Conus.* (1994). doi:10.1017/S0025315400047846
44. Kohn, A. J. Ecology of *Conus* on Seychelles reefs at mid-twentieth century: comparative habitat use and trophic roles of co-occurring congeners. *Mar. Biol.* **162**, (2015).
45. Dutertre, S., Jin, A.H., Kas, Q., Jones, A., Alewood, P.F., Lewis, R.J. Deep Venomics Reveals the Mech for Expanded Pept Divers, *C marmoreus*. *Mol. Cell. Proteomics* (2013).
46. Dutertre, S. Jin, A., Vetter, I., Hamilton, B., Sunagar, K., Lavergne, V., et al. Evolution of separate predation-and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nat. Commun.* (2014). doi:10.1038/ncomms4521
47. Watson, S. A., Fields, J. B., Munday, P. L. Ocean acidification alters predator behaviour and reduces predation rate. *Biol. Lett.* (2017). doi:10.1098/rsbl.2016.0797
48. Pratheepa, V. Vasconcelos, V. Binding and Pharmacokinetics of the Sodium Channel Blocking Toxins (Saxitoxin and the Tetrodotoxins). *Mini-Reviews Med. Chem.* (2016). doi:10.2174/1389557516666160615020802
49. Tosti, E., Boni, R. Gallo, A. μ -Conotoxins modulating sodium currents in pain perception and transmission: A therapeutic potential. *Marine Drugs* **15**, (2017).
50. Norton, R. S. Olivera, B. M. Conotoxins down under. *Toxicon* (2006). doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.022

51. Wilson, M. J. Yoshikami, D., Azam, L., Gajewiak, J., Olivera, B., Bulaj, G., *et al.*. μ -Conotoxins that differentially block sodium channels Na V1.1 through 1.8 identify those responsible for action potentials in sciatic nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011). doi:10.1073/pnas.1107027108
52. Keizer, D. W., West, P., Lee, H., Yoshikami, D., Olivera, B., Bulaj, G., *et al.* Structural Basis for Tetrodotoxin-resistant Sodium Channel Binding by μ -Conotoxin SmIIIA. *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M309222200
53. Yang, M., Zhao, S., Min, X., Shao, M., Chen, Y., Chen, Z., *et al.* A novel μ -conotoxin from worm-hunting *Conus tessulatus* that selectively inhibit rat TTX-resistant sodium currents. *Toxicon* (2017). doi:10.1016/j.toxicon.2017.02.013
54. Shon, K. J., Olivera B., Whatkins, M., Jacobsen, R.B., Gray, W.R., Cruz, L.J., *et al.* μ -Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin- sensitive Na channel subtypes. *J. Neurosci.* (1998). doi:10.1523/jneurosci.18-12-04473.1998
55. Cruz, L. J. Gray, W.R., Olivera, B.M., Zeikus, R.D., Kerr, L. *et al.* *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J. Biol. Chem.* (1985). doi:10.1016/s0021-9258(17)39364-x
56. Ogata, N. Ohishi, Y. Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Japanese Journal of Pharmacology* (2002). doi:10.1254/jjp.88.365
57. Salceda E; Ortega. Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción. *Elem. Cienc. y Cult.* **16**, 29–37 (2009).
58. Hplc, Q. Quantitative and qualitative HPLC. *Www.Chromacademy.Com* 2–31 (2014).
59. Plascencia Villa, G. Espectrometría de masas. *Universidad Nacional Autónoma de México* (2003).
60. Paul Gates. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)*. (2014).
61. Wu, Q. DEVELOPMENT OF A METHOD TO INVESTIGATE INTRA-MOLECULAR PROTON MIGRATION DURING COLLISION INDUCED DISSOCIATION OF GAS-PHASE PEPTIDES. (School of Wichita State University, 2005).
62. Colaboradores EcuRed. EcuRed. *Degradación de Edman* (2019). Available at: https://www.ecured.cu/index.php?title=Degradación_de_Edman&id=3488103.
63. Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, K., Battey, J., Schwede, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* (2009). doi:10.1038/nprot.2008.197
64. Fan, J., Fu, A. Zhang, L. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology* (2019). doi:10.1007/s40484-019-0172-y
65. Pinzi, L., Rastelli, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences* (2019). doi:10.3390/ijms20184331
66. George, A. L., Komisarof, J., Kallen, R. G., Barchi, R. L. Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel. *Ann. Neurol.* (1992). doi:10.1002/ana.410310203

67. McClatchey, I.A., Lin, C.S., Wang, J., Hoffman, P.E., Rojas, C., Gussela F.J. The genomic structure of the human skeletal muscle sodium channel gene. *Hum. Mol. Genet.* (1992). doi:10.1093/hmg/1.7.521
68. Rogart, R. B., Cribbs, L. L., Muglia, L. K., Kephart, D. D. Kaiser, M. W. Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1989). doi:10.1073/pnas.86.20.8170
69. Desta, I., Porter, K., Xia, B., Kozakov, D. Vajda, S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *SSRN Electron. J.* (2020). doi:10.2139/ssrn.3537797
70. Vajda, S. *et al.* New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* (2017). doi:10.1002/prot.25219
71. Kozakov, D. Hall, D., Xia, B., Porter, K.A., Padhorny, D., Yueh, C., *et al.* The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat. Protoc.* (2017). doi:10.1038/nprot.2016.169
72. Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S.E., Xia, B., Hall, D.R. *et al.* How good is automated protein docking? *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* (2013). doi:10.1002/prot.24403
73. Niedermeyer, T. H. J. Strohal, M. mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0044913
74. Kaas, Q., Westermann, J. C., Halai, R., Wang, C. K. L. Craik, D. J. ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics* (2008). doi:10.1093/bioinformatics/btm596
75. Kaas, Q., Yu, R., Jin, A. H., Dutertre, S. Craik, D. J. ConoServer: Updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Res.* (2012). doi:10.1093/nar/gkr886
76. Apweiler, R. The universal protein resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res.* (2009). doi:10.1093/nar/gkp846
77. Bateman, A., Martin, C., O'Donovan, C., Magrane, M., Alpi, E., Antunes, R. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1099
78. Sayers, E. W., Barret, T., Benson, D., Bolton, E., Bryant, S.H., Canese, K. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* (2012). doi:10.1093/nar/gkr1184
79. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* (2008). doi:10.1093/nar/gkn201
80. Barghi, N., Concepcion, G. P., Olivera, B. M. Lluisma, A. O. Comparison of the venom peptides and their expression in closely related *Conus* species: Insights into adaptive post-speciation evolution of *Conus* exogenomes. *Genome Biol. Evol.* (2015). doi:10.1093/gbe/evv109
81. Barghi, N., Concepcion, G. P., Olivera, B. M. Lluisma, A. O. High Conopeptide Diversity in *Conus tribblei* Revealed Through Analysis of Venom Duct Transcriptome Using Two High-Throughput Sequencing Platforms. *Mar. Biotechnol.* (2014). doi:10.1007/s10126-014-9595-7

82. Li, Q., Barghi, N., Lu, A., Fedosov, A.E., Bandyopadhyay, P.K., Lluisma A.O. *et al.* Divergence of the venom exogene repertoire in two sister species of *Turriconus*. *Genome Biol. Evol.* (2017). doi:10.1093/gbe/evx157
83. Pardos, B. J. R., Irisarri, I., Abalde, S., Tenorio, M. J. Zardoya, R. Conotoxin diversity in the venom gland transcriptome of the magician 's cone, *pionoconus magus*. *Mar. Drugs* (2019). doi:10.3390/md17100553
84. Peng, C., Yao, G., Gao, B.M., Fan, C.X., Bian, C. *et al.* High-throughput identification of novel conotoxins from the Chinese tubular cone snail (*Conus betulinus*) by multi-transcriptome sequencing. *Gigascience* (2016). doi:10.1186/s13742-016-0122-9
85. Jin, A. H., Dutertre, S., Dutt, M., Lavergne, V., Jones, A., Lewis, R.J. *et al.* Transcriptomic-proteomic correlation in the predation-evoked venom of the Cone Snail, *Conus imperialis*. *Mar. Drugs* (2019). doi:10.3390/md17030177
86. Liu, Z., Li, H., Liu, N., Wu, C., Jiang, J., Yue, J. *et al.* Diversity and evolution of conotoxins in *Conus virgo*, *Conus eburneus*, *Conus imperialis* and *Conus marmoreus* from the South China Sea. *Toxicon* (2012). doi:10.1016/j.toxicon.2012.06.011
87. Pi, C. Liu, J., Peng, C., Liu, Y., Jiang, X., Zhao, Yu. *et al.* Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. *Genomics* (2006). doi:10.1016/j.ygeno.2006.06.014
88. Wu, C., Liu, Z. and D., Q. No Title Direct Submission. *Inst. Biotechnol. Dong Da Str. 20, Beijing 100071, China* (2012).
89. Biggs, J.S . Watkins M., Puilandre, N., Ownby, J.P., López, V. E. *et al.* Evolution of *Conus* peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Mol. Phylogenet. Evol.* (2010). doi:10.1016/j.ympev.2010.03.029
90. Wesson, L. Eisenberg, D. Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. *Protein Sci.* (1992). doi:10.1002/pro.5560010204
91. Chen, V. B. Arendalla, W., Headd J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J. *et al.* MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* (2010). doi:10.1107/S0907444909042073
92. Ballón, W. Grados, R. Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Con Cienc.* (2019).
93. Bell, E. W. Zhang, Y. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J. Cheminform.* (2019). doi:10.1186/s13321-019-0362-7
94. Yuan, D. D., Liu, L., Shao, X.X., Peng, C. Chi, C.W., Guo, Z.Y. New conotoxins define the novel I3-superfamily. *Peptides* (2009). doi:10.1016/j.peptides.2009.01.012
95. Hendricks, J. R. Using Marine Snails to Teach Biogeography and Macroevolution: The Role of Larvae and Dispersal Ability in the Evolution and Persistence of Species. *Evol. Educ. Outreach* (2012). doi:10.1007/s12052-012-0406-1
96. Frank, P. W. Growth rates and longevity of some gastropod mollusks on the coral reef at Heron Island. *Oecologia* (1969). doi:10.1007/BF00379161

97. Moreno-H. C. VALIDACIÓN DE LAS DE LAS CORRIENTES CLIMATOLÓGICAS DEL OCÉANO PACÍFICO MEXICANO SIMULADAS POR EL MODELO REGIONAL ROMS. (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2016).
98. Rosas Cota, A. Corrientes geostróficas en el Golfo de California en la superficie y a 200 metros, durante las estaciones de invierno y verano. *Calif. Coop. Ocean. Fish. Investig.* (1976).
99. Molina, C. A. *EVOLUCIÓN OCEANOGRÁFICA DE LA BOCA DEL GOLFO DE CALIFORNIA.* (1984).
100. Rockel, D. *Manual of the living Conidae.* (1995).
101. Von Cosel, R. MOLUSCOS MARINOS DE LA ISLA DE GORGONA (COSTA DEL PACIFICO COLOMBIANO). *Bull. Mar. Coast. Res.* **14**, 75–257 (2016).
102. Halanych, K. M. Invertebrates; Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach. *Syst. Biol.* (2004). doi:10.1080/10635150490472977
103. Duda, T. F. Palumbi, S. R. Gene expression and feeding ecology: Evolution of piscivory in the venomous gastropod genus *Conus*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **271**, (2004).
104. Jimenez, E. C., Shetty, R., Lirazan, M., Rivier, J., Walker C., Abogadie, F. Ce. *et al.* Novel excitatory *Conus* peptides define a new conotoxin superfamily. *J. Neurochem.* (2003). doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01685.x
105. Chen, P., Garrett, J. E., Watkins, M. Olivera, B. M. Purification and characterization of a novel excitatory peptide from *Conus distans* venom that defines a novel gene superfamily of conotoxins. *Toxicon* (2008). doi:10.1016/j.toxicon.2008.05.014
106. Willson, S. J. Tree-average distances on certain phylogenetic networks have their weights uniquely determined. *Algorithms Mol. Biol.* (2012). doi:10.1186/1748-7188-7-13
107. Jin, A. H. Israel, M., Inserra, M., Smith, J.J., Lewis, R.J. Alewood, P.F. *et al.* δ -conotoxin SuVIA suggests an evolutionary link between ancestral predator defence and the origin of fish-hunting behaviour in carnivorous cone snails. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* (2015). doi:10.1098/rspb.2015.0817
108. Valcárcel, V. *Breve introducción a las técnicas y métodos de reconstrucción filogenética.*
109. Sander, C. Schneider, R. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* (1991). doi:10.1002/prot.340090107
110. Baker, D. ABI NITIO P ROTEIN S TRUCTURE P REDICTION: Progress and Prospects. *Annu. Rev. Biophys. ...* (2001).
111. Garnier, J., Osguthorpe, D. J., Robson, B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* (1978). doi:10.1016/0022-2836(78)90297-8
112. Chen, H., Gu, F., Huang, Z. Improved Chou-Fasman method for protein secondary structure prediction. *BMC Bioinformatics* (2006). doi:10.1186/1471-2105-7-S4-S14

113. Chou, P. Y., Fasman, G. D. Prediction of Protein Conformation. *Biochemistry* (1974). doi:10.1021/bi00699a002
114. Van Gunsteren, W. F., Berendsen, H. J. C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Mol. Phys.* (1977). doi:10.1080/00268977700102571
115. Simons, K. T., Strauss, C., Baker, D. Prospects for ab initio protein structural genomics. *J. Mol. Biol.* (2001). doi:10.1006/jmbi.2000.4459
116. Jones, D. T. Predicting novel protein folds by using FRAGFOLD. *Proteins Struct. Funct. Genet.* (2001). doi:10.1002/prot.1171
117. Jones, D. T., Bryson, K., Coleman, K., McGuffin, L.J., Sadowski, M.I., Sodhi, J.S *et al.* Prediction of novel and analogous folds using fragment assembly and fold recognition. in *Proteins: Structure, Function and Genetics* (2005). doi:10.1002/prot.20731
118. Ozer, M., Abdullah, B. Function of voltage-gated ionic channels. *Istanbul Univ. - J. Electr. Electron. Eng.* (2011).

14. APÉNDICE

14.1 Figuras suplementarias

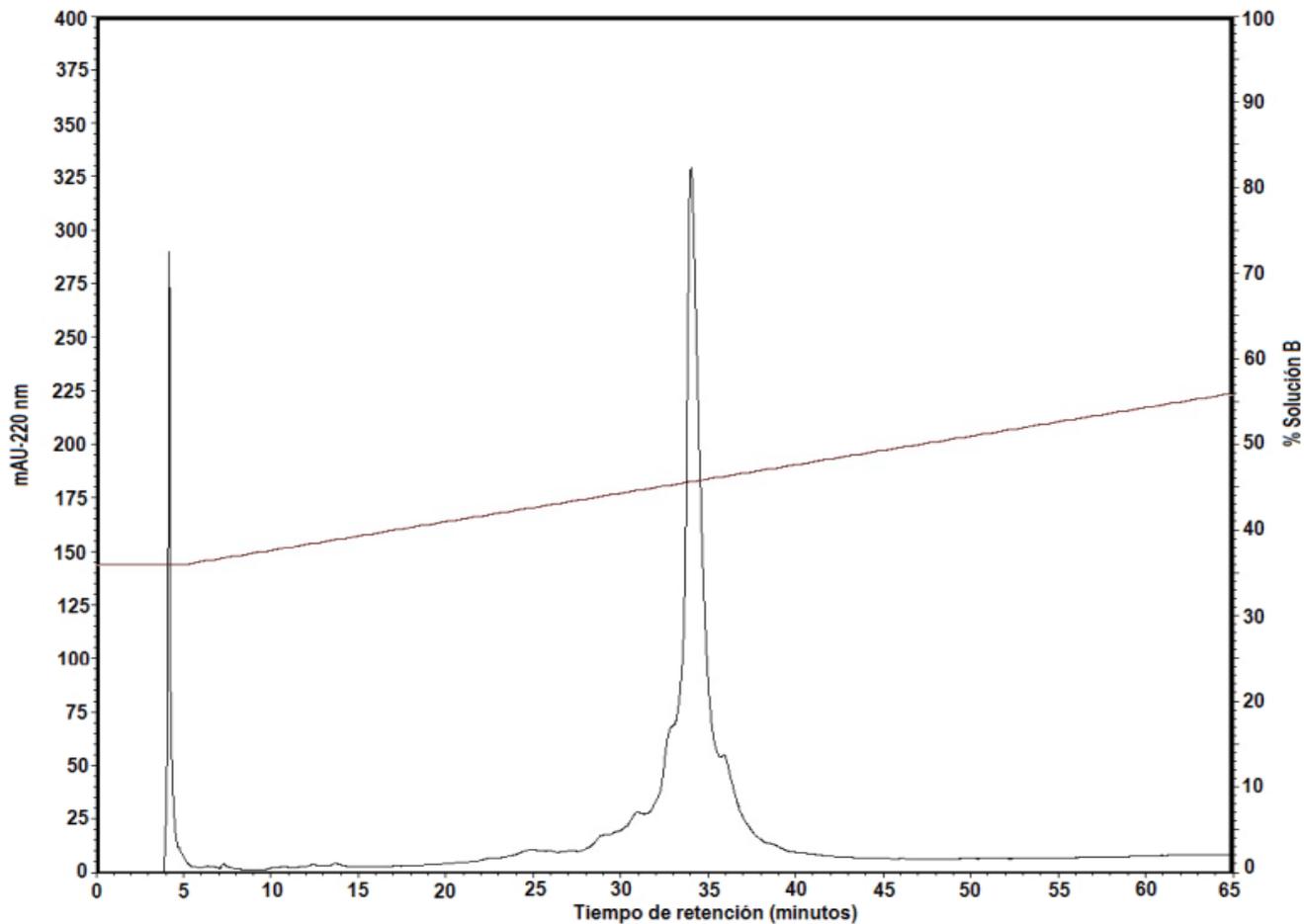


Figura 45. Purificación de la señal mayoría 39 del perfil cromatográfico de una hembra *C. fergusonii* perteneciente a la localidad de San Lázaro. Se parte de un gradiente de 36% de solución B que se mantiene durante 5 minutos. Posteriormente, un porcentaje de solución B aumenta cada 3 minutos hasta llegar a una concentración de 56%. El tiempo total de la corrida fue de 65 minutos y las señales se registraron a una longitud de onda de 220 nm.

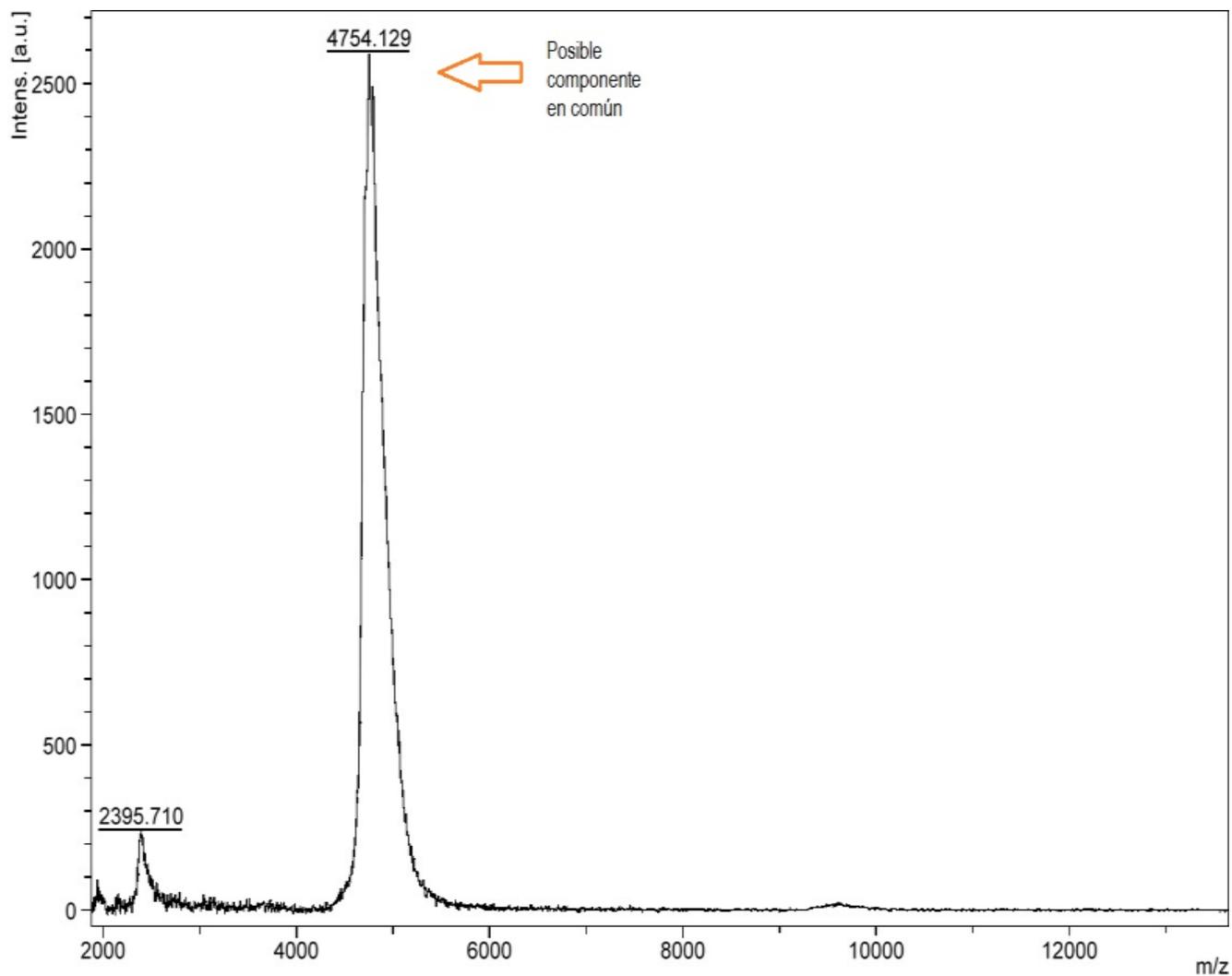


Figura 46. Espectrometría de masas por MALDI-TOF, referente al subfraccionamiento de la señal 40 que corresponde al macho *C. fergusonii* de la localidad de Piaxtla. Se observa una señal mayoritaria bastante definida con un peso molecular de 4754.129 en relación a su masa/carga. También es evidente la lectura de un segundo componente con un peso de 2395.710

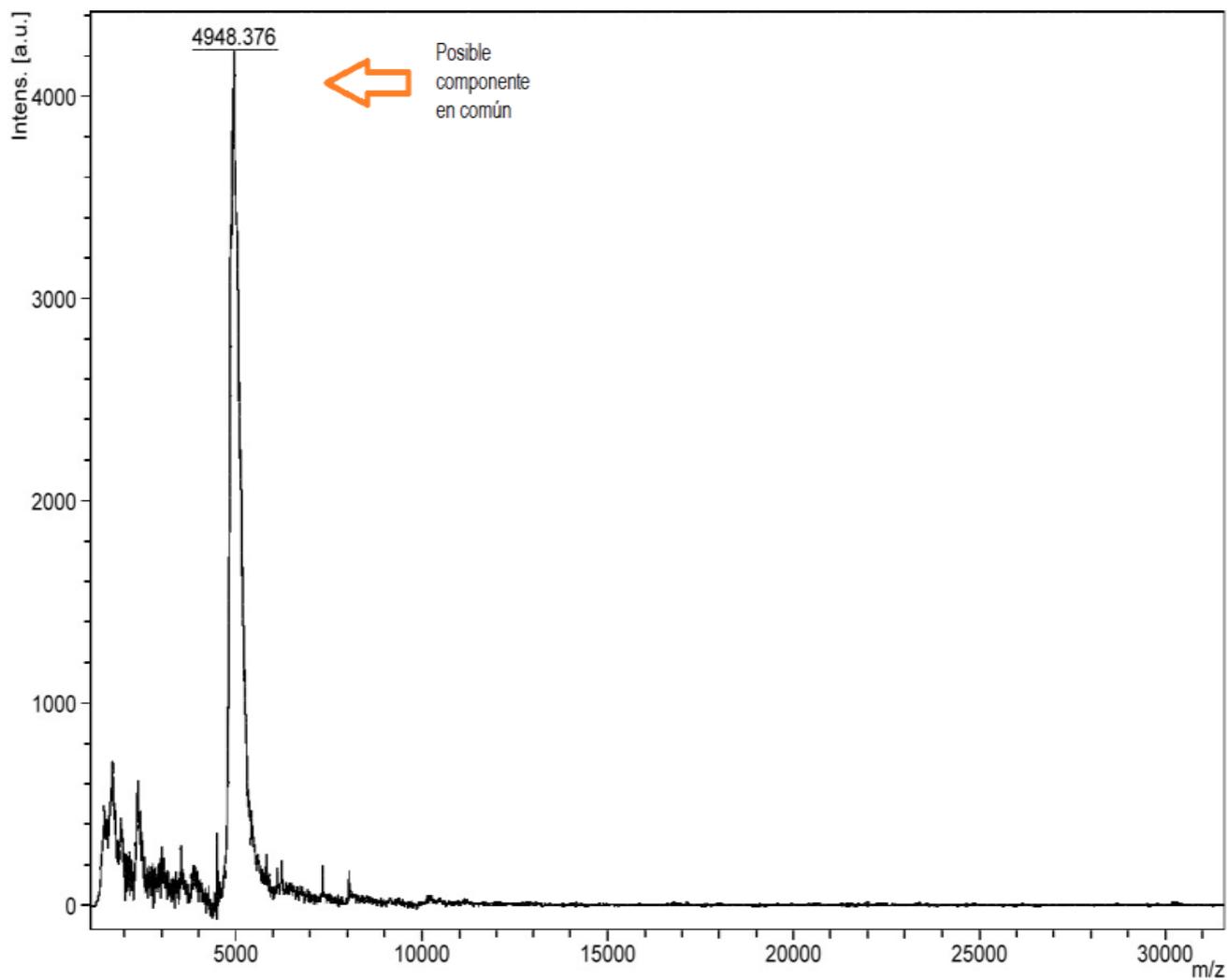


Figura 47. Espectrometría de masas por MALDI-TOF, referente al subfraccionamiento de la señal 39 que corresponde al macho *C. fergusonii* de la localidad Piaxtla. Se observa una señal mayoritaria bien definida con un peso molecular de 4948.376 en relación a su masa/carga.

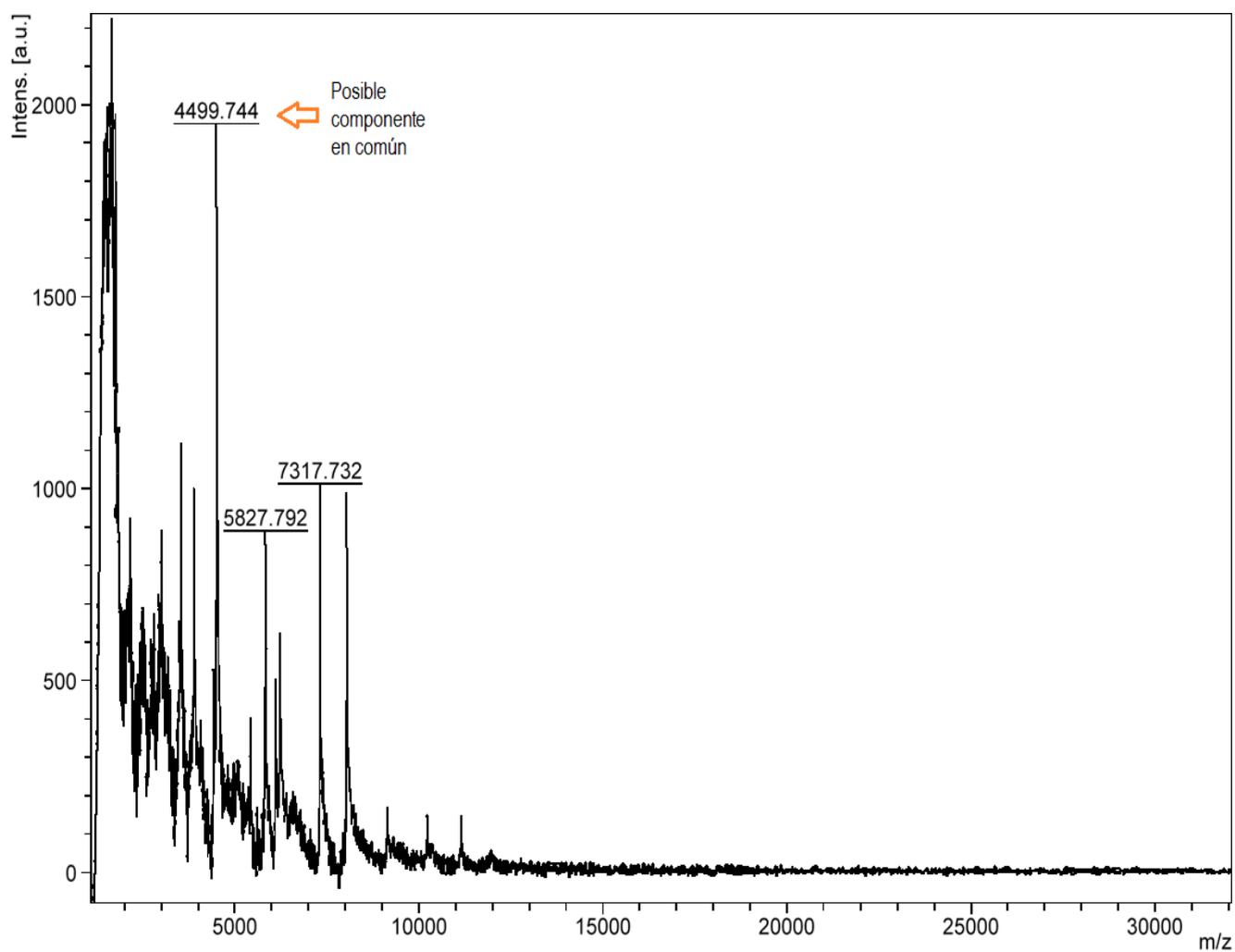


Figura 48. Espectrometría de masas por MALDI-TOF, referente al subfraccionamiento de la señal 51 que corresponde al macho *C. fergusonii* de la localidad Mármol de Salcido. Se observa un espectro con varios componentes que corresponden a una mezcla de péptidos. Sin embargo, se puede apreciar la lectura de un peso molecular de 4499.744 que podría corresponder a un componente en común; y por consiguiente una conotoxina de la superfamilia N y/o divergente.

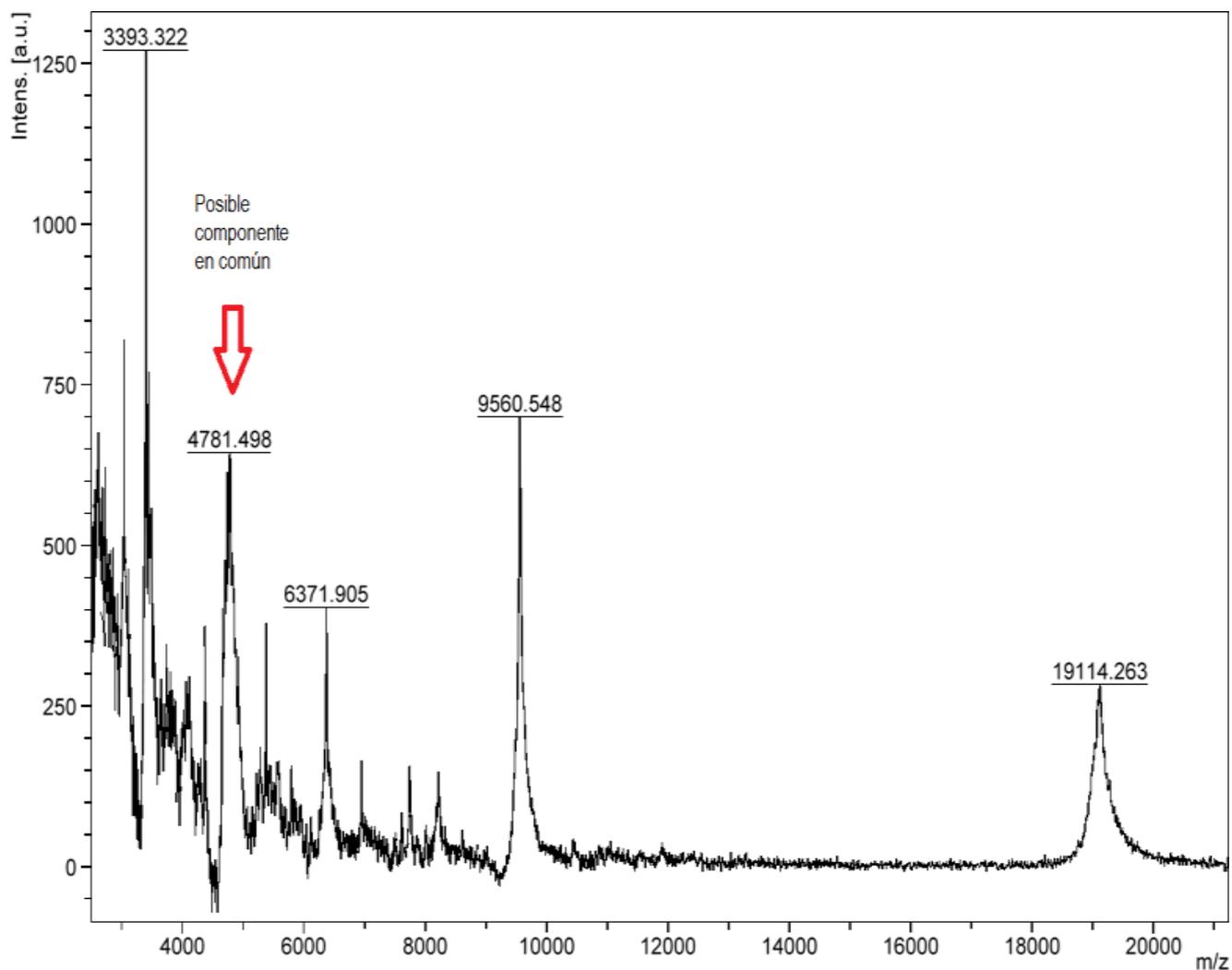


Figura 49. Espectrometría de masas por MALDI-TOF, referente al subfraccionamiento de la señal 37 que corresponde al macho *C. fergusonii* de la localidad Santo Domingo. En este espectro se observan diferentes lecturas de peso molecular. Por lo tanto, se trata de una mezcla de péptidos en la misma muestra. Sin embargo, es evidente la presencia de una señal que corresponde a un posible componente en común de 4781.498

Tabla 12. Parámetros que evalúan la geometría de la conotoxina 3975 modelada en archivo PDB. El color verde indica que son valores aceptados; en color amarillo están los valores parcialmente aceptados y el color rojo indica que los valores de geometría no son aceptables de acuerdo al rango de referencia. CABLAM hace referencia a la validación de la geometría de carbonos-alfa con base en modelos de alta resolución contenidos en base de datos.

Resultados de MolProbity de la conotoxina 3975 aislada <i>C. fergusonii</i>				
Geometría de la proteína	Rotameros de baja calidad	0	0.00%	Objetivo: <0.3%
	Rotameros favorecidos	29	96.67%	Objetivo: <98%
	Ramachandran Outliers	3	9.68%	Objetivo: <0.05%
	Ramachandran favorecidos	21	67.74%	Objetivo: >98%
	Rama-distribución Z-score	-6.79±0.81		Objetivo: abs (Zcore) <2
	Desviación C β	2	6.67%	Objetivo: >0.25Å
	Enlaces imprecisos	1/241	0.41%	Objetivo: 0%
	Ángulos imprecisos	16/329	4.86%	Objetivo: <0.1%
Criterios de baja resolución	CABLAM outliers	2	6.9%	Objetivo: <1.0%
	CA Geometría outliers	2	6.90%	Objetivo: <0.5%

Tabla 13. Parámetros que evalúan la geometría de la conotoxina 2334 modelada en archivo PDB. El color verde indica que son valores aceptados; en color amarillo están los valores parcialmente aceptados y el color rojo indica que los valores de geometría no son aceptables de acuerdo al rango de referencia. CABLAM hace referencia a la validación de la geometría de carbonos-alfa con base en modelos de alta resolución contenidos en base de datos.

Resultados de MolProbity de la conotoxina 2334 aislada <i>C. fergusonii</i>				
Geometría de la proteína	Rotameros de baja calidad	0	0.00%	Objetivo: <0.3%
	Rotameros favorecidos	23	95.83%	Objetivo: <98%
	Ramachandran Outliers	0	0.00%	Objetivo: <0.05%
	Ramachandran favorecidos	20	80.83%	Objetivo: >98%
	Rama-distribución Z-score	-3.85±1.34		Objetivo: abs (Zcore) <2
	Desviación C β	2	8.83%	Objetivo: >0.25Å
	Enlaces imprecisos	0/188	0.00%	Objetivo: 0%
	Ángulos imprecisos	3/259	1.16%	Objetivo: <0.1%
Criterios de baja resolución	CABLAM outliers	2	9.1%	Objetivo: <1.0%
	CA Geometría outliers	1	4.55%	Objetivo: <0.5%

Tabla 14. Valores de energía y número de miembros para interacciones electrostáticas entre la conotoxina 3975 y el canal Nav.1.4 Para este trabajo se utilizó el *cluster* 0

Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	280	Center	-992.7
0	280	Lowest Energy	-1169.4
1	147	Center	-985.4
1	147	Lowest Energy	-1090
2	121	Center	-1032.3
2	121	Lowest Energy	-1174.9
3	90	Center	-1002.7
3	90	Lowest Energy	-1204.4
4	70	Center	-1021.5
4	70	Lowest Energy	-1073.8
5	61	Center	-1016.9
5	61	Lowest Energy	-1166.7
6	59	Center	-992.2
6	59	Lowest Energy	-1145
7	43	Center	-985.8
7	43	Lowest Energy	-1114.2
8	41	Center	-1000.9
8	41	Lowest Energy	-1095
9	23	Center	-1003.7
9	23	Lowest Energy	-1117.3
10	16	Center	-984.5
10	16	Lowest Energy	-1060.4
11	11	Center	-1084.6
11	11	Lowest Energy	-1084.6
12	5	Center	-988.1
12	5	Lowest Energy	-1019.6
13	3	Center	-994.1
13	3	Lowest Energy	-1001.3
14	2	Center	-984.1
14	2	Lowest Energy	-994.9
15	1	Center	-994.3
15	1	Lowest Energy	-994.3

Tabla 15. Valores de energía y número de miembros para interacciones electrostáticas entre la conotoxina 3975 y el canal Nav.1.5 Para este trabajo se utilizó el *cluster* 0.

Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	225	Center	-1021.2
0	225	Lowest Energy	-1159.7
1	169	Center	-994.5
1	169	Lowest Energy	-1164.6
2	97	Center	-985.1
2	97	Lowest Energy	-1142.1
3	93	Center	-1009.1
3	93	Lowest Energy	-1111.7
4	74	Center	-1017.7
4	74	Lowest Energy	-1145.7
5	65	Center	-1006.2
5	65	Lowest Energy	-1055.7
6	50	Center	-977.1
6	50	Lowest Energy	-1137.8
7	43	Center	-990.5
7	43	Lowest Energy	-1163.4
8	43	Center	-981.8
8	43	Lowest Energy	-1089.2
9	35	Center	-1007
9	35	Lowest Energy	-1073.1
10	31	Center	-1081.5
10	31	Lowest Energy	-1081.5
11	18	Center	-972.9
11	18	Lowest Energy	-1086.6
12	13	Center	-1041.3
12	13	Lowest Energy	-1041.3
13	12	Center	-994.2
13	12	Lowest Energy	-1008.9
14	12	Center	-979.7
14	12	Lowest Energy	-1026.8
15	4	Center	-1004.3
15	4	Lowest Energy	-1004.3
16	3	Center	-1000.3
16	3	Lowest Energy	-1000.3
17	3	Center	-982.9
17	3	Lowest Energy	-982.9