



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS
DEL VENENO DEL CARACOL MARINO
*Conus delessertii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
M A E S T R A E N C I E N C I A S
(BIOLOGÍA MARINA)

P R E S E N T A
BIÓL. ARTEMISA FLORES TORRES

DIRECTOR DE TESIS: DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2009



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.



**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS
DEL VENENO DEL CARACOL MARINO**

Conus delessertii



RESUMEN

En el ambiente marino habitan distintas especies que producen moléculas consideradas potencialmente útiles para la utilización clínica. Los moluscos del género *Conus* contienen en sus venenos distintas toxinas que han sido objeto de una gran cantidad de estudios en los cuales se ha mostrado la importante contribución de las mismas a la medicina y a la biología celular y molecular. Las toxinas de los *Conus* han sido clasificadas en distintas superfamilias genéticas, básicamente de acuerdo a las secuencias de los péptidos señales de sus precursores y a los arreglos de cisteínas de las toxinas maduras. Las superfamilias incluyen diferentes familias farmacológicas, las cuales se definen en función del blanco molecular de las toxinas (canales iónicos activados por voltaje y por ligando, receptores acoplados a proteínas G, y transportadores de neurotransmisores) y a su efecto sobre éste (antagonismo competitivo y no competitivo, bloqueo del poro del canal, retraso de la inactivación, etc.). En este trabajo se llevó a cabo la purificación y caracterización química de 13 toxinas del caracol vermivoro *Conus delessertii*. La purificación de los péptidos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), la estructura primaria se determinó mediante un secuenciador automático utilizando la técnica de degradación de Edman y el peso molecular se determinó utilizando un espectrómetro de masas. Sin embargo, solo en un caso se pudo determinar la secuencia completa (péptido "Bba"). El péptido "Bba" está formado por 28 aminoácidos, seis de los cuales son residuos de cisteínas. El péptido presentó 5 variantes en su estructura primaria, debidas a modificaciones postraduccionales: la gamma-carboxilación del glutamato (posición 7), así como la hidroxilación de la prolina (posiciones 4 y 14): 1) DCIPGGENDVFROYRCCSGYCILLLCA 2) DCIPGG γ NCDVFROYRCCSGYCILLLCA, 3) DCIOGGENDVFROYRCCSGYCILLLCA, 4) DCIOGG γ NCDVFROYRCCSGYCILLLCA, y 5) DCIPGGENDVFRPYRCCSGYCILLLCA. El péptido "Bba" muestra similitud con péptidos de la superfamilia O aislados de especies del Atlántico americano, sr7a de *Conus spurius*, as7a de *Conus austini* y de7a de *Conus delessertii*; la semejanza que tiene con los dos últimos podría indicar que tiene efecto en canales catiónicos no específicos activados por voltaje tipo marcapasos. Sin embargo, también tiene similitud considerable con δ - y ω -conotoxinas, por lo que es posible que



pueda afectar canales de sodio o calcio activados por voltaje. Por lo tanto, es necesario realizar bioensayos para determinar el blanco molecular del péptido. En los demás casos, las secuencias parciales indican que algunos de los péptidos podrían tener arreglos de cisteínas como los de las superfamilias S, O, J/L, A y M, o bien nuevos arreglos. Es necesario determinar las estructuras primarias completas de estos péptidos y, al igual que en el caso del péptido "Bba", identificar sus blancos moleculares. La secuencia del péptido "Bba" será útil para sintetizarlo en cantidad suficiente para identificar su blanco molecular, determinar su mecanismo de acción, etc. Las secuencias parciales de los demás péptidos serán útiles para determinar su estructura primaria completa mediante clonación, con el fin de sintetizarlos para los estudios adicionales mencionados para el caso del péptido "Bba".



ÍNDICE

1. Introducción	1
Biología de los conos	2
Aspectos ecológicos	3
<i>Conus delessertii</i>	4
Clasificación taxonómica	5
El aparato venenoso	6
Estrategias de alimentación	7
El veneno	9
Conotoxinas	9
Síntesis de Conotoxinas	10
Clasificación de las conotoxinas	11
Cono péptidos	18
Modificaciones postraduccionales	19
Nomenclatura de los péptidos de <i>Conus</i>	21
Generalidades de moluscos	23
1.14.1. Evolución del Phylum	24
1.14.2. Clase Gastrópoda	26
1.14.2.1. Concha	27
1.14.2.2. Cabeza	28
1.14.2.3. Alimentación	28
1.14.2.4. Sistema circulatorio	29
1.14.2.5. Estructuras de excreción	30
1.14.2.6. Sistema nervioso	30
1.14.2.7. Reproducción	31
2. Antecedentes	32
3. Justificación	36
4. Objetivos	37
4.1 Objetivo general	37
4.2 Objetivos particulares	37
5. Metodología	38
5.1. Obtención del extracto crudo	38
5.2. Purificación de los Péptidos	39
5.3. Determinación de la estructura primaria	40
5.4. Determinación de la masa molecular	41



6. Resultados	43
7. Discusión	77
8. Conclusiones	89
9. Perspectivas	90
10. Literatura citada	93
11. Abreviaturas	107



Índice de figuras.

Figura 1. Tres diferentes tipos de alimentación de los caracoles <i>Conus</i>	3
Figura 2. Concha del caracol <i>Conus delessertii</i>	5
Figura 3. El aparato de veneno de los caracoles del género <i>Conus</i>	7
Figura 4. Representación de los diferentes tipos de alimentación de <i>Conus</i> Piscívoros	8
Figura 5. Comparación entre los precursores de las conotoxinas w-GIVA y w-MVIA de <i>C. geographus</i> y <i>C. magus</i> .	10
Figura 6. Concha de un gasterópodo y las partes que lo conforman	27
Figura 7. Anatomía interna de los gasterópodos	31
Figura 8. Cromatogramas de la secuenciación de Edman del péptido Iaaaa. Estándar de PTH-aminoácidos y residuos del 1 al 19.	45-49
Figura 9. Perfil cromatográfico del extracto crudo del veneno del caracol marino <i>C. delessertii</i>	51
Figura 10. Ampliación del perfil cromatográfico de la sección "A" del extracto crudo	52
Figura 11. Espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido Iaaaa	53
Figura 12. Etapas de purificación del péptido Ib	54
Figura 13. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Iba	55
Figura 14. Etapas de purificación del péptido IIa	56
Figura 15. Espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene a péptido IIaaaa	57
Figura 16. Etapas de purificación de los picos IIb y IIc	58
Figura 17. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido IIba	59
Figura 18. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido IIca	60
Figura 19. Etapas de purificación del pico IIIa	62
Figura 20. Espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido IIIaaaa	63
Figura 21. Etapas de purificación del péptido IVa	64
Figura 22. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido IVaaa	65
Figura 23. Ampliación del perfil comatográfico de la sección "B" del extracto crudo del veneno del caracol maarino <i>Conus delessertii</i>	66
Figura 24. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Ba	67



Figura 25. Perfil cromatográfico del pico Bba	68
Figura 26. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bba	69
Figura 27. Perfil cromatográfico del pico Bc	71
Figura 28. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bca	72
Figura 29. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bcb	73
Figura 30. Espectrometría de masas de la muestra que contiene al péptido Bcc	74
Figura 31. Perfil cromatográfico del pico Bda	75
Figura 32. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bda	76

Índice de tablas.

Tabla 1. Clasificación de las superfamilias y familias de las Conotoxinas	12
Tabla 2. Aminoácidos modificados postraduccionalmente en los péptidos de los venenos de <i>Conus</i>	20
Tabla 3. Toxinas de los caracoles <i>C. austini</i> y <i>C. spurius</i>	32
Tabla 4. Secuencias de los péptidos de <i>C. delessertii</i>	35
Tabla 5. Programas utilizados en la purificación de los péptidos	40
Tabla 6. Cantidades utilizadas para la determinación de la masa molecular	42
Tabla 7. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido Iaaaa	53
Tabla 8. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Iba	54
Tabla 9. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido IIaaaa	57
Tabla 10. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene a los péptidos IIba y IIca	59



Tabla 11. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido IIIaaaa	63
Tabla 12. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido IVaaaa	65
Tabla 13. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Ba	67
Tabla 14. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bba	68
Tabla 15. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bca	71
Tabla 16. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bcb	72
Tabla 17. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bcc	73
Tabla 18. Secuencia parcial del péptido, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bda	75
Tabla 19. Secuencias parciales, peso molecular calculado y peso molecular experimental de tres de las fracciones de la sección "A" del cromatograma del extracto crudo comparados con las secuencias obtenidas por Meyer en el 2001	79
Tabla 20. Algunas toxinas de la Superfamilia J Comparadas con el Péptido IIIaaaa	82
Tabla 21. Secuencias parciales de las fracciones correspondientes a la sección "A" del cromatograma del extracto crudo, peso molecular	



calculado con base en el peso molecular de cada uno de los residuos obtenidos en la secuenciación	82
Tabla 22. Secuencias parciales de las fracciones correspondientes a la sección "B" del cromatograma del extracto crudo, peso molecular calculado con base en el peso molecular de cada uno de los residuos obtenidos en la secuenciación	84
Tabla 23. Variantes del péptido Bba	86
Tabla 24. Secuencia del péptido Bba correspondiente a la sección B del cromatograma del extracto crudo comparada con otras O-Conotoxinas de caracoles vermívoros	87



1. INTRODUCCIÓN

El océano es una fuente de productos naturales que se acumulan principalmente en los organismos vivos (Jha y Zi-rong, 2004; Kijjoa y Sawangwong, 2004). En el ambiente marino se encuentra más del 80% de especies de animales y plantas de todo el planeta (McCarthy y Pomponi, 2004), además, se encuentra clasificado como el reservorio más grande de moléculas que pueden estudiarse para encontrar sustancias con potencial en la industria farmacéutica (Aneiros y Garateix, 2004), la investigación de productos naturales marinos ha permitido el descubrimiento de agentes activos considerados potencialmente útiles para la utilización clínica (Carté, 1996).

Hace tres décadas que un grupo de químicos de productos naturales marinos de diferentes países, en colaboración con farmacólogos y la industria farmacéutica, han reportado un gran número de metabolitos nuevos con propiedades útiles.

Aproximadamente la mitad de todos los artículos publicados relacionados con productos naturales marinos reportan que son activos y en algunos casos con propiedades farmacológicas (Faulkner, 2000).

Las condiciones físicas y químicas del ambiente marino hacen de éste un lugar muy exigente, competitivo y agresivo para los organismos que ahí habitan; esta situación exige que los organismos desarrollen diferentes y sofisticados sistemas bioquímicos y fisiológicos que provocan la síntesis de moléculas activas muy específicas, con una estructura química única (Halvorson, 1998; Aneiros y Garateix, 2004; Kijjoa y Sawangwong, 2004; Jha y Zi-rong, 2004). Entre los organismos que se han estudiado con el propósito de extraer sus compuestos activos están las bacterias, las cianobacterias, los hongos, algunos grupos de algas, las esponjas, los corales blandos, los gorgonáceos, los nudibranchios, los briozoarios, los tunicados (Faulkner, 2000), los moluscos, los equinodermos, los peces, las serpientes marinas y los mamíferos (Jha y Zi-rong, 2004).



Los caracoles del género *Conus* son moluscos de la clase Gastropoda, y son el único género de la familia Conidae; estos organismos han sido objeto de numerosos estudios, en los cuales se ha mostrado la importante contribución de sus toxinas a la medicina y biología celular. Los péptidos de *Conus* han llamado la atención debido a su potencial para desarrollar nuevas herramientas en el campo de la neurociencia y como nuevos medicamentos en la clínica para el dolor, epilepsia y otros desórdenes neuropatológicos (Wang y Chi, 2004). Como ejemplo se encuentran la ω -conotoxina GVIA, que ha sido una de las toxinas más ampliamente usadas en neurociencia, ya que es útil para inhibir la transmisión sináptica y para evaluar si están presentes subtipos tipo N de los canales de calcio (Olivera *et al.*, 1984) y la ω -conotoxina MVIIA (SNX-111, Ziconotide, Prialt) que ha sido aprobada como analgésico para bloquear el dolor en algunas enfermedades. Asimismo, la capacidad de las conotoxinas para actuar como ligandos altamente selectivos de canales y receptores iónicos del sistema nervioso de mamíferos ha provocado un gran interés en la química y la farmacología de péptidos (Jones y Bulaj, 2000; Livett *et al.*, 2004).

1.1. Biología de los conos

Los caracoles del género *Conus* son el grupo de depredadores marinos carnívoros más exitosos y numerosos que existe y son comúnmente conocidos como caracoles cono o conos (Olivera, 1997; Aguilar *et al.*, 2005b). Los caracoles cono son carnívoros relativamente jóvenes en términos evolutivos; el primer fósil encontrado de *Conus* aparece justo después de la extinción de los dinosaurios y los amonites (Olivera *et al.*, 1990; Olivera, 1997). Así entonces, la expansión del género alrededor del mundo ha sido relativamente reciente en la escala de tiempo geológico. La primera diversificación de los caracoles cono ocurrió en el periodo Eoceno (Olivera *et al.*, 1990).

Existen más de 500 especies del género (Buczek *et al.*, 2005), que se distribuyen en todos los ambientes tropicales y arrecifales alrededor del mundo. Por su alimentación los conos se clasifican en piscívoros (los que se alimentan de peces), mollusquívoros (los que se alimentan de moluscos) y vermívoros (los que se alimentan de gusanos, principalmente de poliquetos pero también de uroideos y hemicordados) (Olivera *et al.*, 1990; Jones y Bulaj 2000; Meyer, 2001; Buczek *et al.*,



2005) (Fig. 1). Los Conidae junto con las familias Turridae y Terebridae constituyen el suborden Toxoglossa y tienen la particularidad de poseer un aparato de veneno (Meyer, 2001); el veneno contenido dentro de éste lo utilizan como el arma principal para paralizar o matar a sus presas con el fin de capturarlas, así como un instrumento de defensa y posiblemente para disuadir a sus competidores (Olivera, 1997, Meyer, 2001; Wang y Chi, 2004; Buczek *et al.*, 2005).

A)



B)



C)

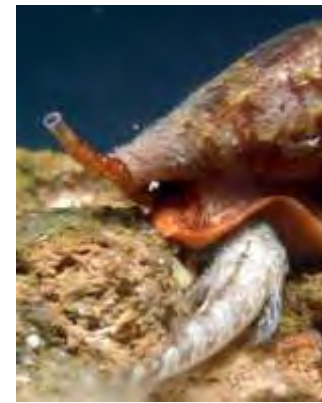


Fig. 1. Tres diferentes tipos de alimentación de los caracoles *Conus*. A) caracol molusquívoro (*Conus textile*), alimentándose de un molusco.; B) caracol vermívoro (*Conus dominicanus*), alimentándose de un poliqueto; C) caracol piscívoro (*Conus purpurascens*), alimentándose de un pez.

Fotos: A: http://www.weichtiere.at/images/weichtiere/schnecken/c_textile1.jpg B: <http://www.seashellcollector.com/articles/2005/regiuslive/Image12.jpg>
C: http://seasancarlos.com/img/illus/conus_purpurascens.jpg

1.2 Aspectos ecológicos de las especies mexicanas de *Conus*

Son pocos los estudios relacionados con los aspectos ecológicos (es decir, con el ambiente, la distribución y la abundancia, y cómo estas propiedades son afectadas por la interacción entre los organismos y su ambiente) de los caracoles cónicos que habitan en las aguas territoriales mexicanas (Abbott y Dance, 1998). Es por ello que solo se mencionan a continuación, con algunos ejemplos, los aspectos conocidos de la biología y de las distribuciones espacial y batimétrica de las especies que están siendo estudiadas en nuestro país, principalmente por el grupo del Dr. Edgar P. Heimer de la Coterá, en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM.



En las aguas de México habitan alrededor de 50 especies que se encuentran distribuidas en las llamadas provincias Panámica (costa del Océano Pacífico) (*C. brunneus*, *C. princeps*, *C. nux*, *C. purpurascens*, *Conus archon*, *Conus arcuatus*, *Conus dalli*, *Conus poormani*, *Conus patricius*, *Conus perplexus*, *Conus regularis*, *Conus scalaris*, *Conus tornatus*, *Conus virgatus*, *Conus vittatus*) y Caribeña (costas del Golfo de México y del Mar Caribe) (*C. spurius*, *C. delessertii*, *C. austini*, *C. stimpsoni*, *C. mazei*, *C. villepini*, *C. armiger*, *C. sennottorum*, *C. floridanus*, *C. regius*, *C. granulatus*, *C. daucus*, *C. mus*). Habitan diferentes ambientes, como fondos rocosos (*C. brunneus*), lodosos (*C. armiger*) y arenosos (*C. purpurascens*), así como arrecifes coralinos (*C. nux*), desde zonas intermareales (*C. californicus*) y aguas someras (< 25 m) (*C. princeps*) hasta aguas moderadamente profundas (50-100 m) (*C. delessertii*), profundas (100-400 m) (*C. spurius*) y muy profundas (> 400 m) (*C. mazei*), así como zonas de marea en los arrecifes (*C. mus*). Algunas especies son muy comunes (*C. mus*), moderadamente comunes (*C. princeps*) o comunes (*C. spurius*), mientras que otras son poco comunes (*C. austini*), raras (*C. stimpsoni*) o inusuales (*C. mazei*). Algunas especies han sido colectadas en las costas de varios Estados (*C. spurius*, en Yucatán, Campeche y Veracruz). La mayoría son vermívoras, pero también hay especies piscívoras (*C. purpurascens* y *C. ermineus*) y molusquívoras (*C. dalli*) y generalistas (*C. californicus*). Estas especies tienen como depredadores a otros moluscos, crustáceos y peces (Floeter y Soares-Gomes, 1999; Trussell y Etter, 2001; Olivera, 2002).

1.3. *Conus delessertii*

Esta especie fue descrita por Récluz en 1843. Se encuentra distribuida en las costas del Caribe, del Golfo de México y las de Florida; vive en profundidades de 15-198 m aproximadamente (Malacolog versión 4.1.0). El tamaño de las conchas varía de 6 a 8 cm de longitud y tiene la forma típica de un caracol cono: el borde final tiene una elevación en forma de pirámide con una pequeña punta en el centro. La concha está adornada con un patrón de algunas bandas blancas y marrones con puntos cafés, las bandas giran en espiral alrededor de la concha (Fig. 2). *C. delessertii* es vermívoro (Meyer, 2001).



Fig. 2. Concha del caracol *Conus delessertii*. 6-8 cm de longitud.

Foto: <http://www.schnr-specimen-shells.com/delessertii2.jpg>

1.4. Clasificación taxonómica

Clase: GASTROPODA

Subclase: PROSOBRANCHIA

Orden: NEOGASTROPODA - STENOGLOSSA

Suborden: TOXOGLOSSA (aparato venenoso)

Superfamilia: CONOIDEA

Familia: CONIDAE

Género: *Conus*

Especie: *delessertii*



1.5. El aparato venenoso

Todas las más de 500 especies vivientes de caracoles *Conus* tienen un aparato productor y liberador de veneno altamente sofisticado (Olivera, 1997). El aparato de veneno se constituye de un bulbo venenoso asociado a un conducto de veneno, un saco radular y dientes radulares (Calderón y Field, 1999; Jones y Bulaj, 2000) (Fig. 3). La función del bulbo de veneno es la de propulsar el veneno del sitio de producción hacia el diente radular (parece ser una glándula salival modificada). El conducto de veneno es una glándula tubular en donde se produce y se almacena el veneno. La rádula es el aparato más altamente modificado de los *Conus* y está contenido en un órgano (saco radular) en forma de Y o L (Kohn *et al.*, 1960); tiene la forma perfecta de un arpón hueco que contiene el veneno (Calderón y Field, 1999; Jones y Bulaj, 2000). La dentadura radular posee variaciones morfológicas entre especies que se relacionan con la dieta y en muchos de los casos la naturaleza de los componentes de los venenos refleja una especialización en la dieta (Jones y Bulaj, 2000).

Durante la alimentación el diente es movido del saco radular hacia la faringe; previamente a la inyección el diente se mete a la parte distal de la probóscide. Mientras el diente se encuentra en la faringe o probóscide se llena con el veneno que entra del conducto de veneno. Antes de la alimentación la probóscide se extiende fuera de la boca; su tamaño puede alcanzar el de la concha. El diente es entonces inyectado a la presa, la cual se comienza a paralizar por el veneno y es tragada por completo por el depredador (Kohn *et al.*, 1960; Calderón y Field, 1999; Jones y Bulaj, 2000; Wang y Chi, 2004). El caracol solo utiliza un arpón a la vez, si el caracol falla el disparo, un nuevo arpón es cargado con veneno.

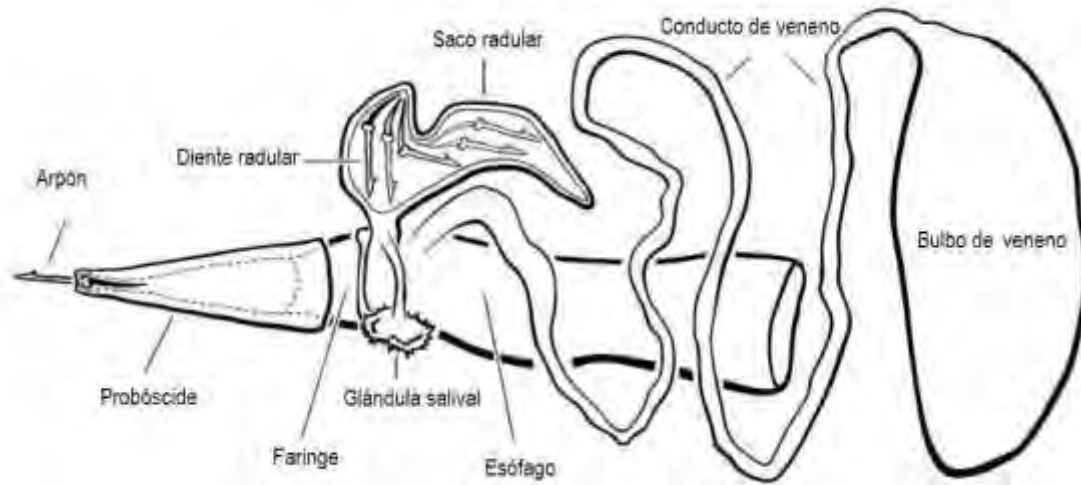


Fig. 3. El aparato de veneno de los caracoles del género *Conus* (Olivera, 2002).

1.6. Estrategias de alimentación

Las estrategias de captura de presas más conocidas son las de los caracoles como piscívoros y se dividen en dos tipos: a) pesca con arpón y sedal, en donde usan su larga probóscide para arponear a la presa con un diente desechable que parece arpón y que también sirve como una aguja hipodérmica; b) pesca con red: los caracoles como se tragan a sus presas con una larga boca que se extiende antes de la picadura (Cruz y White, 1995). Los depredadores con movimientos lentos o sésiles tienen una necesidad particular de tener venenos que actúen extremadamente rápido para facilitar su alimentación; esto es un escenario favorable para la evolución de toxinas que tienen como blanco el sistema nervioso (Olivera, 1997).

Para ejemplificar los tipos de alimentación se describirán las estrategias que presentan dos especies distintas de *Conus* piscívoros del Indopacífico *C. striatus* (para el caso de pesca con arpón y sedal) y *C. geographus* (en el caso de pesca con red).

C. striatus. Se entierra en la arena y embosca a su presa extendiendo su probóscide que actúa como un arpón y sedal; la presa es arponeada al expulsar el diente radular parcialmente fuera de la probóscide. Posteriormente el caracol jalará el arpón hacia él con los músculos que se encuentran al



final de la probóscide y la moverá hacia atrás, de tal forma que el pez es sujetado por el diente radular. Mientras el pez es arponeado y sujetado, el veneno es inyectado a través del orificio del diente radular; como resultado hay una parálisis inmediata. Con una buena inyección el pez se sacude violentamente, después es inmovilizado con la aletas extendidas, señal de un estado tetánico característico (Fig. 4-A) (Olivera, 2002).

C. geographus., es la especie más letal para los humanos: el 70% de los casos sin tratamiento han sido fatales (Cruz y White, 1995). Envuelve a los peces con su rostrum altamente extensible (algunas veces llamado falsa boca) que parece como una red enorme. El caracol envuelve a los peces antes de que la picadura ocurra (el hecho de que los peces son picados dentro del rostrum del caracol se puede verificar debido a que un diente radular se encuentra siempre una vez que el caracol regurgita las escamas y los huesos de los peces). Además si *C. geographus* se encuentra frente a varios peces tratará siempre de capturar más de uno (Fig. 4-B) (Olivera, 2002). Aunque la estrategia de pesca con arpón y sedal permite la captura de presas a distancias más largas, la ventaja potencial de la pesca con red es que se vuelve más fácil capturar varios peces pequeños al mismo tiempo (Olivera, 1997).

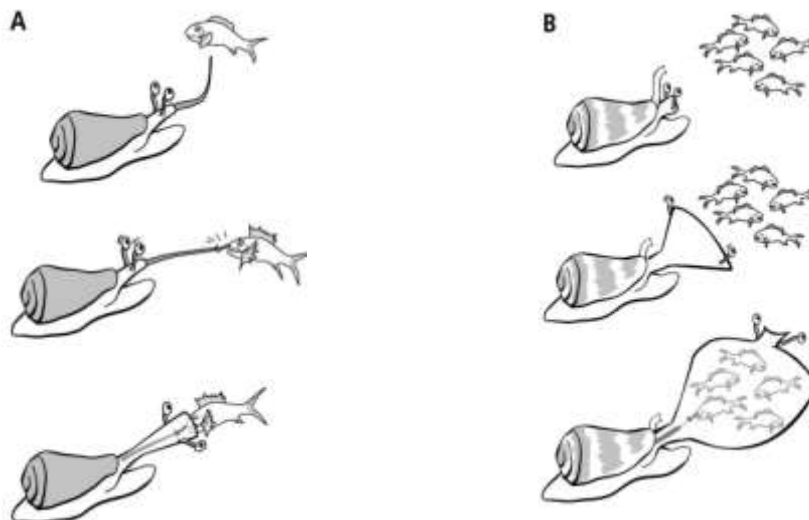


Fig. 4. Representación de los dos diferentes tipos de alimentación de *Conus* piscívoros.

A) *C. striatus* y B) *C. geographus* (Olivera, 2002).



1.7. El veneno

Los caracoles como contienen péptidos altamente tóxicos dentro de sus venenos (Wang y Chi, 2004). El veneno es un fluido lechoso que contiene pequeños gránulos insolubles, proteínas solubles, péptidos y componentes de bajo peso molecular. Los gránulos insolubles son ricos en proteínas que contienen cisteínas y representan precursores incompletos de los péptidos solubles. Las proteínas biológicamente activas han sido parcialmente purificadas y caracterizadas de algunos venenos de *Conus* (Gray *et al.*, 1988).

1.8. Conotoxinas

Las especies de *Conus* han desarrollado distintos venenos como una estrategia de supervivencia para la alimentación y la defensa. Sus venenos contienen una mezcla diversa de péptidos activos, en su mayoría pequeños y estructuralmente compactos (McIntosh *et al.*, 1999). La mayoría de los compuestos activos de los venenos de *Conus* son péptidos relativamente pequeños, divididos en dos clases distintas, aquellos con múltiples puentes disulfuro (conotoxinas) y aquellos que solo tienen un puente disulfuro o ninguno (conopéptidos). En general, las diferentes familias con múltiples puentes disulfuro son más diversas y más ampliamente distribuidas a lo largo del género. Aunque las conotoxinas son pequeñas, estas asumen conformaciones específicas (como si fueran polipéptidos más grandes). Para la mayoría de los péptidos de *Conus*, la estabilidad conformacional está dada por los puentes disulfuro. Las conotoxinas tienen de 8 a 40 aminoácidos (AA), con su mayoría entre 12 a 30 AA (Olivera, 2002).



1.9. Síntesis de las conotoxinas

Todas las conotoxinas son sintetizadas a través del mecanismo ribosomal convencional, de tal forma que los péptidos de *Conus* son traducidos inicialmente como prepropéptidos precursores con 70 a 120 aminoácidos en su estructura (Olivera y Cruz, 2001). La organización de los precursores de las conotoxinas consiste en una secuencia señal típica en el extremo N-terminal, la región “pre” (con 20 a 25 amino ácidos en su estructura), seguida por una región intermedia, la región “pro” (con 30 a 60 amino ácidos en su estructura), y finalmente se encuentra la región de la toxina madura en el extremo carboxilo, siempre presente en una sola copia (con 8 a 40 aminoácidos en su estructura) (Fig. 5). Las tres regiones antes mencionadas son consideradas como regiones con diferentes funciones; la región “pre” tiene como función dirigir al conopéptido en su camino hacia la secreción. Por otro lado, algunos datos sugieren que la región “pro” tiene señales de reconocimiento para las enzimas que realizan las modificaciones postraduccionales. La región de la toxina madura en el extremo C-terminal funciona como el componente biológicamente activo del veneno del *Conus* (Olivera, 2002). El rompimiento proteolítico del precursor para generar la toxina funcional final es un paso obligatorio en la maduración de los péptidos de *Conus* caracterizados a la fecha (Bulaj *et al.*, 2003)

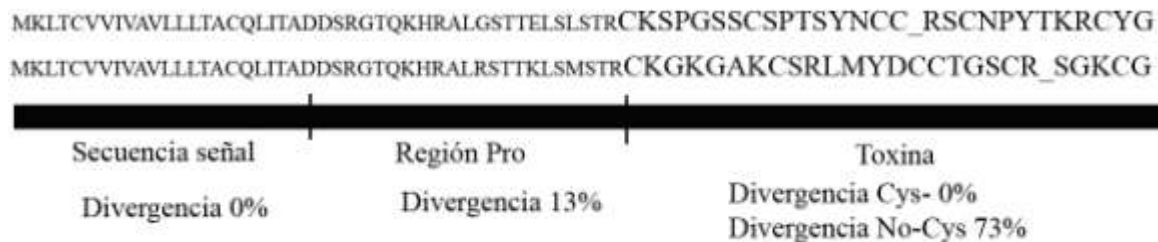


Fig. 5. Comparación entre los precursores de las conotoxinas ω -GIVA (arriba) y ω -MVIIA (abajo) de *C. geographus* y *C. magus* respectivamente. Es importante resaltar que la “secuencia señal” comparte los mismos amino ácidos en su secuencia; por otro lado la mayoría de los aminoácidos no-Cys de la región de la toxina madura son diferentes, mientras que el patrón de cisteínas de la toxina madura se conserva (Olivera, 1997).



1.10. Clasificación de las conotoxinas

La diversificación de los péptidos se origina por hipermutación local de los aminoácidos de la toxina madura, mientras que el resto del precursor no se modifica. (Fig. 5.) (Olivera, 2002). Las conotoxinas pueden clasificarse en superfamilias de acuerdo a la secuencia señal del precursor. En general, cada superfamilia está asociada a un arreglo de cisteínas característico, pero las superfamilias A y T incluyen péptidos con dos arreglos de cisteínas distintos (Tabla 1). Además, cada superfamilia genética puede incluir una o más familias farmacológicas, las cuales se definen de acuerdo al tipo de blanco molecular de las toxinas y al efecto sobre el blanco (McIntosh *et al.*, 1999; Olivera y Cruz, 2001).



Tabla 1. Clasificación de las superfamilias y familias de las Conotoxinas. P= piscivoro, M= molusquivoro, V= vermívoro.

Superfamilia	Arreglo de cisteínas	Familia	Actividad farmacológica	Especie	Toxina	Canal	Referencia	
A	CC-C-C	α	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina	<i>C. geographus</i> , P	α -GI	α/δ o α/γ	Olivera, 1997; Sines <i>et al.</i> , 1995; Cortéz <i>et al.</i> , 2002; McIntosh <i>et al.</i> , 1999.	
				<i>C. magus</i> , P	α -MI	α/δ o α/γ		
				<i>C. striatus</i> , P	α -SI	α/δ y α/γ		
				<i>C. ermineus</i> , P	α -EI	α/δ		
				<i>C. imperialis</i> , V	α -ImI	$\alpha/\alpha[\alpha7/\alpha7]$		
				<i>C. imperialis</i> , V	α -ImII	$\alpha/\alpha[\alpha7/\alpha7]$		Ellison <i>et al.</i> , 2003.
				<i>C. magus</i> , P	α -MII	$\alpha/\beta[\alpha3\beta2]$		McIntosh <i>et al.</i> , 1999.
				<i>C. episcopatus</i> , M	α -EpI	$\alpha/\beta[\alpha7\ \&\ \alpha3\ \beta\ 4]$		Loughan <i>et al.</i> , 1998.
				<i>C. aulicus</i> , M	α -AuIB	$\alpha/\beta[\alpha3\ \beta\ 4]$		McIntosh <i>et al.</i> , 1999.
				<i>C. geographus</i> , P	α -GIC	$\alpha/\beta[\alpha3\ \beta\ 2]$		McIntosh <i>et al.</i> , 2002.
<i>C. geographus</i> , P	α -GID	$\alpha/\beta[\alpha7, \alpha3\ \beta2, \alpha4\ \beta2,]$	Nicke <i>et al.</i> , 2003.					
<i>C. vitoriae</i> , M	α -Vc1.1	α/β	Sandall <i>et al.</i> , 2003.					
<i>C. purpurascens</i> , M	α -PIA	$\alpha/\beta[\alpha6]$	Dowell <i>et al.</i> , 2003.					
A	CC-C-C-C-C	α A	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina	<i>C. purpurascens</i> , P	α A-PIVA	$\zeta?$	Hann <i>et al.</i> , 1994.	
				<i>C. ermineus</i> , P	α A-EIVA α A-EIVB	$\alpha1\beta1\gamma, \alpha1\beta1\delta$	Fan <i>et al.</i> , 2003.	
	CC-C-C	P	Antagonista, receptor adrenérgico	<i>C. tulipa</i> , P	P-TIA	$\alpha1B$	Sharpe <i>et al.</i> , 2003 ^a .	
	CC-C-C-C-C	κ A	Bloquea canal de K ⁺ activado por voltaje	<i>C. striatus</i> , P	κ A-SIVA	$\zeta?$	Tertau <i>et al.</i> , 1999.	
M	CC-C-C-CC	μ	Bloquea canal de Na ⁺ activado por voltaje	<i>C. pupurascens</i> , P	μ -PIIIA	$\zeta?$	McIntosh <i>et al.</i> , 1995.	
				<i>C. stercusmuscarum</i> , P	μ -SmIIIA		West., <i>et al.</i> , 2002.	
	CC-C-C-CC	Ψ	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina	<i>C. purpurascens</i> , P	ψ -PIIIE ψ -PIIIF	$\zeta?$	Shon <i>et al.</i> , 1997; Van Wagoner <i>et al.</i> , 2003.	
CC-C-C-CC	κ M	Bloquea canal de K ⁺ activado por voltaje	<i>C. radiatus</i> , P	κ M-RIIHK	$\zeta?$	Ferber <i>et al.</i> , 2003.		



O	C-C-CC-C-C	ω	Inhibe canal de Ca^{2+} activados por voltaje	<i>C. magus, P</i> <i>C. geographus, P</i> <i>C. catus, P</i> <i>C. consors, P</i> <i>C. magus, P</i>	ω -MVIIA ω -GVIA ω -CVID ω -CNVII ω -MVIII	tipo N tipo N (Cav 2. 2) tipo P/Q	McDonough <i>et al.</i> , 2002. Kerr <i>et al.</i> , 1984. Adams <i>et al.</i> , 2003. Favreau <i>et al.</i> , 2001. Sasaki <i>et al.</i> , 1999.
	C-C-CC-C-C	K	Bloquea canal de K^+ activados por voltaje	<i>C. purpurascens, P</i>	K- PVIIA	Shaker K^+	Terlau <i>et al.</i> , 1996b.
	C-C-CC-C-C	Δ	Retrasa inactivación, canal de Na^+ activado por voltaje	<i>C. striatus, P</i> <i>C. ermineus, P</i> <i>C. textile, M</i> <i>C. purpurascens, P</i>	δ -SVIE δ -EVIA δ -TxVIA δ -PVIA	Nav1.4 Nav1.2, Nav1.3 y Nav 1.6 $\zeta?$ $\zeta?$	West <i>et al.</i> , 2005. Barbier <i>et al.</i> , 2005. Fainzilber <i>et al.</i> , 1991. West <i>et al.</i> , 2005.
	C-C-CC-C-C	μ O	Bloquea canal de Na^+ activado por voltaje	<i>C. marmoreus, M</i>	μ O-MrVIA μ O-MrVIB	Nav1.4, Nav1.2	Terlau <i>et al.</i> , 1996a.
	C-C-CC-C-C	Γ	Modula canal marcapaso	<i>C. pennaceus, M</i> <i>C. textile, M</i>	γ -PnVIIA γ -TxVIIA	$\zeta?$ $\zeta?$	Fainzilber <i>et al.</i> , 1998. Nakamura <i>et al.</i> , 1996.
P	C-C-C-C-C-C	espasmódicos	$\zeta?$	<i>C. gloriamaris, M</i> <i>C. textile, M</i>	Gm9a tx9a	$\zeta?$ $\zeta?$	Miles <i>et al.</i> , 2002. Lirazan <i>et al.</i> , 2000.
S	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	Σ	Antagonista, receptor de serotonina	<i>C. geographus, P</i>	Σ - GVIIIA	5-HT ₃	England <i>et al.</i> , 1998.
	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	α S	Antagonista, receptor nicotínico de acetilcolina	<i>C. radiatus, P</i>	α S-RVIIIA	α 1 β 1 ϵ δ , α 1 β 1 γ δ , α 7, α 3 β 2 y α 3 β 4	Teichert <i>et al.</i> , 2005.
I	C-C-CC-CC-C-C	Excitatorios	Canal de K^+	<i>C. radiatus, P</i>	r11a, r11b r11c, r11d r11e	$\zeta?$	Jimenez <i>et al.</i> , 2003.



		¿?	Modula canal de K ⁺ activado por voltaje dependiente de Ca ²⁺	<i>C. betulinus, V</i>	κ-BtX	tipo BK	Fan <i>et al.</i> , 2003.
		¿?	¿?	<i>C. spurius</i>	sr11a	¿?	Aguilar <i>et al.</i> , 2007.
		κI	Bloquea canal de K ⁺ activado por voltaje	<i>C. virgo, V</i>	κ-ViTx	Kv1.1 y Kv1.3	Kaufenstein <i>et al.</i> , 2004; Mondal <i>et al.</i> , 2005.
		ι	Activa canal de K ⁺ dependiente de voltaje	<i>C. radiatus, P</i>	ι-RXIA	Kv1.6	Buczek <i>et al.</i> , 2007
J	C-C-C-C		Bloquea canal de K ⁺ activado por voltaje Bloquea receptores de acetilcolina	<i>C. planorbis, V</i>	pI14a	Kv1.6 α1β1εδ y α3 β4	Imperial <i>et al.</i> , 2006.
T	CC-CC	T	Bloquea canal de Ca ²⁺ presináptico	<i>C. textile, M</i>	tx5a	¿?	Walter <i>et al.</i> , 1999.
	C-C-CPC	X	Inhibe transporte de norepinefrina	<i>C. marmoreus, M</i>	X-MrIA	¿?	Sharpe <i>et al.</i> , 2003b.
No asignada	C-C	Conopresinas	Agonista, receptor vasopresina-oxitocina	<i>C. imperialis, V</i>	Lys-conopressin-G	¿?	Nielsen <i>et al.</i> , 1994.
No asignada	C-C	Contrifanos	Modula canal de K ⁺ Bloque canal de calcio	<i>C. ventricosus, V</i> <i>C. marmoreus, M</i> <i>C. radiatus, P</i> <i>C. stercusmuscarum, P</i> <i>C. purpurascens, P</i>	Contrifano-Vn Contrifano-Mr Contrifano-R Contrifano-Sm Contrifano-P	canal de K ⁺ dependiente de Ca ²⁺ canal de calcio tipo L ¿?	Massilia <i>et al.</i> , 2003 Hansson <i>et al.</i> , 2004 Jiménez <i>et al.</i> , 1996. Jacobsen <i>et al.</i> , 1998. Jacobsen <i>et al.</i> , 1999.
No cisteínas		Conantokinas	Antagonista NMDAR	<i>C. geographus, P</i> <i>C. tulipa, P</i> <i>C. lynceus, P</i>	Con-G Con-T Com-L	¿? ¿? ¿?	Hammerland <i>et al.</i> , 1992. Haack <i>et al.</i> , 1990. Jiménez <i>et al.</i> , 2002.
No cisteínas		Conorfamidas	¿Activa canales de Na ⁺ ?	<i>C. spurius, V</i>	Sr1	¿?	Maillo <i>et al.</i> , 2002.
No cisteínas		Contulakinas	Agonista, receptor de neurotensina	<i>C. geographus, P</i>	Cont-G	¿?	Craig <i>et al.</i> , 1999.



La Superfamilia A está compuesta por cuatro diferentes familias: la familia “ α ” que es antagonista del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), la familia “ ρ ” que es antagonista del receptor adrenérgico α 1B, ambas familias con un arreglo de cisteínas CC-C-C, y la familias “ α A” que es antagonista del nAChR y “ κ A” que bloquea canales de potasio activados por voltaje, ambas con el arreglo de cisteínas CC-C-C-C-C.

Las primeras toxinas aisladas de *Conus* fueron las que ahora llamamos α -conotoxinas, se les llamó así debido a que su actividad era similar a la de las α -neurotoxinas de los venenos de serpientes; éstas bloquean nAChR en el músculo esquelético. Las α - conotoxinas son los péptidos paráliticos más pequeños, contienen de 13 a 15 residuos de AA básicamente con 2 puentes disulfuro. Un factor notorio en su acción es la velocidad con la que las α -conotoxinas inducen parálisis en comparación con la α -BgTX, siendo un factor muy importante para los caracoles en la captura de peces (Gray *et al.*, 1988).

La Superfamilia M está compuesta por tres diferentes familias: la familias “ μ ” y “ κ M” que bloquean, respectivamente, canales de sodio y de potasio activados por voltaje en células musculares (Olivera, 1997), y la familia “ ψ ” que bloquea receptores nicotínicos; además, esta superfamilia se caracteriza por poseer el arreglo de cisteínas CC-C-C-CC (Shon *et al.*, 1997).

La Superfamilia O consiste en toxinas que contienen de 25 a 35 residuos de aminoácidos y 6 cisteínas. Esta superfamilia se compone por cinco familias distintas que presentan el patrón C-C-CC-C-C (Heinemann y Leipold, 2007). La familia “ ω ” que inhibe canales de calcio neuronales presinápticos activados por voltaje evitando la liberación de neurotransmisores; dentro de esta familia se encuentra el péptido ω -MVIIA que ha sido el primero en salir al mercado con el nombre genérico Ziconotide y es utilizado en enfermos de cáncer que presentan dolor neuropático; así mismo, las ω -conotoxinas se han convertido en herramientas estándar para identificar distintos subtipos de canales de calcio tipo N (Olivera, 2000). La familia “ κ ” que bloquea canales de potasio del tipo "Shaker" (Terlau *et al.*, 1996b). La familia “ δ ” que retrasa la inactivación de canales de sodio



activados por voltaje (Shon *et al.*, 1998). La familia “ μ O” que bloquea canales de sodio activados por voltaje; estas conotoxinas han sido consideradas como potenciales analgésicos (McIntosh *et al.*, 1995, Heinemann y Leipold, 2007). La familia “ γ ” incluye agonistas de canales catiónicos de tipo marcapaso en neuronas (Fainzilber *et al.*, 1998).

La Superfamilia P. Dentro de esta superfamilia se encuentra el péptido que causa espasmos en ratones que fué extraído del caracol marino *Conus textile*. Este péptido fue nombrado tx9a, contiene 27 aminoácidos, con un arreglo de cisteínas C-C-C-C-C que tiene la presencia de γ -carboxiglutamato en las posiciones 8 y 13. Hasta el momento el blanco molecular de este péptido no se conoce (Lirazan *et al.*, 2000). Posteriormente se realizó la caracterización de un péptido homólogo que se nombró gm9a, extraído del veneno del caracol molusquívoro *C. gloriamaris*. (Miles *et al.*, 2002).

La Superfamilia S. El primer péptido caracterizado de la superfamilia S fue el σ -GVIIIa, del caracol *C. geographus*, el cual contiene 41 aminoácidos con un arreglo de cisteínas C-C-C-C-C-C-C-C-C, es antagonista del receptor serotoninérgico 5-HT₃, y fue clasificado dentro de la familia “ σ ” de las conotoxinas (England *et al.*, 1998); posteriormente se descubrió el péptido α S-RVIIIa extraído del veneno del caracol *C. radiatus*; este péptido pertenece a la familia α S de las conotoxinas; contiene 47 aminoácidos en su estructura primaria y el mismo arreglo de cisteínas que σ -GVIIIa además de ser un antagonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina (Teichert *et al.*, 2005).

La Superfamilia I. Las conotoxinas de esta superfamilia se han clasificado en dos superfamilias la, I₁ y la I₂; esto, depende básicamente de las secuencias del péptido señal y de la presencia (I₁) o ausencia (I₂) de la región “pro” del precursor. Además estas conotoxinas deberían ser clasificadas desde el punto de vista estructural en tres grupos de acuerdo a su patrón de residuos de cisteínas y al procesamiento del extremo carboxilo, en los grupos A, B y C. La superfamilia I₁ incluye a los grupos A y B, mientras que el grupo C pertenece a la superfamilia I₂. El grupo A incluye a 19 péptidos purificados y clonados de *C. radiatus*, *C. figulinus*, *C. magus*, y *C. striatus*. El grupo B incluye cuatro péptidos purificados y clonados de *C. radiatus*, *C. betulinus* y *C. episcopatus*. El grupo



C incluye ocho péptidos purificados y clonados de *C. betulinus*, *C. virgo*, *C. emaciatu*s, *C. figulinus*, *C. episcopatus*, *C. striolatus*, *C. striatus* y *C. textile* (Buczek *et al.*, 2005b).

La superfamilia I₁ está compuesta por la familia que contienen a los péptidos excitatorios que actúan sobre canales de potasio, y la familia “ι” que contiene a la toxina RXIA que actúa sobre canales de sodio dependientes de voltaje; ambos tipos de toxinas fueron extraídos del caracol piscívoro *C. radiatus* (Jiménez *et al.*, 2003; Buczek *et al.*, 2007). Asimismo, la superfamilia I₂ está formada por la familia “κI” que bloquea canales de potasio activados por voltaje (Kv1.1 y Kv1.3) en donde se encuentra la toxina “ViTx” extraída del caracol *C. virgo* (Kaufenstein *et al.*, 2003), y adicionalmente por las toxinas que modulan canales de potasio activados por voltaje dependientes de calcio (tipo BK), “κ-BtX” del caracol *C. betulinus* (Fan *et al.*, 2003) y posiblemente “sr11a” del caracol *C. spurius* (Aguilar *et al.*, 2007). Todas las anteriores con arreglo de cisteínas C-C-CC-CC-C-C.

La Superfamilia T. Las conotoxinas de esta superfamilia se han encontrado en los conductos venenosos de los tres distintos tipos de conos: piscívoros, molusquívoros, y vermívoros (Walker *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2005). La amplia distribución del de la superfamilia T sugiere que estos péptidos juegan un papel importante en las funciones fisiológicas del género (Han *et al.*, 2005). La superfamilia T contiene a las familias “ε/τ” que probablemente bloquea canales de calcio presinápticos y “λ/χ” que inhibe el transporte de norepinefrina con arreglos de cisteínas CC-CC y C-C-CPC, respectivamente.

Superfamilia J. La conotoxina pl14a del caracol vermívoro *Conus planorbis* pertenece a esta superfamilia, esta es la primer conotoxina que inhibe algunos subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina y canales potasio en el subtipo Kv1.6 Este péptido contiene 25 residuos de aminoácidos en su estructura primaria y tiene un arreglo de cisteínas C-C-C-C (Imperial *et al.*, 2006).



1.11. Conopéptidos

En este grupo se encuentran los péptidos que contienen ningún o un solo puente disulfuro; el nombre de las superfamilias no ha sido asignado, pero existen 5 familias distintas. **Las conopresinas** tienen un arreglo de cisteínas C-C, e inducen en ratones un efecto de acicalamiento; estos péptidos son análogos de la vasopresina/oxitocina, aunque no se sabe cuál es la función de las conopresinas en el veneno de los *Conus* (Gray *et al.*, 1988). **Los contrifanos** tienen un arreglo de cisteínas C-C y causan contracción en la cola de ratones; se ha propuesto que el contrifano de *C. ventricosus* (contrifano-Vn) modula canales de potasio dependientes de calcio (Massilia *et al.*, 2003), mientras que el contrifano de *C. marmoreus* (contrifano-Mr) bloquea canales de calcio tipo L (Hansson *et al.*, 2004), aunque el blanco molecular de otros contrifanos no ha sido identificado. Los contrifanos contienen un alto contenido de modificaciones postraduccionales (Pallaghy *et al.*, 1999). **Las conantokinas** fueron detectadas por primera vez en el veneno de *Conus geographus*. La conantokina-G (GV) mejor conocida como “sleeper” es un péptido que contiene 17 aminoácidos y no tiene residuos de cisteína en su estructura primaria (McIntosh *et al.*, 1984; Olivera *et al.*, 1985; Mena *et al.*, 1990). Se ha demostrado que tienen como blanco los receptores NMDA (Myers *et al.*, 1990). Uno de los descubrimientos importantes es que la respuesta de los ratones a la inyección es dependiente de la edad; en ratones pequeños de aproximadamente dos semanas de nacidos se induce un estado de adormecimiento, mientras que en ratones mayores se presenta un estado hiperactivo (Gray *et al.*, 1988). Existen otras conantokinas que se han caracterizado de los venenos de diferentes especies: la conantokina-T extraída del veneno de *C. tulipa* (Haack *et al.*, 1990), la conantokina-L extraída de *C. lynceus* (Jiménez *et al.*, 2002) y la conantokina-R extraída de *C. radiatus* (White *et al.*, 2000). **Las conorfamidas** pertenecen a la familia FMRFamida de los neuropéptidos (Maillo *et al.*, 2002). **Las contulakinas son** el primer ejemplo de péptidos de la familia de las neurotensinas que no provienen de un vertebrado, este péptido fue purificado del caracol *Conus geographus* y se le llamó Contulakin-G (Craig *et al.*, 1999).



1.12. Modificaciones postraduccionales

Una de las características más sorprendentes de los péptidos de *Conus* es la alta frecuencia de modificaciones postraduccionales observadas (Tabla 2). Las familias de *Conus* que no tienen múltiples puentes disulfuro están extensamente modificadas postraduccionalmente; en algunos casos las modificaciones son esenciales para darle la conformación biológicamente activa (Olivera *et al.*, 2002). Los polipéptidos codificados por los genes están formados por los 20 aminoácidos comunes que se traducen utilizando el código genético. Sin embargo, muchos de estos aminoácidos pueden ser posteriormente modificados postraduccionalmente para generar un grupo de aminoácidos adicionales que contribuyen a la función de la proteína madura. La diversidad de las modificaciones encontrada en la conotoxinas es una consecuencia de la selección natural para crear toxinas más potentes y efectivas. La distribución de las modificaciones postraduccionales encontradas en los diferentes grupos de péptidos de *Conus* no es uniforme, mientras que algunos péptidos tienden a no tener modificaciones postraduccionales otros están altamente modificados (Buczek *et al.*, 2005).

Tabla 2. Aminoácidos modificados postraduccionalmente en los péptidos de *Conus*.
(Buczek *et al.*, 2005; Olivera *et al.*, 2002).

Modificación	Aminoácido modificado	Enzima	Aminoácido resultante
--------------	-----------------------	--------	-----------------------



Hidroxilación	<ul style="list-style-type: none">• Prolina• Valina• Lisina	<ul style="list-style-type: none">• Prolina hidroxilasa• D-aminoácido hidroxilasa• Lisil hidroxilasa	<ul style="list-style-type: none">• hidroxiprolina• hidroxivalina• hidroxilisina
Carboxilación	<ul style="list-style-type: none">• Ácido Glutámico	<ul style="list-style-type: none">• γ-Glutamylcarboxilasa	<ul style="list-style-type: none">• carboxiglutamato
Bromación	<ul style="list-style-type: none">• Triptofano	<ul style="list-style-type: none">• Bromoperoxidasa	<ul style="list-style-type: none">• bromotriptofano
Epimerización	<ul style="list-style-type: none">• Triptofano• Fenilalanina• Leucina• Valina	<ul style="list-style-type: none">• Epimerasa	<ul style="list-style-type: none">• D-triptofano• D-fenilalanina• D-leucina• D-valina
Ciclización	<ul style="list-style-type: none">• Glutamina	<ul style="list-style-type: none">• Glutamyl ciclasa	<ul style="list-style-type: none">• piroglutamato
Sulfatación	<ul style="list-style-type: none">• Tirosina	<ul style="list-style-type: none">• Tiroilsulfotransferasa	<ul style="list-style-type: none">• sulfotirosina
O-Glicosilación	<ul style="list-style-type: none">• Serina• Treonina	<ul style="list-style-type: none">• Polipéptido HexNac transferasa	<ul style="list-style-type: none">• serina glicosilada• treonina glicosilada
Procesamiento proteolítico		<ul style="list-style-type: none">• Carboxipeptidasa Tex31	
Formación de puentes disulfuro		<ul style="list-style-type: none">• Proteína de <i>Conus</i> disulfuro isomerasa	
Amidación del extremo carboxilo		<ul style="list-style-type: none">• Proteína de amidación mono oxigenasa	

1.13. Nomenclatura de los péptidos de *Conus*



Con la finalidad de unificar un criterio de clasificación y sistematización de los péptidos de *Conus* se propuso el siguiente sistema de nomenclatura (Cruz *et al.*, 1985). Algunas modificaciones se introdujeron algunos años después (Gray *et al.*, 1988).

Las conotoxinas con actividad conocida se nombran de la manera siguiente:

Se asigna una letra griega para designar su acción farmacológica, seguida por un guión antes de la palabra conotoxina; posteriormente se asignan una o dos letras mayúsculas para indicar la especie de cono de la que se esté hablando, un número romano para indicar el patrón de Cys del péptido, y finalmente una letra mayúscula para indicar la variante específica del péptido. Por ejemplo, en la ω -GVIA de *C. geographus*, la " ω " indica que bloquea los canales de calcio, la "G" indica en nombre de la especie, el número VI indica el patrón de Cys y la "A" indica la variante del péptido..

Las conotoxinas con actividad desconocida se nombran de la manera siguiente:

Se asignan letras minúsculas para distinguir a la especie de la que se esté hablando, un número arábigo para designar el patrón de Cys y una letra minúscula para indicar una variante en particular, por ejemplo en la conotoxina tx5a de *C. textile*, las letras tx indican la especie, el "5" el patrón de Cys y la letra "a" indica la variante del péptido.

El clon correspondiente de tx5a está designado como Tx5.2, con el nombre de la especie comenzando con mayúscula seguido por un número arábigo para designar el patrón de Cys y un número después del punto para designar la variante del clon. Si se comprueba que la acción del péptido es sobre los canales de calcio el nombre cambiará a τ -conotoxina TxVA.

Nota:

Los patrones de Cys están designados por números y los modos de acción están indicados principalmente por letras griegas. Para péptidos con el mismo modo de acción pero con diferente estructura disulfuro, la letra griega es seguida por una letra mayúscula (superfamilia). Los péptidos con los mismos patrones de Cys y modos de acción son diferenciados con letras mayúsculas.



Los conopéptidos, que tienen uno o ningún puente disulfuro, se nombran en forma distinta; son menos diversos y se encuentran en muy pocas especies. A estos cono péptidos se les asigna un nombre seguido por un guión y finalmente una o dos letras (conopresina-S, contrifano-R y contulakina-G, de *C. striatus*, *C. radiatus* y *C. geographus*, respectivamente). Los polipéptidos más grandes, con más de 70 a.a., se designan de manera similar (ejemplo: conodipina-M).

1.14. Generalidades de moluscos

Los moluscos son unos de los invertebrados más conocidos y sus conchas han sido muy populares desde tiempos antiguos; algunas culturas han utilizado sus conchas como herramientas, contenedores, instrumentos musicales, dinero, decoración, etc. Hoy en día los países con litoral costero cosechan y comercian con millones de toneladas de especies de



moluscos para la alimentación (Meiglitsch, 1972; Brusca y Brusca, 1990). Las formas más conocidas son las almejas, las ostras, los calamares, los pulpos y los caracoles (Ruppert, 1969). Los moluscos constituyen uno de los Phyla más diversos ya que existen más de 93,000 especies vivas descritas de moluscos y 70,000 de especies fósiles (Brusca y Brusca, 1990). Los moluscos son organismos muy antiguos, los grupos principales se establecieron antes del Cámbrico. Se encuentran en la zona abisal del océano y por encima de la línea de la marea, son comunes en aguas dulces y algunas se han adaptado bien a la vida terrestre (Meiglitsch, 1972).

Los moluscos son protostomados celomados con simetría bilateral; la principal cavidad del cuerpo es denominada hemocele; su sistema circulatorio es abierto. En general se distinguen tres regiones distintas: la cabeza, pie y la masa visceral. La cabeza está compuesta de varias estructuras sensoriales que son: ojos, estatocistos y tentáculos. El cuerpo está cubierto por una delgada capa epidermis-cutícula (piel); esta capa secreta un esqueleto calcáreo llamado concha. Rodeando a la masa visceral se forma una cavidad también conocida como cavidad del palium, esta cavidad aloja a las branquias, así como los aparatos digestivo y reproductor, y algunas partes del epitelio sensorial llamado osphradium; en las formas acuáticas, el agua circula a través de esta cavidad, pasando sobre las branquias, poros excretores, ano y otras estructuras. El pie es una estructura muscular de función locomotora y adherente. El sistema digestivo es completo y regionalmente especializado. La región bucal contiene una estructura específica de los moluscos llamada rádula utilizada para la alimentación. El sistema circulatorio es abierto y usualmente contiene un corazón que se aloja en la cavidad pericárdica y algunos vasos largos que llenan e irrigan el espacio del hemocele. El sistema excretor consiste en uno o más pares de metanefridios (riñones) con nefrostomas en la cavidad pericardial. El sistema nervioso típicamente incluye un ganglio dorsal cerval, y un nervio circunmétrico en forma de anillo, dos pares de cordones nerviosos longitudinales, y algunos pares de ganglios que muestran varios grados de fusión. La fertilización puede ser interna o externa y el desarrollo embrionario es en espiral y tiene uno o dos estadios de larvales llamados Veliger (Brusca y Brusca, 1990).

El Phylum Mollusca se encuentra dividido en 7 Clases distintas:

1. Clase Aplacophora (sin concha externa).
2. Clase Monoplacophora (conchas de una pieza).

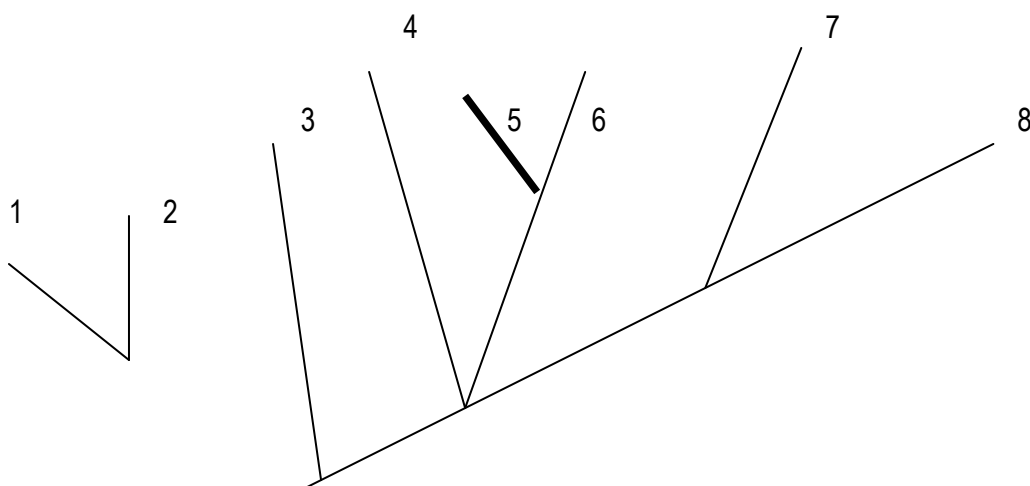


3. Clase Polyplacophora (quitones).
4. **Clase Gastropoda (caracoles).**
5. Clase Bivalvia = Pelecypoda = Lamellibranchiata (almejas)
6. Clase Scapoda (conchas en forma de colmillo).
7. Clase Cephalopoda (pulpos y calamares).

1.14.1. Evolución del Phylum

El Origen de los moluscos es incierto. Los registros fósiles nos llevan a hace 500 millones de años y sugieren que el origen probablemente comenzó en el precámbrico. A través de los años se han propuesto numerosas ideas acerca del origen de los moluscos; generalmente se habla de tres distintas categorías: a) los moluscos fueron originados por un ancestral gusano plano; b) un ancestro protostomado celomado no segmentado; c) o un ancestro segmentado, probablemente un ancestro común a los anélidos. La primera hipótesis conocida como la teoría de los turbelarios está basada en la homología y similitud del tipo de locomoción entre los moluscos y los gusanos planos. Esto sugiere que los moluscos fueron los primeros celomados protostomados o que ellos comparten un ancestro con los primeros celomados. Sin embargo muchos investigadores contemporáneos dicen que el los grandes espacios del pericardio presentes en los moluscos primitivos se deben a un ancestro celomado en lugar de un acelomado (turbelarios).

La segunda teoría está basada en estudios ontogenéticos y sugiere que los sipuncúlidos y moluscos son grupos hermanos. La tercera hipótesis en donde se relaciona a los anélidos con los moluscos implica que los moluscos fueron celomados segmentados primitivos. Esta hipótesis ha recibido sustento de las secuencias genéticas de DNA 18S ribosomal. A continuación se muestra un cladograma que muestra la filogenia de los moluscos (Brusca y Brusca, 1990).





-
1. Chaetodermomorpha } aplacophora
2. Neomeniomorpha }
3. Polyplacophora
4. Monoplacophora
5. Gastropoda
6. Cephalopoda
7. Bivalvia
8. Scaphopoda

1.14.2. Clase Gastropoda

Los gasterópodos (gastero = estómago; podo = pie) son probablemente el grupo de moluscos más conocido. Comprenden cerca de 70,000 especies vivientes, terrestres y marinas de caracoles y babosas (Brusca y Brusca, 1990). Esta clase incluye los caracoles comunes y babosas de todos los ambientes marinos, agua dulce y terrestres. Son los únicos moluscos que presentan torsión de su cuerpo (Brusca y Brusca, 1990). Presentan área cefálica (cabeza), un pie musculoso ventral y una concha dorsal (que puede reducirse o hasta perderse en los gasterópodos más evolucionados); en algunos casos las conchas han desaparecido (las babosas). Son organismos herbívoros (macrófagos) aunque hay algunos carnívoros e incluso carroñeros. La cavidad del manto se sitúa en la región anterior (encima de la cabeza) porque en su desarrollo sufren un proceso de torsión. Como consecuencia se pierden el osfradio de la derecha y la branquia (prosobranquios) para que el ano no ensucie las estructuras sensoriales.



Otros pierden ambas branquias (opistobranquios) con lo cual respiran por unas branquias tegumentarias que hay en la parte posterior del cuerpo; son asimétricos por el proceso de torsión y destorsión; su sistema nervioso es muy evolucionado; pueden ser dioicos o hermafroditas; en cualquier caso solo poseen una gónada (cuando es hermafrodita se llama ovotestis), la fecundación es interna ya que aparece un órgano copulador; desarrollo directo en los terrestres y dulceacuícolas (Meiglitsch, 1972).

La clase está dividida en cuatro subclases:

- Protogastropoda son todos gasterópodos extintos, no muestran evidencia de torsión, con la cavidad del manto posterior, conchas de forma cónica (espirales planas o espirales cónicas).
- **Prosobranchia (caracoles marinos con conchas grandes) son todos los gasterópodos con torsión en el cuerpo; las branquias, ano, y cavidad del manto se encuentran en la parte anterior. La mayoría de los gasterópodos pertenecen a esta subclase.**
- Opisthobranchia (babosas marinas) son gasterópodos marinos, altamente desarrollados, tienen una alta tendencia a la reducción de la concha, el sistema nervioso no está torcido y es relativamente centralizado; han regresado a tener simetría bilateral.
- Pulmonata (caracoles terrestres y babosas) predominantemente terrestres y de agua dulce; la cavidad del manto se ha modificado como un saco respiratorio utilizado para el aire o para la respiración subacuática; en algunos casos carecen de concha; son hermafroditas sin pasar por estadios larvarios.

1.14.2.1. Concha

Una de las características externas más obvias de los gasterópodos es su concha (Fig. 6), usualmente enrollada y con colores hermosos. La concha es extremadamente variable en tamaño y forma. Las miles de especies pueden ser identificadas por las características de su concha. La formación de la concha comienza en el estadio larval. Primero es una capa simple que posteriormente forma una espiral plana que gradualmente cambia a una espiral cónica. La concha provee protección al organismo pero al mismo tiempo le agrega peso, es por eso que en



algunos casos la tendencia es la pérdida o reducción de la concha que a su vez está relacionada con la pérdida de torsión del organismo (Meiglitsch, 1972; Brusca y Brusca, 1990).

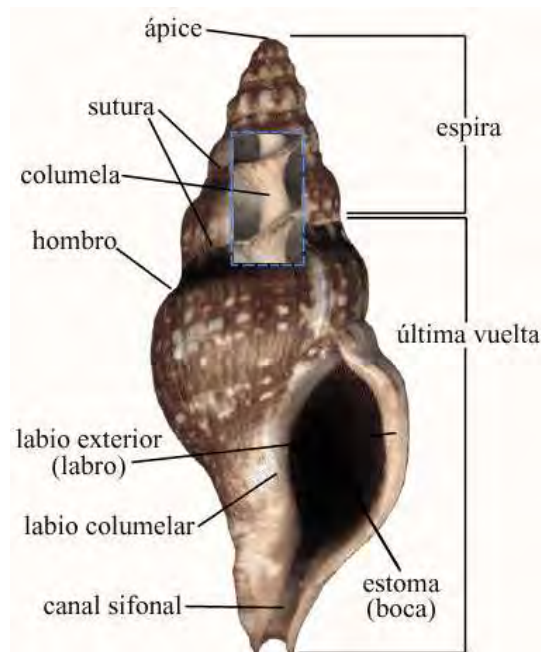


Fig. 6. Concha de un gasterópodo y las partes que la conforman

Imagen: <http://perso.wanadoo.es/malakos/graficos/biologia/gastro.gif>

1.14.2.2. Cabeza

La cabeza está generalmente bien desarrollada, la boca es más o menos terminal y casi todos los gasterópodos tienen un par de tentáculos primitivos que tienen ojos cerca de la base de los mismos. Los tentáculos son importantes como quimiorreceptores (Meiglitsch, 1972).

Los pies son un órgano ventral que se arrastra y permanece en su forma primitiva. Una función importante de los pies es la secreción; una gran cantidad de glándulas mucosas provee de suficiente moco para la lubricación. El moco producido tiene diferentes características endureciéndose al contacto con el aire o agua (Meiglitsch, 1972).

Los pies de los gasterópodos poseen un conjunto de músculos pedales retractores, que se adhieren a la concha y al manto dorsal en distintos ángulos y actúan en armonía para levantar y bajar la base del pie o para acortarse ya sea en dirección longitudinal o transversal. Las ondas



de contracción hacen que el organismo se mueva de atrás hacia delante (ondas directas) o de adelante hacia atrás (ondas retrógradas). Los movimientos musculares rítmicos son producidos para impulsar a los caracoles, pero en algunas especies los movimientos de los pies son más altamente organizados (Brusca y Brusca, 1990).

La pared del cuerpo comprende tres capas: cutícula, epidermis y músculos, está compuesta por una proteína llamada conchina. La cavidad del manto es una capa que forma la pared dorsal del cuerpo; las células que se encuentran en la pared dorsal del cuerpo o manto, constituyen las glándulas productoras de la concha de los moluscos, algunas otras son células sensitivas (Meiglitsch, 1972).

1.14.2.3. Alimentación

La radiación adaptativa de los gasterópodos ha resultado en una variedad de hábitos de alimentación y el tracto digestivo ha sido modificado dependiendo de los hábitos de alimentación y del modo en que obtienen la comida, así que el sistema digestivo es uno de los más variables en gasterópodos (Meiglitsch, 1972). Los moluscos poseen aparato digestivo completo, boca, cavidad bucal (en donde se encuentra el aparato radular), esófago, estómago, intestino y ano; algunas glándulas están asociadas a la parte anterior del aparato digestivo incluyendo algunas que producen enzimas y otras que secretan lubricante sobre la rádula, llamadas glándulas salivales (Brusca y Brusca, 1990).

La gran mayoría de gasterópodos son micrófagos, algunos raspan o cepillan la superficie de las rocas, algas o animales sésiles y objetos similares, pero algunos otros gasterópodos se alimentan del detritus y otros son carroñeros. En este tipo de organismos la rádula es el principal aparato de alimentación. La forma de la rádula varía también dependiendo de la alimentación. Un número considerable de gasterópodos se alimentan de presas más grandes pero siguen siendo micrófagos. Existe un gran número de gasterópodos que son macrófagos, los herbívoros de este tipo utilizan la rádula para cortar piezas de comida mientras que los carnívoros han convertido su aparato radular en una arma (Meiglitsch, 1972).



En términos de alimentación los gasterópodos más especializados son los caracoles del género *Conus*, en los cuales la rádula se ha reducido a una estructura aislada en forma de diente con forma de arpón que inyecta veneno. El arpón se descarga del final de una larga probóscide que puede lanzarse rápidamente para capturar a la presa, usualmente peces, gusanos o uno que otro gasterópodo, que es jalado hasta el sistema digestivo. El veneno se inyecta a través del diente radular, que es hueco, por contracción de una glándula de veneno (Brusca y Brusca, 1990). Los venenos de los *Conus* son muy poderosos, tan así es que algunas especies son capaces de causar la muerte de humanos (Meiglitsch, 1972).

1.14.2.4. Sistema circulatorio

La cavidad del cuerpo es un espacio circulatorio abierto o hemocele, en donde se encuentran las branquias (los prosobranquios respiran a través de una sola branquia) y algunos vasos sanguíneos en donde se lleva acabo el intercambio gaseoso. La sangre de los moluscos contiene varios tipos de células incluyendo amebocitos, y se le llama hemolinfa. Y es responsable de acarrear los productos de la digestión de los sitios de absorción al resto del cuerpo. El corazón se localiza dorsalmente dentro de la cámara pericárdica y está comprendida por un par de atrios (algunas veces llamados aurículas) y un simple ventrículo (Brusca y Brusca, 1990).

1.14.2.5. Estructuras de excreción.

Las estructuras básicas de excreción son un par de metanefridios (normalmente llamados riñones); el nefrostoma se abre al celoma pericardial via el ducto renopericardio, y el nefridioporo descarga en la cavidad del manto que usualmente se encuentra cerca del ano (Brusca y Brusca, 1990).

1.14.2.6. Sistema nervioso

El sistema nervioso está compuesto por tres pares de ganglios cerca del esófago. Los ganglios cerebrales se encuentran por encima del esófago, los ganglios pedales se encuentran anteriores a la línea media de los pies y los ganglios pleurales están localizados más lateralmente. Todos los ganglios están conectados formando un triángulo neural de cada lado. Un par de ganglios



bucales están unidos a los ganglios cerebrales. Un par de cordones nerviosos surgen de los ganglios pedales y se extienden hacia los pies. Los primeros están conectados por comisuras y forman un ganglio en la unión de las comisuras y los nervios. Un par de nervios palioviscerales provienen de los ganglios pedales y se extienden hacia la región visceral. Típicamente, un ganglio parietal se encuentra en cada uno de los nervios palioviscerales, y cada nervio termina en un ganglio visceral. Las comisuras conectan a los dos ganglios cerebrales a los dos ganglios pedales y a los dos ganglios viscerales (Meiglitsch, 1972). Todos los moluscos poseen varias combinaciones de tentáculos, fotorreceptores estatocistos y osphridias, estas últimas son parches de células sensoriales localizadas en la pared del manto. La mayoría de los gasterópodos tienen un par de tentáculos cefálicos, y ojos pequeños en la base de cada uno de los tentáculos (Brusca y Brusca, 1990).

1.14.2.7. Reproducción

El aparato reproductivo de los gasterópodos consiste en una gónada que está fusionada con la masa visceral. El gonoducto se desarrolla en asociación con el nefridio derecho. En los casos en los que el nefridio derecho sigue siendo funcional transportando productos de excreción, se le llama conducto urogenital. Los gasterópodos pueden ser dioicos o hermafroditas y en cualquiera de los dos casos solo existe una gónada (Brusca y Brusca, 1990).

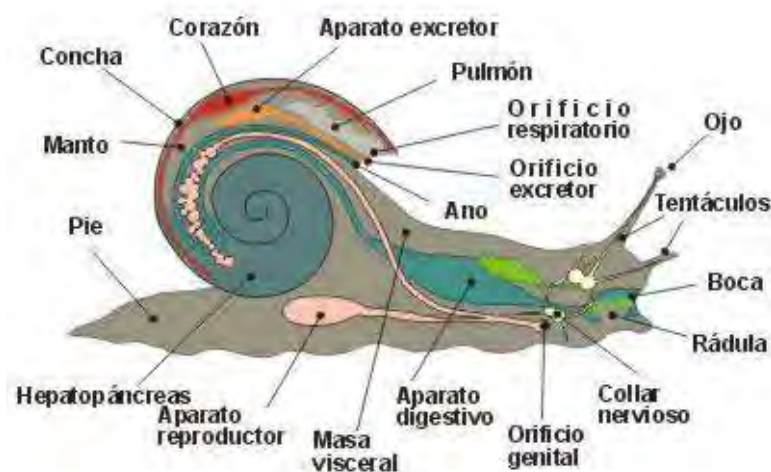




Fig. 7. Anatomía interna de de los gasterópodos.

Imagen: <http://www.aula2005.com/html/cn1eso/16invertebradosnoartropodos/caracol4catalaes.jpg>



2. ANTECEDENTES

El interés por el estudio de las toxinas de los caracoles del género *Conus* se generó al descubrir que la picadura de estos organismos causaba la muerte de seres humanos (Olivera y Cruz, 2001). Han pasado ya 39 años desde que los primeros estudios sobre estos caracoles fueron elaborados y desde entonces se han purificado y secuenciado alrededor de 230 conotoxinas y se ha determinado la secuencia de cerca de 850 conotoxinas mediante clonación (Kaas et al., 2008).

El Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM ha sido el pionero en la investigación de toxinas de especies de *Conus* de costas mexicanas. Debido a que este campo de investigación ha sido poco explorado en este país y a la importancia que tienen las toxinas de los *Conus*, el grupo de investigadores del Laboratorio de Neurofarmacología Marina en Juriquilla, Qro., se ha dado a la tarea de investigar todos y cada uno de los venenos de las diferentes especies, con la finalidad de encontrar toxinas novedosas.

De las 50 especies que se conocen en México se han estudiado tres *C. spurius*, *C. austini* y *C. delessertii*. A la fecha se han descubierto 12 diferentes toxinas provenientes de las especies antes mencionadas. A continuación se muestran las 10 toxinas descubiertas de las especies *Conus austini* y *Conus spurius* (Tabla 3).

Tabla 3. Toxinas de los caracoles *C. austini* y *C. spurius*. (* = extremo carboxilo amidado)

Especie	Toxina	Secuencia	Actividad	Referencia
<i>C. austini</i>	as7a	TCKQKGEGCSLDV γ CCSSSCKPGGPLFDFDC*	Posible, en canales de tipo marcapaso	Zugasti-Cruz et al., 2006.
	as14a as14b	GGVGRCIYNMNSGGGLNFIQCKTMCY RWDVDQCIYYCLNGVVGYSYTECQTMCT	Posible, bloqueadores de canales de K ⁺	Zugasti-Cruz et al., 2006.



Tabla 3. Toxinas de los caracoles *C. austini* y *C. spurius*. (* = extremo carboxilo amidado)

Especie	Toxina	Secuencia	Actividad	Referencia
<i>C. spurius</i>	sr5a	IINWCCLIFYQCC	¿?	Aguilar <i>et al.</i> , 2006.
	sr11a	CRTEGMSCY γ YNQ α CCWRSCCRGECEAPCRFGP*	Posible modulación de canales de K ⁺ activados por voltaje dependientes de calcio	Aguilar <i>et al.</i> , 2007.
	sr7a	CLQFGSTCFLGDDDICCSGECFYSGGTFGICS*	¿?	Luna-Ramírez <i>et al.</i> , 2007.
	Conorfamida Sr1	GPMGWVPVYRF*	¿?	Maillo <i>et al.</i> , 2002
	Conorfamida Sr2	GPM γ DOL γ IIRI*	Probable en receptores acoplados a proteínas G, a canales iónicos sensibles a ácido y a canales de Na ⁺ activados por FMRFamida	Aguilar <i>et al.</i> , 2008.
	α -SrIA	RTCCSROTCRMcYPcLCGa	Inhibe receptores de acetilcolina α 1 β 1 γ y a α 4 β 2	López-Vera <i>et al.</i> , 2007.
	α -SrIB	RTCCSROTCRMEYPcLCGa		

Los primeros trabajos realizados con el caracol *C. delessertii* se llevaron a cabo en el 2000 y 2001 por López-Vera y Meyer, respectivamente, quienes elaboraron la primera caracterización de algunos péptidos del veneno de esta especie marina; la idea era investigar varios componentes del veneno, hacer la purificación, la secuenciación y experimentos de efectos fisiológicos; sin embargo debido a la gran cantidad de componentes del veneno solo se pudieron enfocar en dos componentes (López-Vera, 2000; Meyer, 2001).



Aguilar et al., en un trabajo realizado en el 2005, describen la primera secuencia completa de aminoácidos de un péptido de *C. delessertii* (Tabla 4). Ellos encontraron que este péptido contiene algunas modificaciones postraduccionales y seis residuos de Cys dispuestos en un patrón que los define en la superfamilia-O de las conotoxinas. El péptido fue llamado “de7a” de acuerdo a la nomenclatura de las conotoxinas. Así mismo encontraron que “de7a” contiene una secuencia $-\gamma\text{CCS}-$; esta secuencia ha sido encontrada solo en γ -conotoxinas. Por lo tanto *C. delessertii* es el primer vermívoro en que se ha demostrado la posible presencia de esta clase de conotoxinas. Este descubrimiento sugiere que el péptido “de7a” puede activar canales catiónicos no específicos activados por voltaje tipo marcapasos (Aguilar *et al.*, 2005a).

En el mismo año este grupo de científicos publicó otro artículo en donde describe la purificación y caracterización bioquímica del péptido de13a (Tabla 4) del veneno del caracol *C. delessertii*. Este péptido contiene dos residuos de 5-hidroxisina, Hyl. Esta modificación no había sido previamente descrita en conotoxinas; también, tiene ocho residuos de cisteína con arreglo C-C-C-CC-C-C-C, desconocido anteriormente en las conotoxinas; además contiene una proporción inusualmente alta de cadenas de aminoácidos hidroxilados. Por lo tanto este péptido es, posiblemente, el primer ejemplo de una superfamilia de conotoxinas nueva, y la primera reportada con Hyl (Aguilar *et al.*, 2005b).



3. JUSTIFICACIÓN

Debido al descubrimiento de que las toxinas de *Conus* tienen propiedades que han resultado prometedoras para el tratamiento de distintas enfermedades, tales como la epilepsia, el cáncer, etc., así como en el estudio de la función de distintos canales iónicos y receptores, se ha hecho mucho más interesante la investigación sobre estas toxinas. La razón primordial para hacer estudios sobre estas toxinas radica en que las especies mexicanas constituyen un campo no explorado. De las 50 especies de *Conus* que se conocen en México solo se tienen estudios publicados de 12 toxinas de tres especies distintas, dos de las cuales pertenecen al veneno de la especie *C. delessertii*. Teniendo en cuenta que existen aproximadamente 50000 toxinas en todo el género (considerando 500 especies y 100 toxinas por especie) y que de ese número solo se han descubierto 1000 aproximadamente incluyendo especies mexicanas, tenemos que solo se ha descubierto el 2% del total de las toxinas existentes, y solo el 0.24% de las toxinas de especies mexicanas. Es preciso resaltar que hace falta caracterizar aproximadamente el 98% de las toxinas de todo el género y casi la totalidad de las toxinas de especies mexicanas. Como se puede observar queda mucho por hacer en el campo de la caracterización de toxinas de *Conus* a nivel mundial y particularmente en México. Por esta razón y por la importancia que tienen estos péptidos es necesario que esta labor sea perseguida y lograda con la finalidad de encontrar conotoxinas novedosas. Por lo tanto es muy importante caracterizar químicamente las conotoxinas para poder estudiar los efectos fisiológicos, además de establecer similitudes y diferencias que se encuentren en los diferentes componentes de los venenos, para facilitar el entendimiento de los mecanismos de depredación y defensa que estos organismos han desarrollado a través de la evolución. Asimismo es importante continuar el estudio de los componentes de los venenos ya que estos podrían ser prospectos potenciales en estudios farmacológicos y de investigación básica en biología molecular.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

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

4.2 Objetivos particulares:

- Purificar algunos péptidos del extracto crudo del conducto venenoso.
- Determinar la masa molecular de los péptidos.
- Determinar la estructura primaria de los péptidos.



5. METODOLOGÍA

Los caracoles de la especie *Conus delessertii* fueron colectados en el Mar Caribe (Isla Mujeres) a través de barcos camaroneros. Una vez capturados se mantuvieron congelados a -20°C hasta su llegada al Laboratorio de Neurofarmacología Marina en el Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los organismos fueron almacenados a -70°C hasta ser utilizados.

Para poder obtener el aparato del veneno del caracol se requiere que el animal esté separado de la concha. En primer lugar los organismos fueron descongelados; posteriormente los cuerpos de 10 organismos de *C. delessertii* fueron centrifugados a $1,430\text{ g}$ durante 15 minutos a 4°C , con la finalidad de separar el cuerpo de la concha del caracol. Una vez que se realizó la separación el cuerpo del organismo fue congelado a -70°C .

5.1. Obtención del extracto crudo

Con la finalidad de obtener el veneno se realizó la disección del bulbo venenoso que fue congelado a -70°C y del conducto venenoso de donde se extrajo el veneno con 10.76 ml de solución de extracción de acetonitrilo (ACN) al 40% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5%. Los conductos venenosos fueron homogeneizados (Potter-Elvehjem, vidrio/vidrio) y posteriormente centrifugados a $11,130\text{ g}$ durante 15 minutos en un cuarto frío a 4°C . El sobrenadante se separó del tejido obteniendo así el extracto crudo del veneno.

Se realizó una cuantificación de proteínas totales con el método de Lowry y se obtuvieron 19.3 mg ; una vez cuantificadas las proteínas totales se procedió a separar y purificar los componentes del veneno del extracto crudo, con una mezcla de solución de TFA al 0.1% (Solución A) y de una solución de TFA al 0.085% con ACN al 90% (Solución B).

5.2. Purificación de los péptidos



Los péptidos se separaron mediante cromatografía de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés), con una columna semipreparativa C18 (10 x 250 mm, partículas de 5 μm , poros de 300 Å; Vydac, 218TP510). Los péptidos se eluyeron a temperatura ambiente con un gradiente de 5% a 100% de solución B en 95 minutos, con un incremento de B de 1% por minuto y un flujo de 2.5 ml por minuto. Se inyectaron 5 ml. La detección se realizó con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm de longitud de onda. La colecta de los péptidos se realizó de manera manual en tubos Eppendorf de 1.5 ml, y se obtuvieron 10.75 ml. Los péptidos fueron llevados a sequedad mediante un evaporador centrífugo.

Del cromatograma que surgió de la primera purificación se eligieron las zonas A y B para posterior purificación (Fig. 9). Los péptidos pertenecientes a cada uno de estas zonas fueron disueltos con 200 μl de solución B y 100 μl de una mezcla de TFA: agua 1:1. Posteriormente se centrifugaron a 13,063 g durante 15 minutos; el sobrenadante se utilizó como material para la inyección. En todos los casos se utilizó RP-HPLC con columnas analíticas C18 (Vydac, 218TP54), C8 (Vydac, 208TP54) o C4 (Phase Separations, PSL847307); los péptidos fueron eluidos a temperatura ambiente y la detección se realizó con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm. La colecta de los péptidos se realizó de manera manual en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Para la repurificación de los péptidos se elaboraron diferentes programas (Tabla 5), con la intención de optimizar la separación de los péptidos, ya que las toxinas tienen diferente grado de hidrofobicidad y requieren de diferentes condiciones de gradiente para su separación. Además, se varió también la fase estacionaria (C18, C8 o C4), con el mismo fin.

Tabla 5. Programas utilizados en la purificación de los péptidos.

	Columna	Gradiente	Isocrático	Incremento de B	Flujo	Inyección
P1	Analítica C18	25% a 45% de solución B en 40 minutos	10 min	0.5 %/min	1 ml/min	2.5 ml



P2	Analítica C8	20 % a 50 % de solución B en 60 minutos	--	0.5%/min	1 ml/min	1 ml
P2'	Analítica C8	28% a 42% de solución B en 70 minutos	10 min	0.2%/min	1 ml/min	1 ml
P3	Analítica C4	0 % a 60 % de B en 60 minutos	5 min	1%/min	1 ml/min	1 ml
P4	Analítica C4	20 % a 40 % de B en 80 minutos	5 min	0.25%/min	1 ml/min	1 ml
P5	Analítica C18	35 % A 70 % de B en 105 minutos	10 min	0.3%/min	1ml/min	5 ml
P6	Analítica C8	34 % a 51 % de B en 51 minutos	5 min	0.3 %/min	1 ml/min	1 ml
P6'	Analítica C8	40% a 74% de B en 102 minutos	5 min	0.3%/min	1 ml/min	1 ml

5.3. Determinación de la estructura primaria

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos purificados se obtuvieron mediante un secuenciador automático de proteínas bajo el principio de degradación de Edman (Procise 491 Proteín Sequencing System, Applied Biosystems, Foster City CA). La secuenciación automatizada utiliza, entre otros, el reactivo de Edman, fenilisotiocianato (PITC); la reacción libera, en cada ciclo, el aminoácido amino-terminal como un derivado de la feniltiohidantoína (PTH), el cual se identifica mediante RP-HPLC por su tiempo de retención, y deja el péptido con un residuo menos en el extremo amino; el proceso de **acoplamiento** (reacción del PITC con el grupo amino del residuo N-terminal), **corte** (ruptura del enlace peptídico entre el residuo N-terminal modificado con PITC y el siguiente, con formación de la anilintiazolinona (ATZ) del residuo N-terminal liberado), e **identificación** (extracción de la ATZ y su conversión a PTH, e identificación cromatográfica de ésta) se repite el número de veces deseado. La experiencia ha demostrado que, en general, es posible identificar 50 residuos partiendo de una muestra pura en buena cantidad (por ejemplo, 200 picomoles). Normalmente, se vigila el proceso de secuenciación cada 2 ciclos (1.5 h) y se detiene cuando ningún PTH aumenta en cuatro ciclos consecutivos, o cuando varios PTHs aumentan en proporción similar en varios ciclos seguidos, lo cual impide la interpretación de los resultados. En la Tabla 6 se muestran las cantidades utilizadas para la determinación de la estructura primaria.



5.4. Determinación de la masa molecular

Para conocer la masa molecular de los péptidos, éstos se analizaron mediante espectrometría de masas en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por el Dr. César Batista.

Los espectros de iones positivos de las muestras se obtuvieron utilizando dos diferentes técnicas de espectrometría de masas: MALDI (matrix-assisted, laser-desorption ionization) y ESI (electrospray ionization). Ambas técnicas son altamente utilizadas en el análisis de proteínas y péptidos teniendo en común que ambas transfieren las proteínas o péptidos intactos a la fase gaseosa sin fragmentarlos. La diferencia entre ambas técnicas radica principalmente en que en MALDI un láser evapora una matriz en donde se encuentra la muestra; una vez que el láser toca la matriz la energía transforma a la matriz a la fase gaseosa ionizando las moléculas. Por otro lado ESI es una técnica en donde la muestra se encuentra en fase líquida. La muestra se convierte en aerosol por el sistema y las gotitas resultantes salen ionizadas, hasta que finalmente forman la fase gaseosa. Otra de las diferencias radica en que MALDI produce iones con carga de +1, en cambio ESI produce varios iones con distintas cargas. Eso significa que los espectros de ESI son mucho más complejos que los de MALDI. ESI es recomendada para moléculas de hasta 200,000 Daltons (Da) y MALDI es recomendada para moléculas de hasta 500,000 Da. A pesar de sus diferencias ambas técnicas son útiles en el análisis de masas de péptidos y proteínas y la decisión de utilizar una técnica o la otra depende del criterio del investigador (Hoffman y Stroobant, 2007).

En el caso de las muestras analizadas por MALDI se empleó un equipo Tetan MALDI-Tof/Pro de Amersham Biosciences, utilizando ácido 4- α -hidroxicinámico en modo reflectrón.

En el caso de las muestras analizadas por ESI se empleó un equipo ESI-IT LCQ de ThermoElectron, equipado con una fuente de nanorocío. El flujo inicial de 10 μ l/min fue reducido a 500 nl/min mediante un divisor de flujo (20x1) localizado antes del sistema de ionización. El voltaje para ionización fue de 1.7 kV y la temperatura del capilar se mantuvo en 130°C. En la Tabla 6 se muestran las cantidades utilizadas para la determinación de la masa molecular.



Tabla 6. Cantidades utilizadas para la determinación de la masa molecular. A= Volumen total en μl de cada uno de los picos, B= picomoles totales, C= volumen utilizado en la determinación de la estructura primaria en μl , D= volumen utilizado en la determinación del peso molecular en μl , E= picomoles utilizados en la determinación de la estructura primaria y F= picomoles utilizados en la determinación del peso molecular.

Pico	A	B	C	D	E	F
laaaa	60	175	12	24	35	70
lba	100	112	45	55	50	61
llaaaa	60	217	12	33	43	119
llba	100	165	15	85	24	140
llca	100	106	40	60	42	63
llllaaaa	60	798	3	6	39	80
Vlaaa	100	114	45	55	51	62
Ba	100	535	10	47	53	251
Bba	100	4000	5	10	200	400
Bca	100	183	30	70	54	183
Bcc	100	226	20	80	45	226
Bcc	100	257	25	75	64	257
Bda	100	392	5	64	19	392



6. RESULTADOS

La purificación de los péptidos del veneno de *C. delessertii* se realizó mediante varios pasos de HPLC de fase reversa, y su caracterización estructural se llevó a cabo por medio de secuenciación de Edman automática y espectrometría de masas mediante los métodos de MALDI y ESI.

Antes de presentar los resultados, cabe mencionar que durante la secuenciación de Edman de una proteína o péptido puros, en una posición dada, siempre se observa una pequeña proporción del residuo identificado en el ciclo anterior; esto se debe a que las reacciones de la degradación, inclusive en un secuenciador automático, no tienen un rendimiento del 100%; este fenómeno es mayor con los residuos de Pro (e hidroxipro), ya que el rendimiento del paso de **corte** (ver tres páginas antes) es menor que en el caso de los demás aminoácidos. Por otras razones conocidas (por ejemplo, pureza de los reactivos) y desconocidas, este fenómeno (llamado aquí “retraso”) puede presentarse con residuos distintos de Pro e hidroxipro. Además, puede darse el caso de que el PTH del residuo anterior vuelva a aumentar en el ciclo siguiente (y en los subsecuentes), lo cual puede complicar la interpretación de la secuencia; sin embargo, el percatarse de que este fenómeno se está presentando puede ayudar a evitar errores en la interpretación del resultado de la secuenciación. Como ejemplo de este fenómeno, se presenta enseguida el resultado detallado de la secuenciación del primer péptido “laaaa” (Fig. 8) caracterizado en este trabajo (el cual también se muestra más adelante de manera simplificada); por cuestión de espacio, en los casos de los demás péptidos se omite la descripción detallada y solo se muestran los residuos del péptido mayoritario (en el primer renglón) y los provenientes de péptidos contaminantes minoritarios (en los renglones siguientes, sin intentar detectar y mostrar el fenómeno de “retraso”). En el ejemplo que sigue y en los casos de los otros péptidos, los contaminantes observados en cada posición han sido ordenados de mayor a menor abundancia en renglones consecutivos; sin embargo, esto solo se hizo en los casos donde se observó una proporción significativa (>5% del péptido mayoritario) de secuencias contaminantes. Afortunadamente, debido a los varios pasos de purificación empleados, la diferencia en abundancia (más de 20 veces, excepto en el caso del péptido IVaaa) entre el péptido mayoritario



y los contaminantes minoritarios fue suficiente para la identificación sin ambigüedad de los residuos mostrados para cada uno de los péptidos.

Posición ->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
laaaa	M	P	C	F	M	G	S	C	E	G	H	C	C	C	V	S	P	N	X
		N	D			D	Y	T	Q	E	G	H	C	C	C	V	S	P	N
						N			P	V	E	G	H	C	C	C	V	S	P
						V			L	N	V	V	V	H	C	C	C	V	
						A			D	A				T	H	C	C	C	V
						P			N					P	F	O	H		
									A					M		Y	N		
																	Q		

También cabe mencionar que a veces se observan pequeños aumentos inesperados de varios aminoácidos en el mismo ciclo, los cuales son debidos a variaciones impredecibles del secuenciador automático; entre estas variaciones se encuentra el volumen en que queda disuelto el PTH-aminoácido antes de la inyección en el cromatógrafo de alta eficiencia acoplado al módulo de la degradación de Edman. Si no se está consciente de este fenómeno, estos pequeños aumentos podrían interpretarse erróneamente como contaminantes. En teoría, si en una muestra hubiera tres péptidos cuyas secuencias no coincidan en ninguna posición, deberían observarse aumentos de tres PTH-aminoácidos en cada ciclo, a menos que alguno(s) de los péptidos contengan Cys en esa posición; normalmente no es posible detectar los residuos de Cys si no han sido modificados con algún agente alquilante (como ácido yodoacético o 4-vinilpiridina, por ejemplo).

Finalmente, en el primer ciclo de la degradación de Edman es común detectar pequeñas cantidades de la mayoría de los aminoácidos, los cuales se encuentran como contaminantes en forma libre y no como parte de otros péptidos; por este motivo en los resultados en la primera posición solo se muestra el aminoácido que es claramente el mayoritario, o en su defecto, cuando no fue posible decidir cuál es el mayoritario, y por lo tanto identificar el residuo N-terminal, se indica con una X.

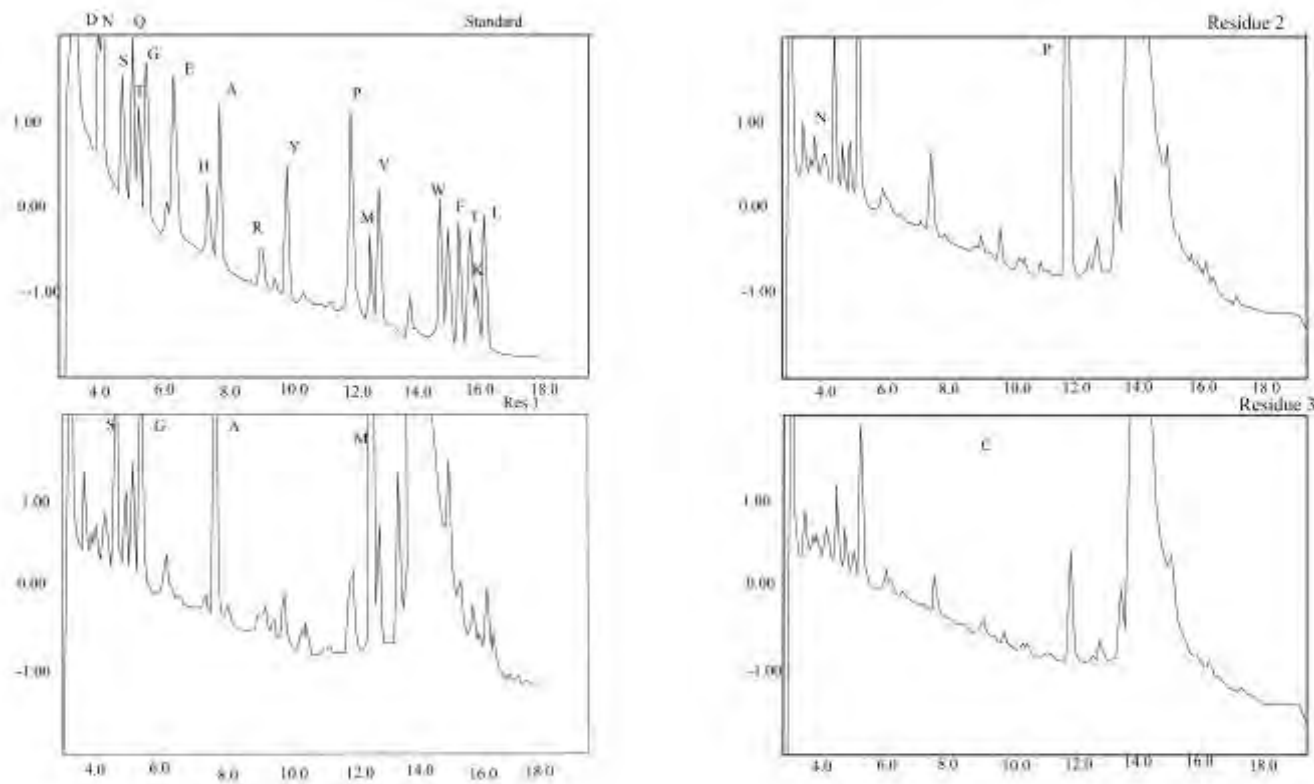


Fig. 8. Cromatogramas de la secuenciación de Edman del péptido laaaa. Estándar de PTH-aminoácidos y residuos del 1 al 3.

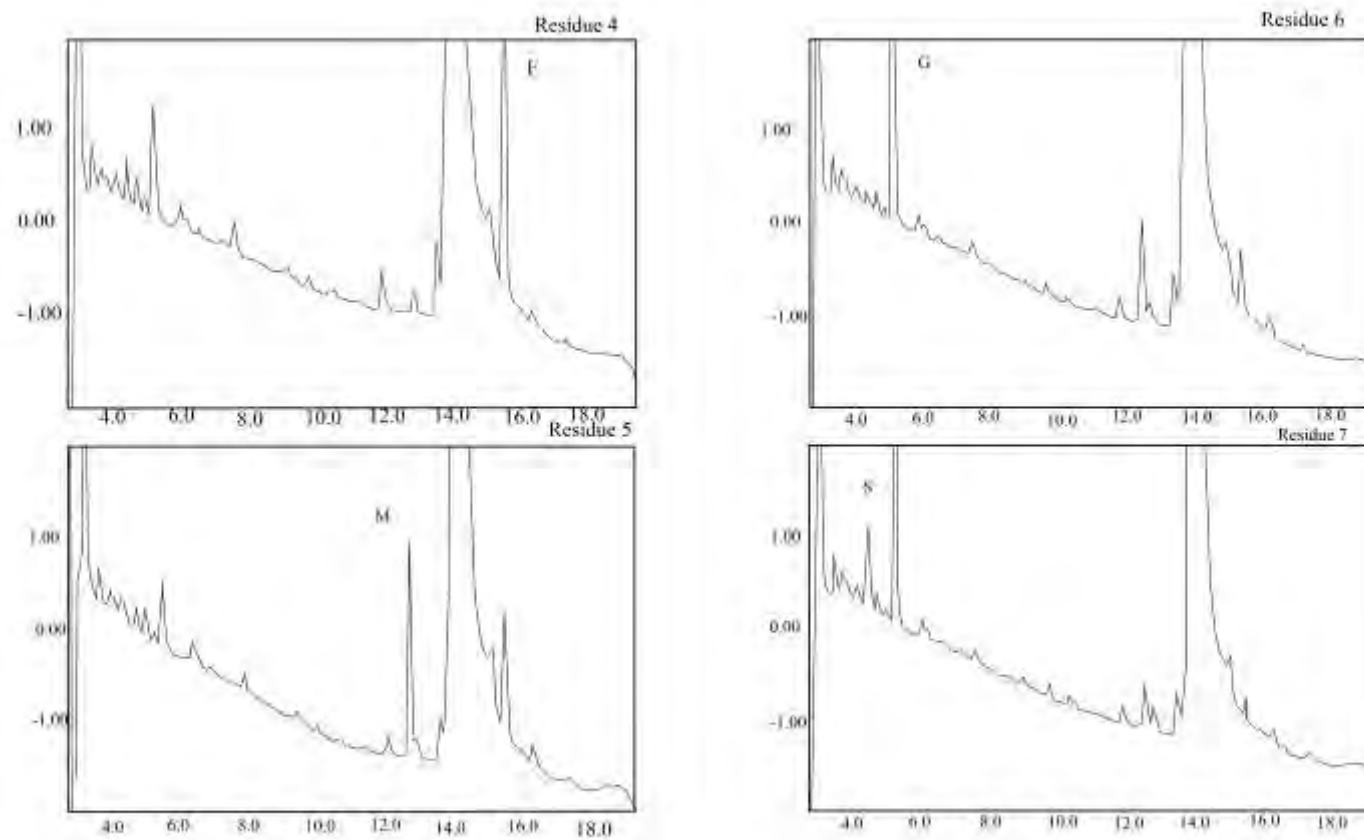


Fig. 8. Cromatogramas de la secuenciación de Edman del péptido laaaa. Residuos del 4 al 7.

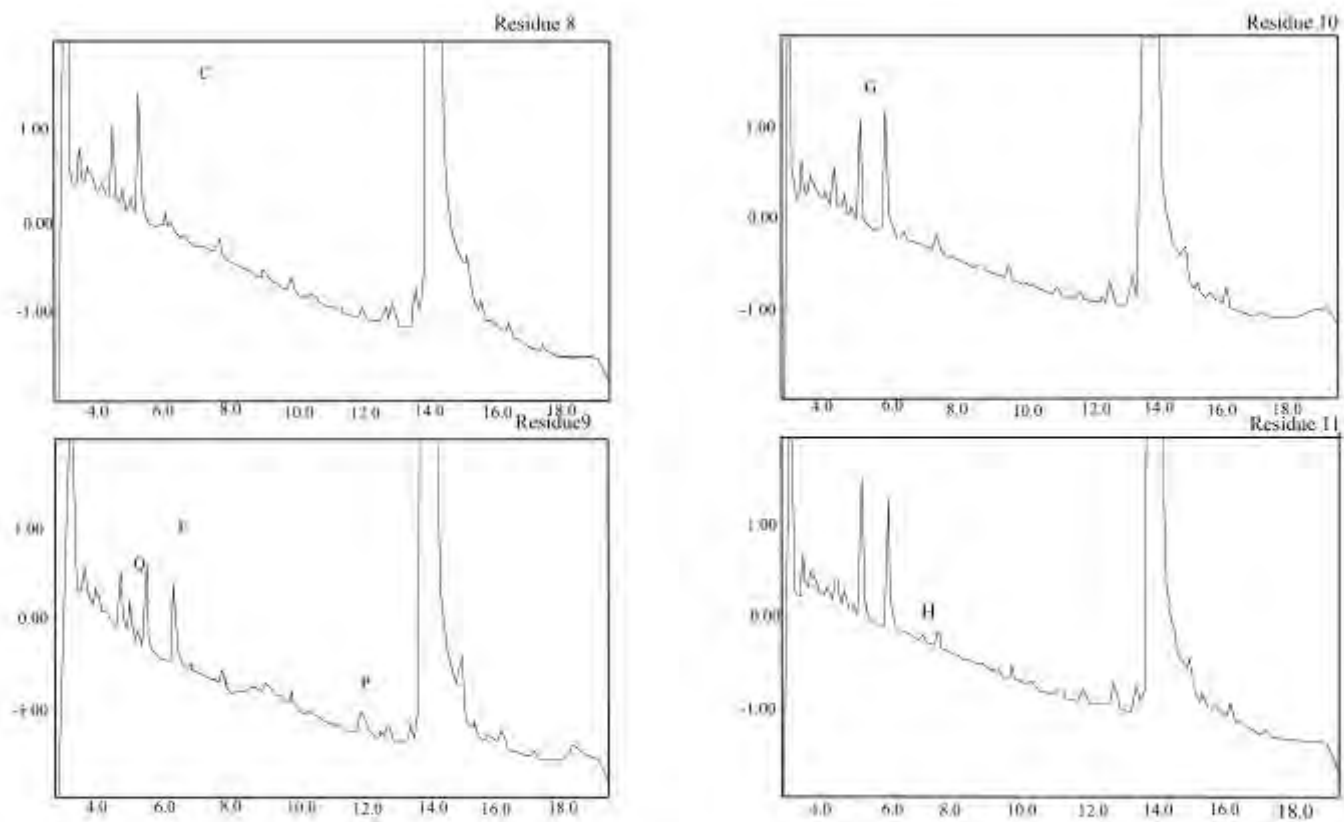


Fig. 8. Cromatogramas de la secuenciación de Edman del péptido laaaa. Residuos del 8 al 11.

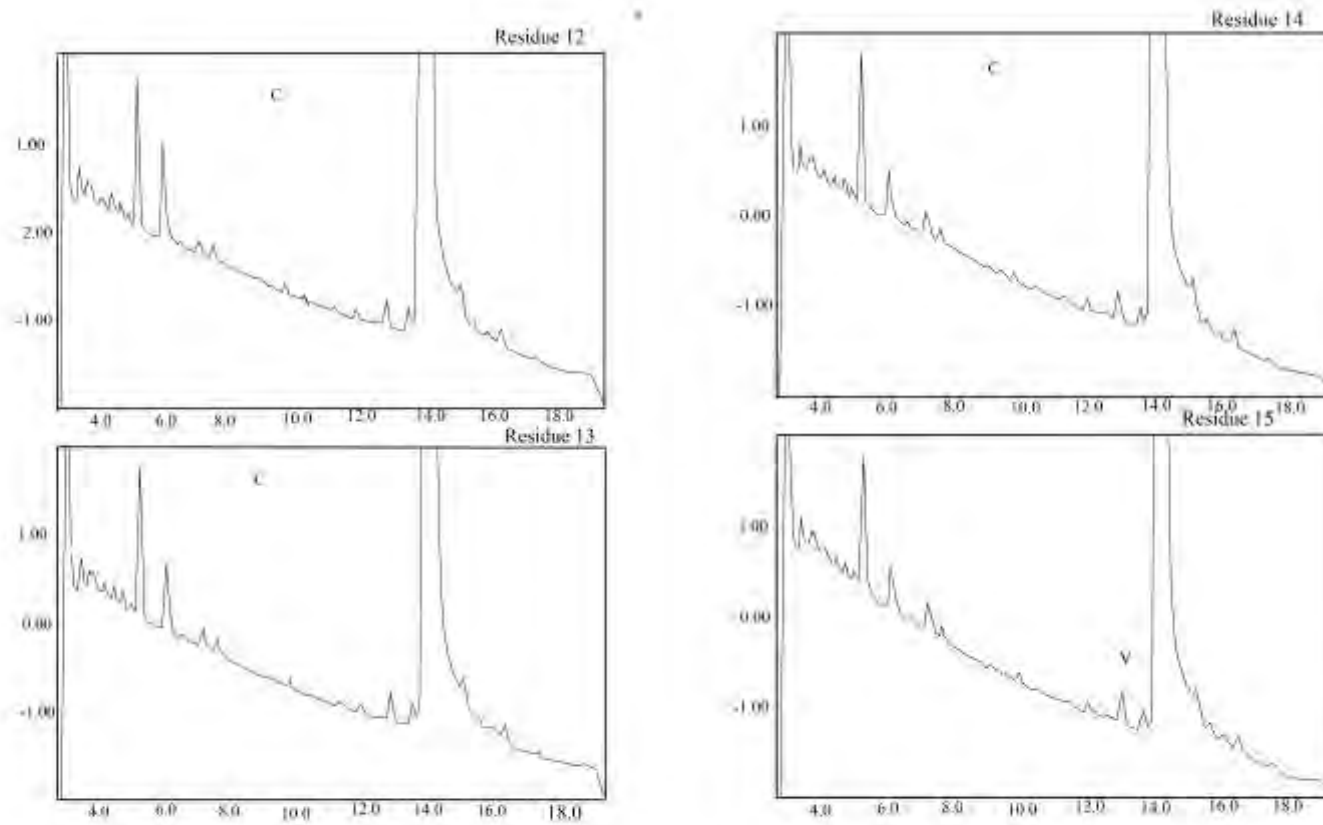


Fig. 8. Cromatogramas de la secuenciación de Edman del péptido laaaa. Residuos del 12 al 15.

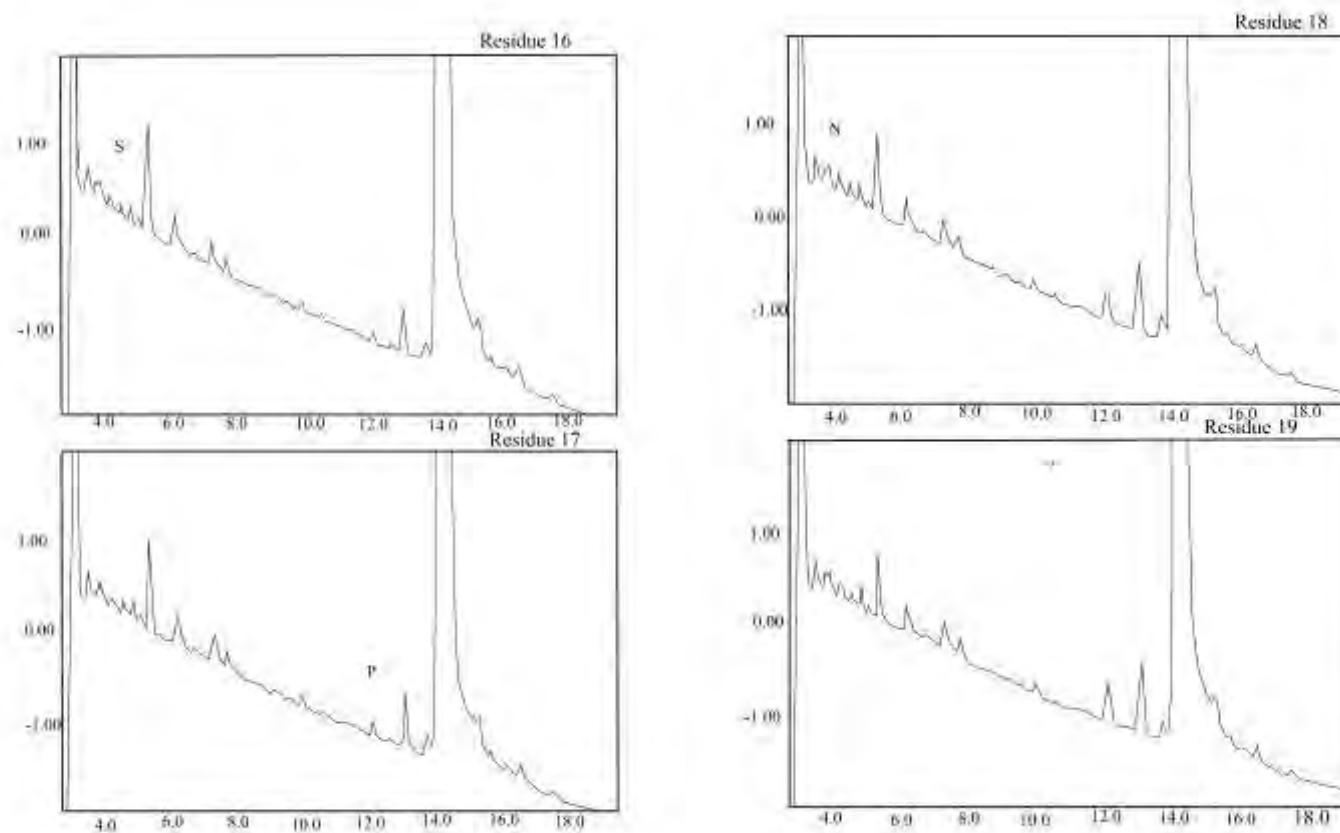


Fig. 8. Cromatogramas de la secuenciación de Edman del péptido laaaa. Residuos del 16 al 19.



Es necesario mencionar también que a pesar de la poca cantidad de muestra obtenida durante la purificación y de la todavía menos cantidad de muestra que quedó después de tomar alícuotas para la secuenciación de Edman, fue necesario realizar los experimentos para obtener la masa de cada uno de los péptidos. En general, para obtener un espectro de legible se requiere de 200 pmol de muestra; en este trabajo se analizaron muestras hasta con 19 pmol y en el caso del péptido Bba, en donde el resultado fue muy claro, se utilizaron 400 pmol.

Ambas metodologías, secuenciación y espectrometría de masas son complementarias; como se puede observar en las Figuras 25 y 26 y en la Tabla 13 que corresponden al péptido Bba, la secuenciación no es suficiente para la interpretación de los datos; en este caso fue necesario hacer el análisis de masas para concluir que este pico presentaba cuatro variantes del mismo péptido (Tabla 23); esta información no hubiera podido ser inferida de no haber realizado ambas técnicas.

En la Fig. 9 se muestra la separación del extracto crudo y las fracciones elegidas para la repurificación. Las secciones A y B se eligieron debido a que no habían sido estudiadas

previamente. Las fracciones que fueron estudiadas previamente se señalan con una flecha “de13a”, “de7a” (Aguilar *et al.*, 2005 a y b) y “4-587-589-1” (datos no publicados). La sección M (Meyer, 2001). Se obtuvieron 12 secuencias parciales y 1 completa de los péptidos purificados a partir de las secciones A y B del veneno de *C. delessertii*.

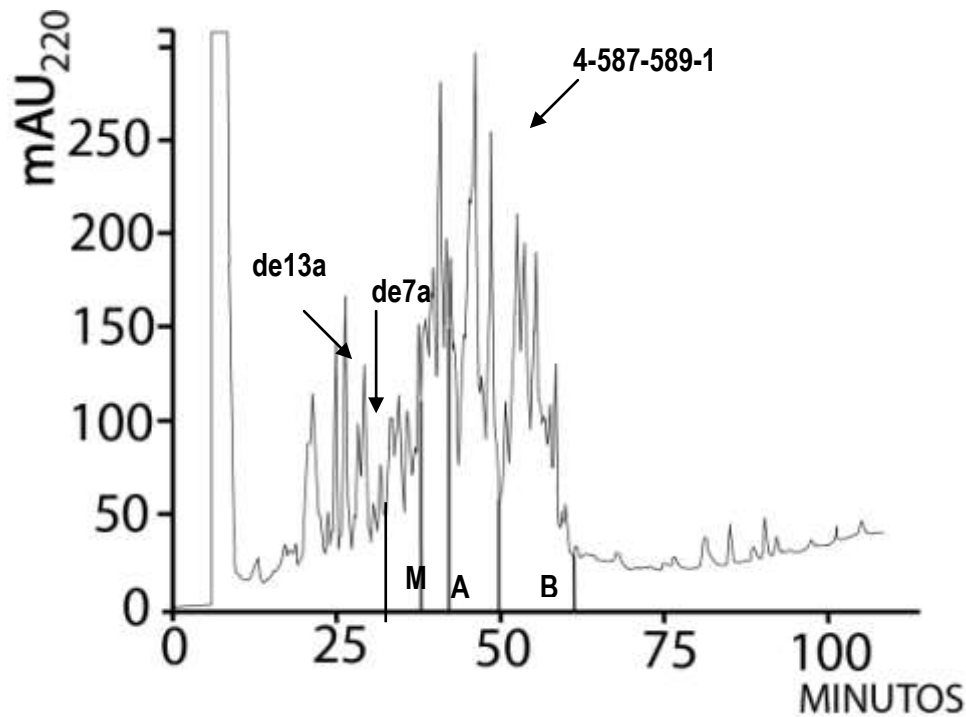



Fig. 9. Perfil cromatográfico del extracto crudo del veneno del caracol marino *C. delessertii*. Los péptidos fueron separados con una columna semipreparativa C18. Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 5% a 100% de solución B en 95 minutos, con un incremento de B de 1% por minuto y un flujo de 2.5 ml por minuto. “A” y “B” secciones elegidas para purificación, secuenciación y espectrometría de masas. “M”, región estudiada por Meyer en el 2001. “de13a”, “de7a” y 4-587-589-1 péptidos estudiados previamente.

En el caso de la sección “A” del cromatograma del extracto crudo se eligieron cuatro picos para su posterior purificación los cuales se muestran a continuación:

A III

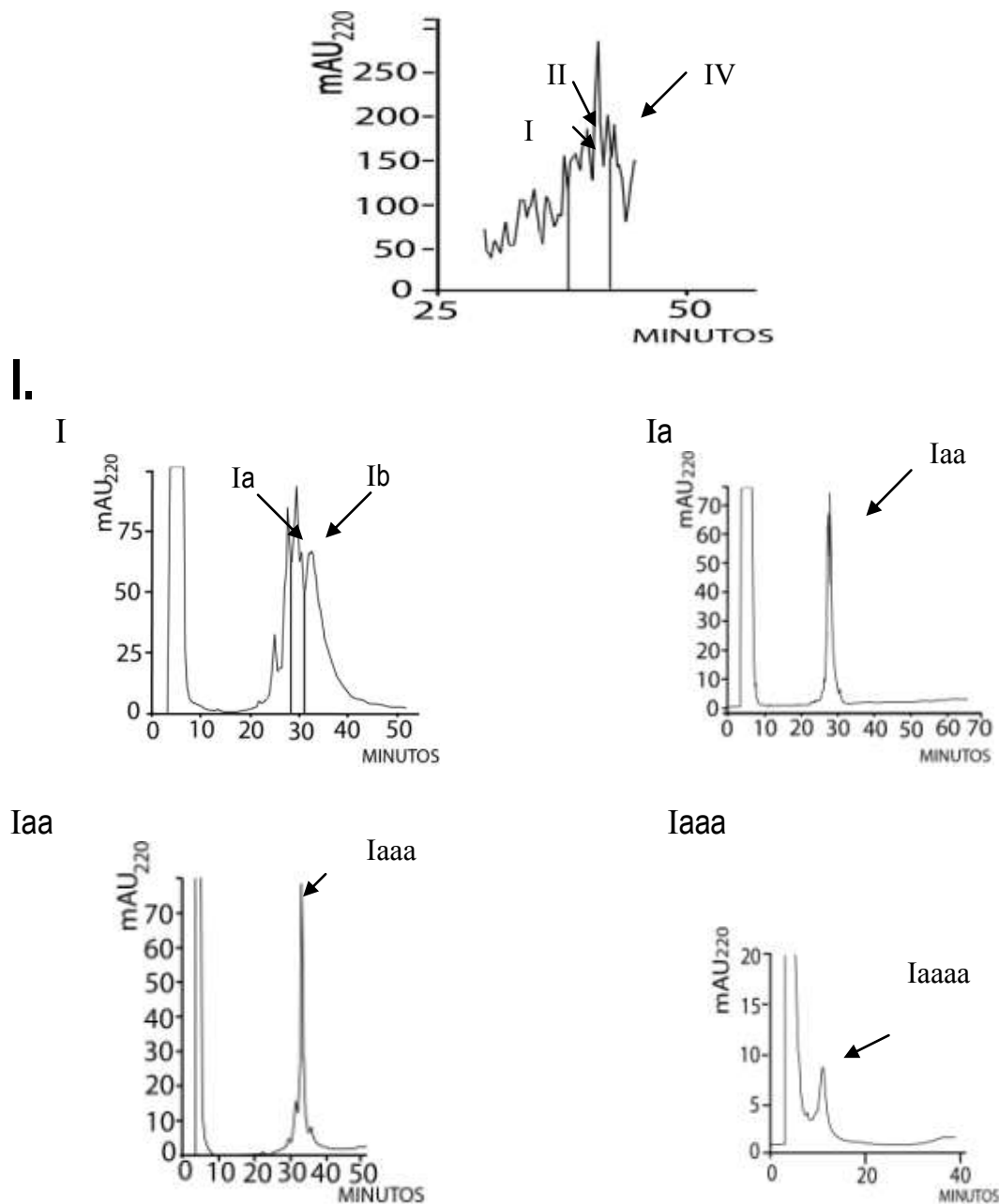


Fig. 10. A. Ampliación del perfil cromatográfico de la sección "A" del extracto crudo. I, II, III y IV picos elegidos para purificación, secuenciación y espectrometría de masas. La sección I muestra las cuatro etapas de purificación del pico Ia. En la primera etapa se utilizó el programa P1; en la segunda etapa se utilizó el programa P2; en la tercera etapa se utilizó el programa P3; y en la cuarta etapa se utilizó el programa P4. Ib.

Tabla 7. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido Iaaaa.

Péptido (35 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
-------------------	---------------------	------------------------------------	---------------------------------------



Iaaaa	MPCFMGSCEGHCCCVSPNX	1901.25	3434.01 ($\Delta=15.05$) 3449.06 ($\Delta=15.05$) 3463.23 ($\Delta=14.17$) 3480.35 ($\Delta=17.12$) 3495.94 ($\Delta=15.59$) 4039.29.

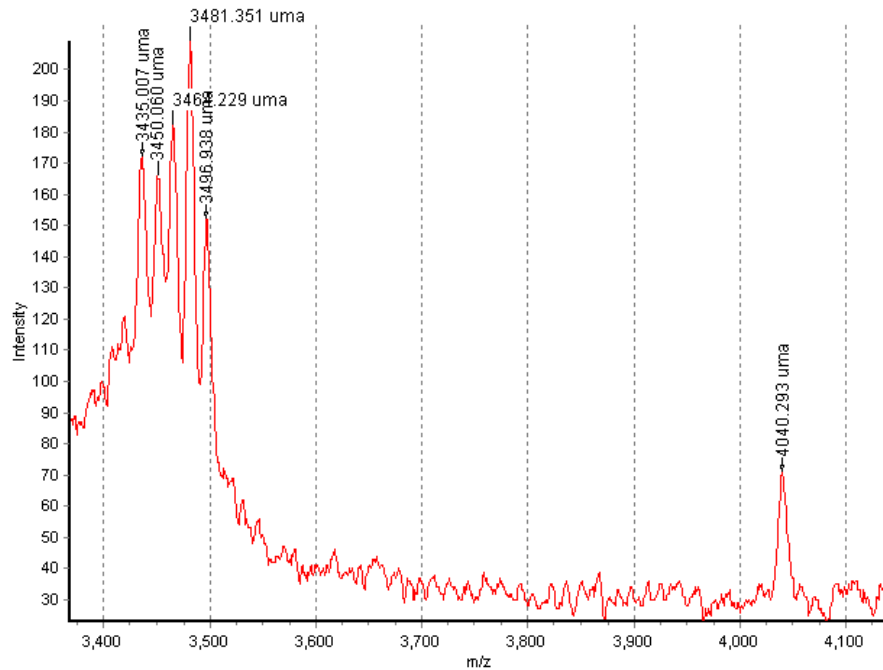


Fig. 11. Espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido Iaaaa.

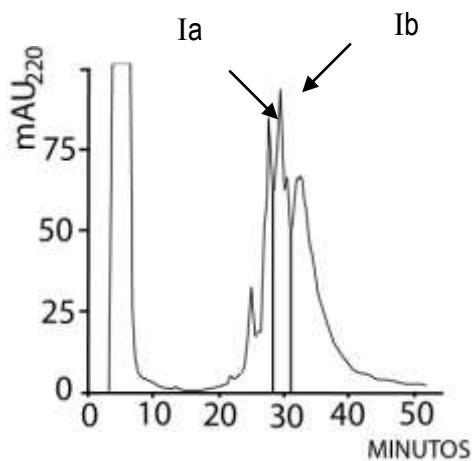
Tanto la secuenciación automática, como la espectrometría de masas indican que el péptido laaaa no está puro y que su secuencia está incompleta. Sin embargo, la proporción entre la secuencia mayoritaria y las minoritarias observada en la secuenciación de Edman indica que las masas 3434.01-3495.94 corresponden a la secuencia mayoritaria, mientras que la de 4039.29 corresponde a algún contaminante. Las diferencias entre las masas mayoritarias (Δ , ver Tabla 7) varían entre 14.17 y 17.12 Da y podrían deberse, por ejemplo, a diferentes grados de oxidación (15.99 Da) en residuos de Met (de los cuales el péptido laaaa tiene al menos 2) o de hidroxilación (15.99 Da) de residuos de Pro, Lys o Val localizados más allá de la posición 18.

El pico Ib se purificó en condiciones distintas al pico Ia, el cromatograma resultante se muestra a continuación



I.

I



Ib

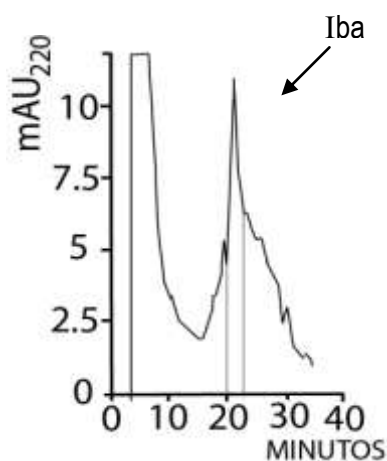


Fig. 12. La sección I muestra las dos etapas de purificación del pico Ib. En la primera se utilizó el programa P1 (ver Fig. 10) y en la segunda etapa se utilizó el programa P2'.

Tabla 8. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Iba.

Péptido (51 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Iba	MPQFMGSTEIHGVSGLS CKFCCTCYGA	2941.40	Indefinido

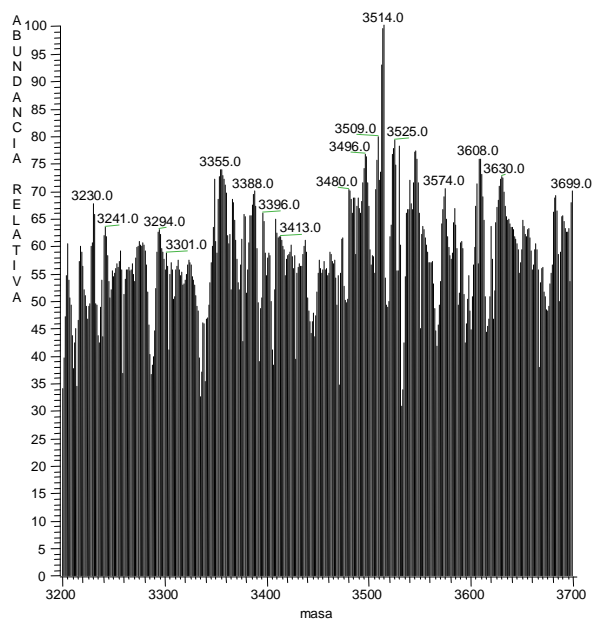
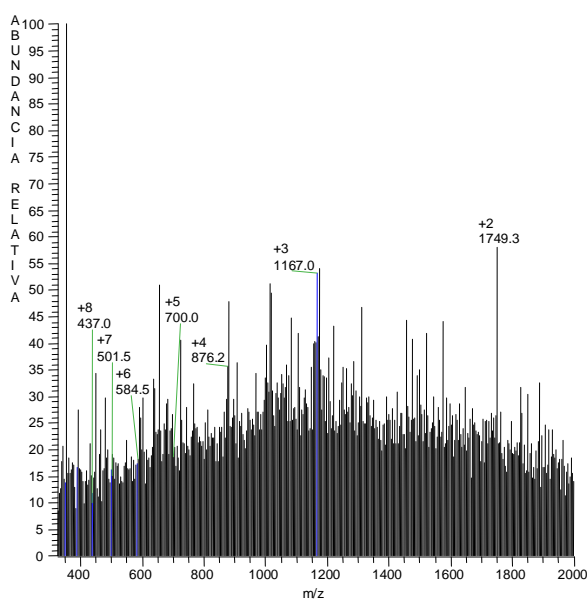
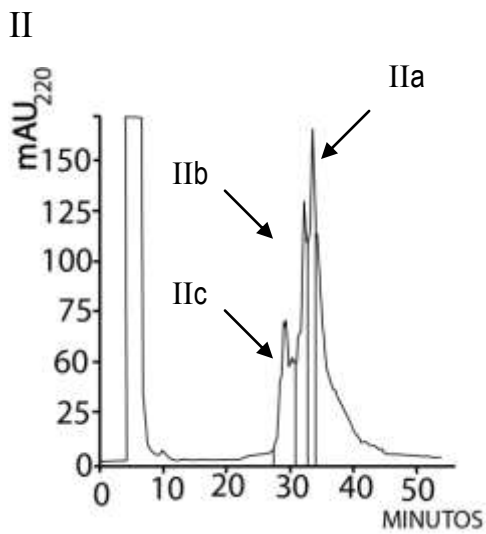




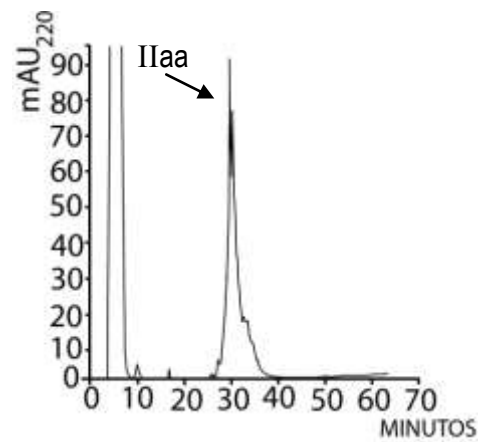
Fig. 13. Espectrometría de masas (ESI) del la muestra que contiene al péptido Iba.

Tanto la secuenciación automática, como la espectrometría de masas indican que el péptido Iba no está puro y que su secuencia está incompleta. Aunque la proporción entre la secuencia mayoritaria y minoritarias observada en la secuenciación de Edman permitió identificar 28 residuos, la masa correspondiente a la secuencia mayoritaria no pudo ser determinada, muy probablemente debido a que la cantidad de muestra analizada no fue suficiente. (Tabla 8 y Fig. 12 Y 13)

II.



IIa



IIaa

IIaaa

IIaaa

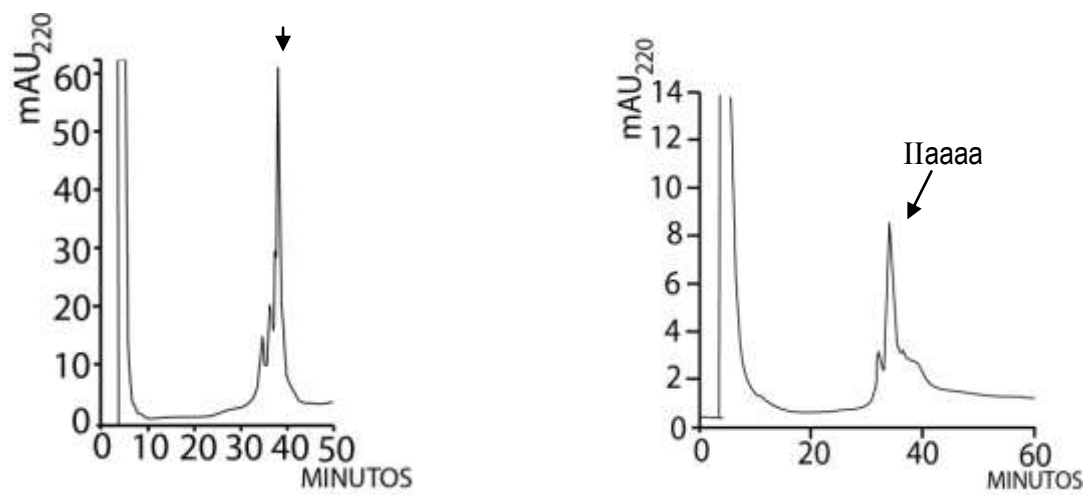


Fig. 14. La sección II muestra las cuatro etapas de purificación del pico IIa. En la primera etapa se utilizó el programa P1; en la segunda etapa se utilizó el programa P2; en la tercera etapa se utilizó el programa P3 y en la cuarta etapa se utilizó el programa P4. IIb y IIc (Ver Fig. 16).



Tabla 9. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido IIaaaa.

Péptido (43 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
IIaaaa	AGDNSQLVY CQLKAFPT CCLAFLA	2574.99	Indefinido

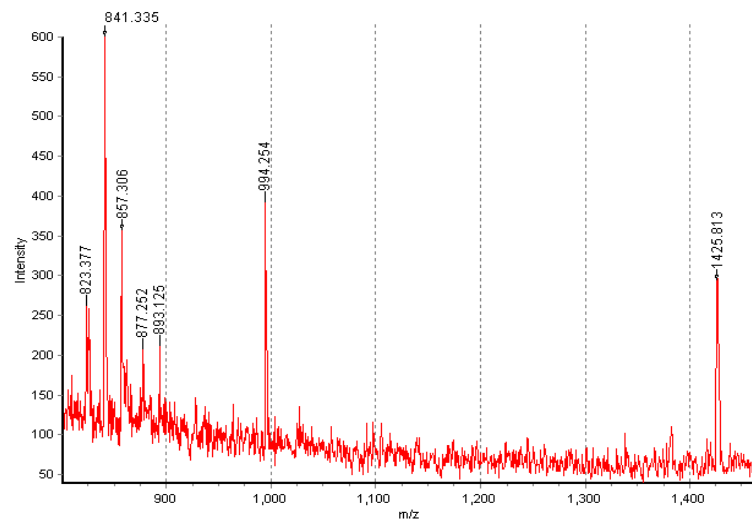


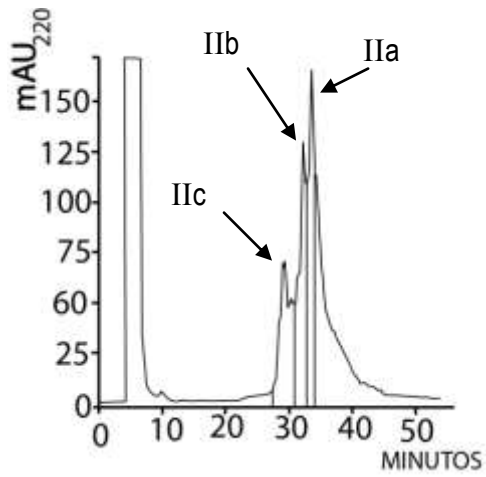
Fig. 15. Espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido IIaaaa.

La secuenciación, así como la espectrometría de masas indican que el péptido IIaaaa no está puro. Aunque la proporción entre la secuencia mayoritaria y minoritarias observada en la secuenciación de Edman permitió identificar 24 residuos, la masa correspondiente a la secuencia mayoritaria no pudo ser determinada (la masa de los residuos identificados es mayor que cualquiera de los valores experimentales), muy probablemente debido a que la cantidad de muestra analizada no fue suficiente. (Tabla 9 y Fig. 14 y 15)

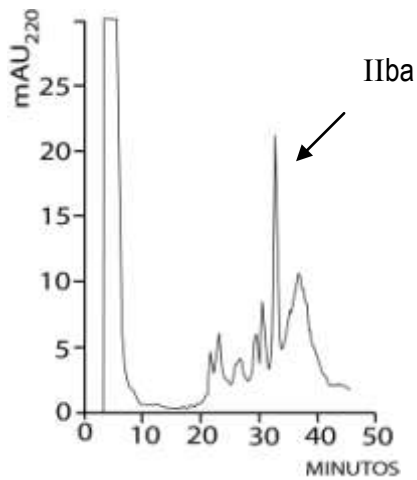


II

II



IIb



IIc

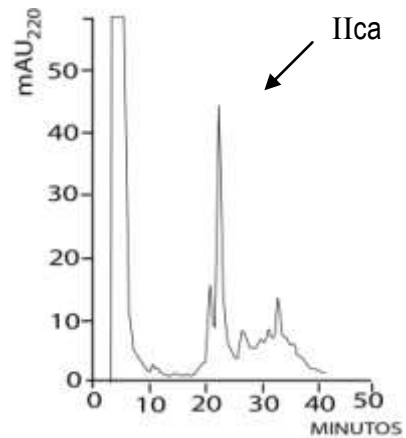


Fig. 16. La sección II muestra las dos etapas de purificación de los picos IIb y IIc. En la primera etapa de purificación se utilizó el programa P1 y en la segunda se utilizó el programa P2'. IIa, ver Fig. 14.



Tabla 10. Secuencias parciales, pesos moleculares calculados de las secuencias y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de las muestras que contiene a los péptido IIba y IIca. S.A. = Secuencias adicionales minoritarias; X= residuo no identificado, γ =gammacarboxiglutamato.

Péptido (25 pmol) (42 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
IIba	MPQFMDST γ IGVCGSLSCKFCTCYVGXQ	3078.54	8875.0 8893.0
S. A.	<u>G</u>	3020.51	
IIca	XDDNSRLVYCCCLKAFPTCPLACVPK	2653.14	3000.0 3042.0

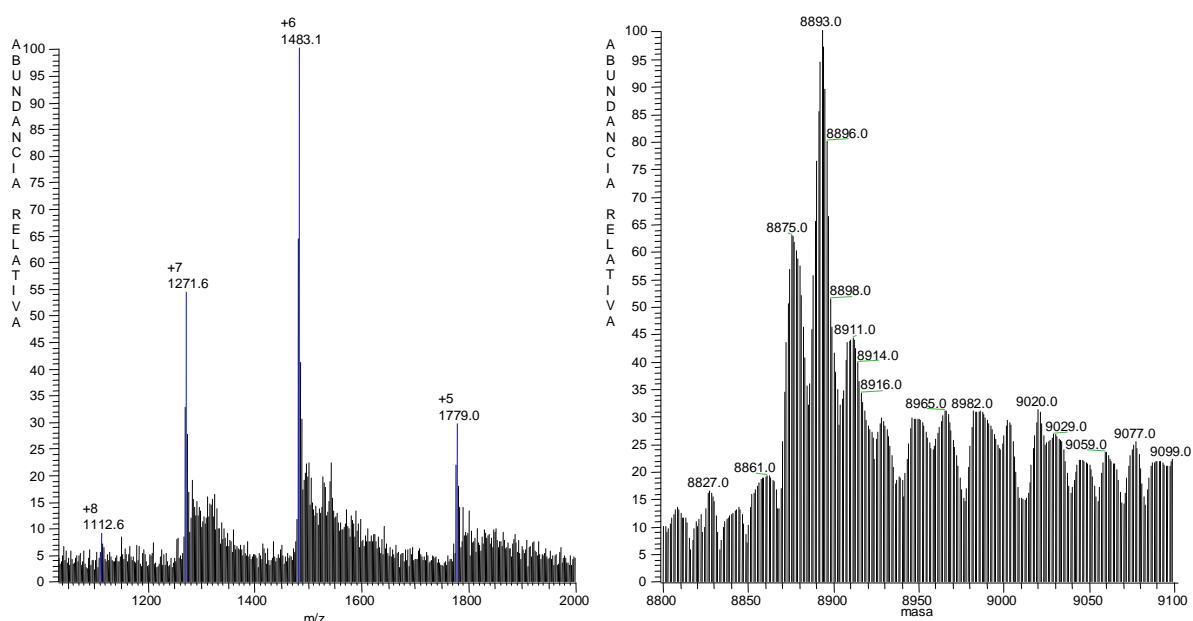


Fig. 17. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido IIba.

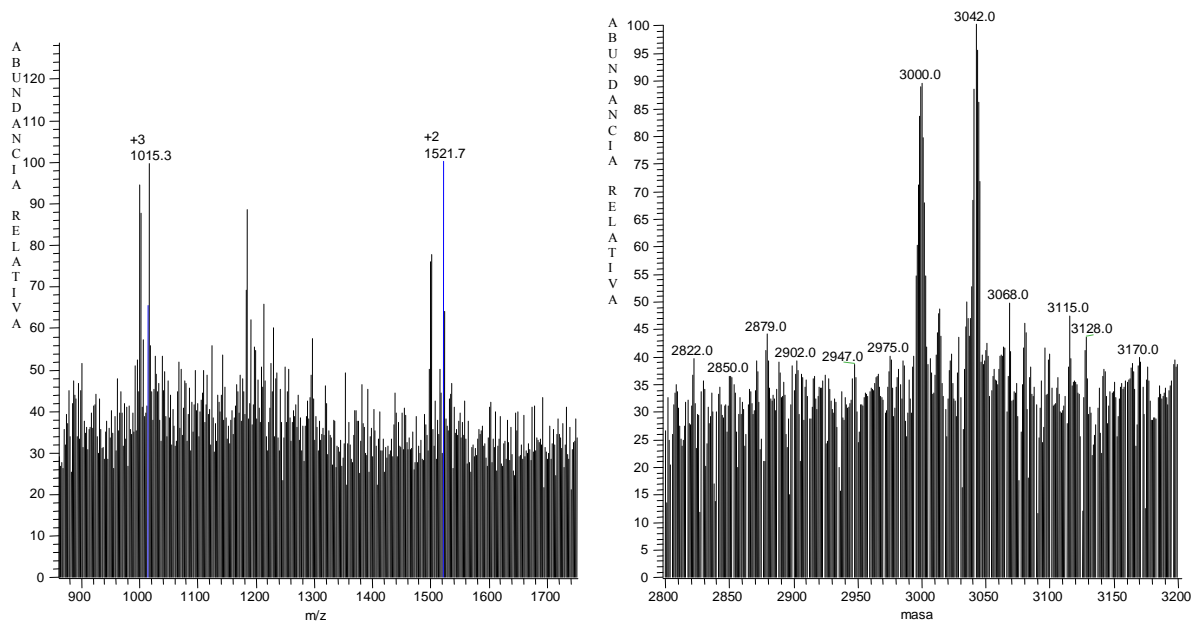


Fig. 18. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Ica.

La cromatografía y el análisis por espectrometría de masas indican que los péptidos Ilba y Ilca no están totalmente puros (Tabla 10 y Fig.16, 17 y 18). Las diferencias entre las masas calculada para la secuencia determinada químicamente del péptido Ilca y las masas experimentales indican que faltan 3-4 residuos por identificar, considerando un promedio de 110 Da/residuo. Este péptido parece consistir de 2 variantes muy similares. Sin embargo, en este caso, no se detectó ninguna diferencia entre ellas, en los 24 residuos identificados, los cuales dan cuenta de ~88% de las masas experimentalmente determinadas. La diferencia (42.0 Da) entre éstas podría deberse a acetilación (42 Da), trimetilación (42.0 Da) o gamma-carboxilación (44.0 Da) de alguna cadena lateral. Aunque la acetilación y la trimetilación concuerdan mejor con la diferencia entre las masas experimentales, hasta el momento no han sido descritas en conotoxinas. Otras posibilidades son sustituciones de Gly por Val, Ile por Ala, Leu por Ala (42.08 Da), Glu por Ser (42.04 Da), y Asn por Arg (42.09 Da).

El péptido Ilba también parece consistir de 2 variantes muy similares, ya que en la posición 6 se observó un aumento considerable de Gly (en negrillas y subrayado en la parte superior de la Tabla 10, además de Asp, que fue el residuo mayoritario; sin embargo, esta microheterogeneidad no explica la diferencia (18.0 Da) entre las 2 masas observadas experimentalmente (8875.0 y 8893.0 Da), ya que las masas promedio de los residuos de Asp



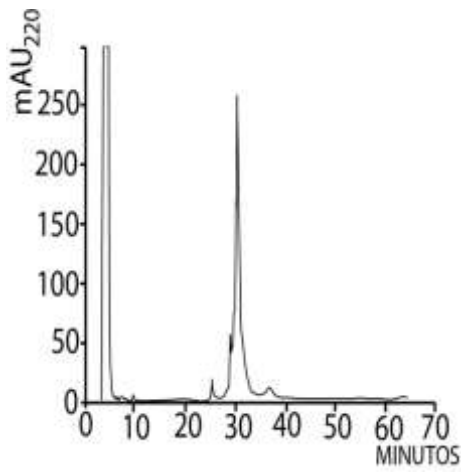
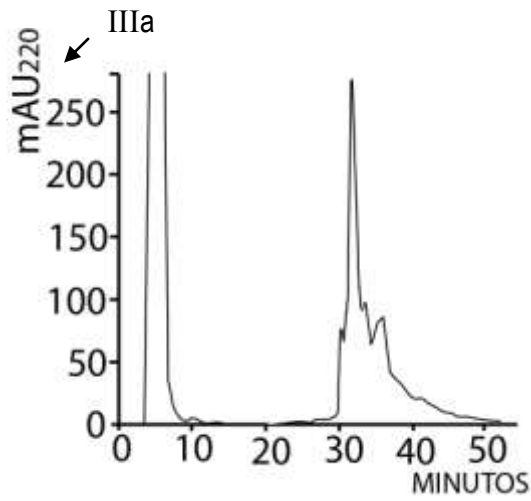
(115.1 Da) y Gly (57.1 Da) difieren en 58.0 Da. Esto sugiere que hay por lo menos una diferencia entre las dos variantes. Los 30 residuos identificados dan cuenta de ~35% de la masa experimental.



III.

III

IIIa



IIIaa

IIIaaa

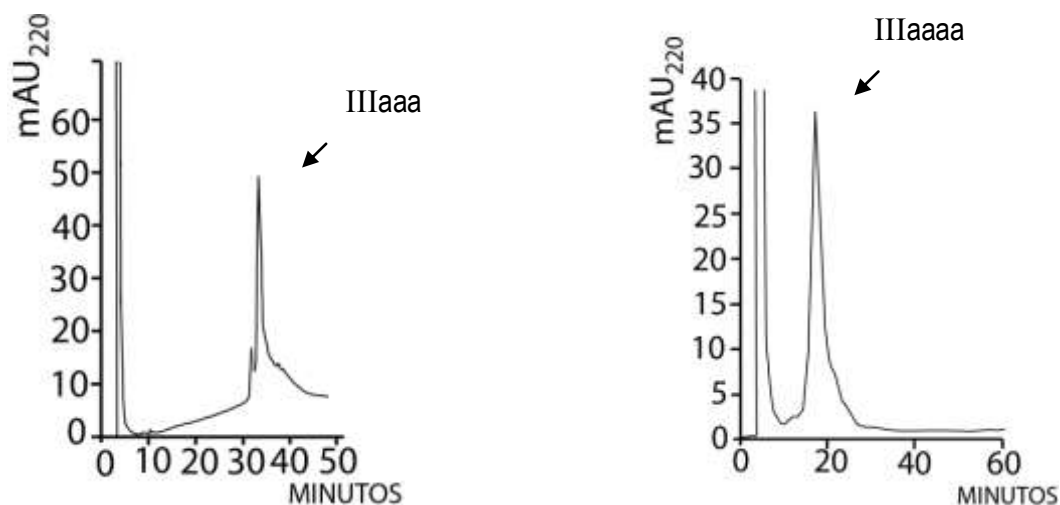


Fig. 19. La sección III muestra las cuatro etapas de purificación del pico IIIa. En la primera etapa se utilizó el programa P1; en la segunda etapa se utilizó el programa P2; en la tercera etapa se utilizó el programa P3 y en la cuarta etapa se utilizó el programa P4.

Tabla 11. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido IIIaaaa.

Péptido (40 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
IIIaaaa	WPGCVHPCIPIVALCDYRRCPNYPSARCLPDYCVCGCFYRGCRLTCD	5606.56	3081.37
			3435.86
			4153.86
			6190.50

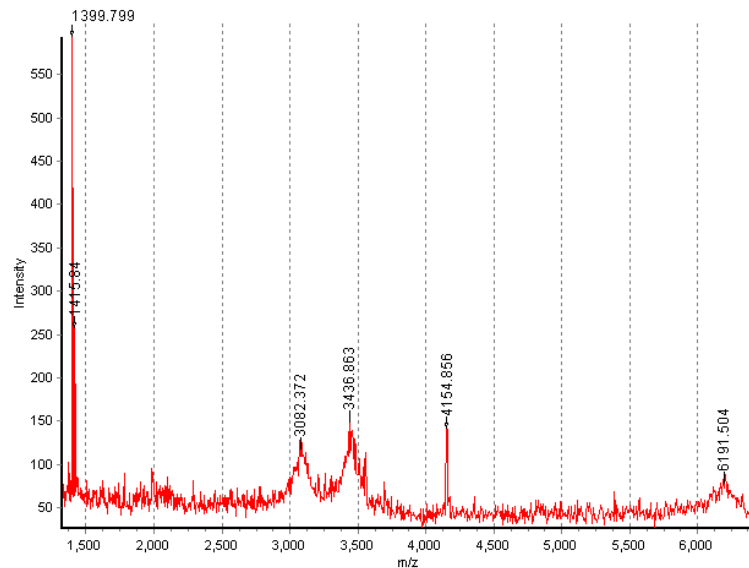


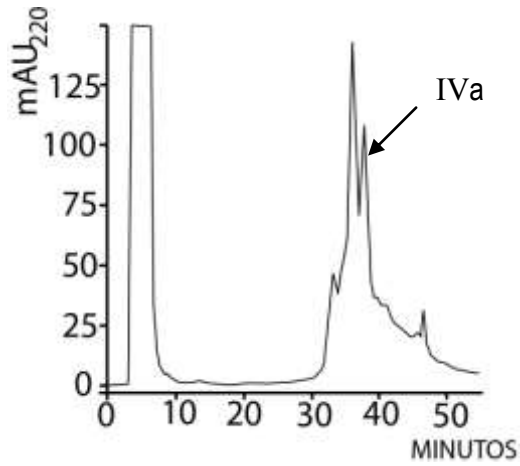
Fig. 20. Espectrometría de masas (MALDI) de la muestra que contiene al péptido "IIIaaaa".

La secuenciación y la espectrometría de masas indican que el péptido IIIaaaa no está puro. El caso de este péptido llama la atención por dos razones: 1) con poca cantidad de muestra (40 pmol) se identificaron 49 residuos; 2) aunque el espectro de masas muestra varias señales de intensidad similar, en la secuenciación la cantidad de la secuencia mayoritaria (40 pmol) es mucho mayor que las minoritarias (≤ 2 pmol); esto podría deberse a la presencia de contaminantes abundantes con extremos amino bloqueados, que no pueden ser secuenciados, y/o a la ocurrencia de supresión iónica en el componente mayoritario cuya secuencia se observó claramente. La diferencia (583.94 Da) entre la masa calculada para la secuencia determinada químicamente (5606.56 Da) y la mayor masa experimental (6090.50 Da) indica que faltarían 4 residuos por identificar, considerando un promedio de 110 Da/residuo (Tabla 11 y Fig.19 y 20).

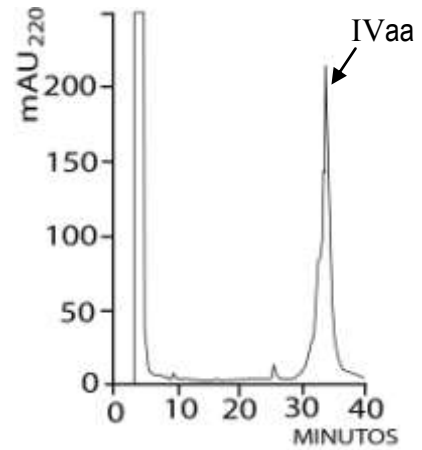


IV.

IV



IVa



IVaa

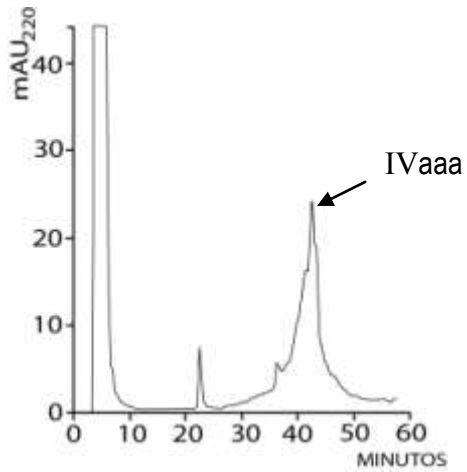


Fig. 21. La sección IV muestra las tres etapas de purificación del pico IVa. En la primera etapa se utilizó el programa P1; en la segunda etapa se utilizó el programa P2 y en la tercera etapa se utilizó el programa P2'.



Tabla 12. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido IVaaa. S.A. = Secuencias adicionales minoritarias.

Péptido (51 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
IVaaa	XVSIQS QLDYITSE DAYTF CAR	2389.53	Indefinido
S.A.	XFYP CCA V VCIP	1212.50	
	XPNEYERTISNR	1378.43	

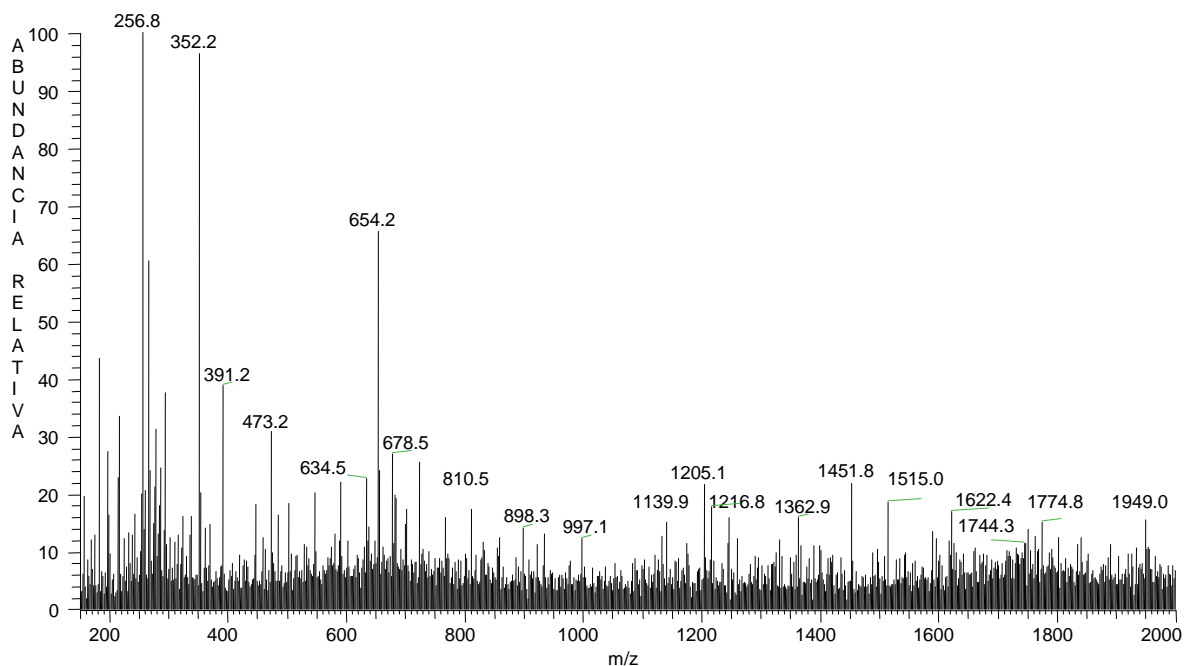


Fig. 22. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido IVaaa.

En este caso durante los primeros 12 ciclos, se distinguieron 3 secuencias mayoritarias (separadas por renglones vacíos en la Tabla 12). Este resultado no fue inesperado, dado que el perfil cromatográfico indicaba que la muestra no era homogénea; sin embargo, no se podía descartar de antemano que la heterogeneidad fuera debida a variantes postraduccionales en algunas posiciones. Desafortunadamente, la cantidad de muestra analizada no fue suficiente para obtener un espectro de masas interpretable (Fig. 21 y 22).

En el caso de la sección “B” del cromatograma del extracto crudo se juntó el material que había sido previamente purificado (Fig. 23, panel B) y se elaboró un nuevo programa para mejorar

separación de los péptidos; el perfil cromatográfico y los picos obtenidos y seleccionados para la purificación, secuenciación y espectrometría de masas están señalados en la Fig. 23, panel **B1**.

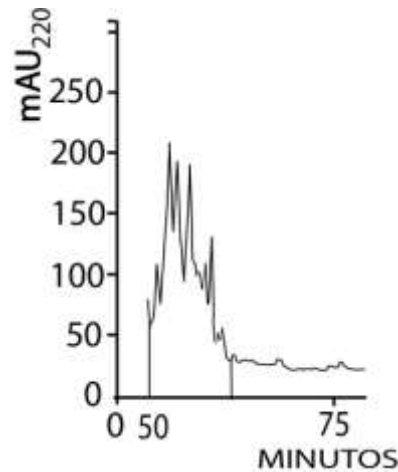
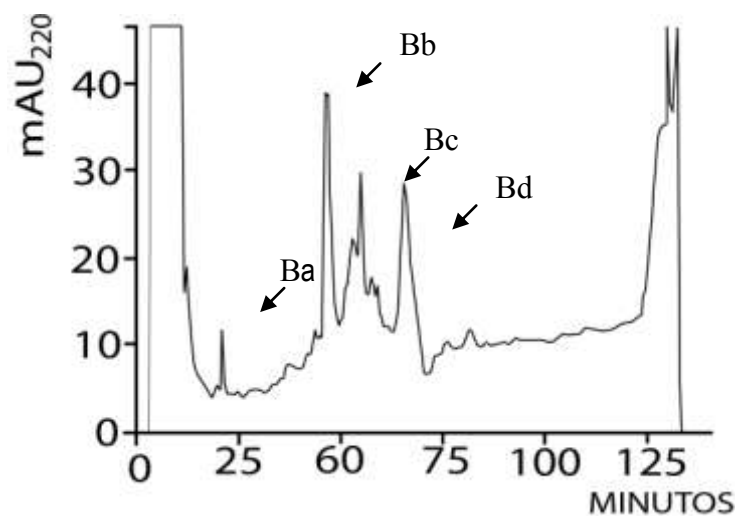
B**B1**

Fig.23. B, Ampliación del perfil cromatográfico de la sección B del extracto crudo del veneno del caracol marino *Conus delessertii*. Los picos fueron separados con una columna semipreparativa C18, con un gradiente de 5% a 100% de solución B en 95 minutos, con un incremento de B de 1% por minuto y un flujo de 2.5 ml por minuto. B1, Perfil cromatográfico de la sección B del extracto crudo. Los picos fueron purificados con el programa P5. Ba, Bb, Bc y Bd son los picos que fueron elegidos para purificación, secuenciación y espectrometría de masas.

Ba.

En el caso del pico Ba no se realizó ninguna purificación extra. El pico se encontró, disuelto y llevado directamente a secuenciación a partir de etapa de purificación; los resultados de la misma se muestran a continuación:



Tabla 13. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Ba. O = hidrox-Pro; W = bromo-Trp.

Péptido (54 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Ba	AGCDOQONGSWCGLCODCCQCSFY	2675.74	Indefinido

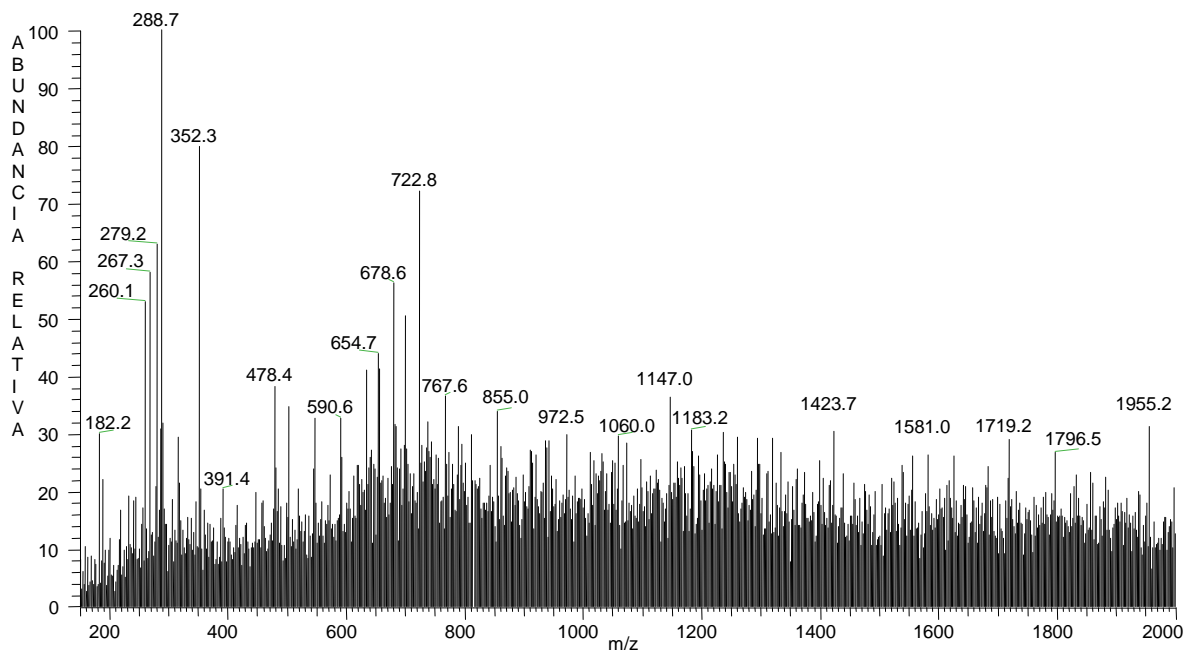


Fig. 24. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Ba.

Se observaron contaminantes en una proporción muy pequeña, pero se identificaron claramente 24 residuos del péptido mayoritario; sin embargo, dado que la masa molecular de éste no pudo ser determinada, se desconoce el porcentaje de la secuencia que ha sido identificada (Tabla 13 y Fig. 23 y 24).

Los picos Bb, Bc y Bd se sometieron a otra etapa de purificación y los perfiles cromatográficos de los mismos se muestran a continuación:

Bb.

Bba

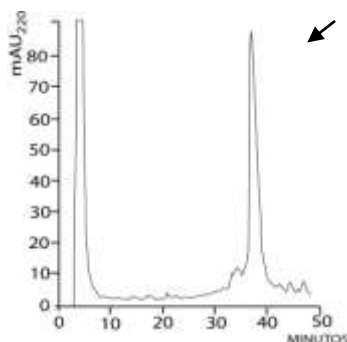


Fig. 25. Bb perfil cromatográfico del pico Bba. El pico fue purificado con el programa P6.

Tabla 14. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bba. S.A. = Secuencias adicionales. O = hidoxi-Pro.

Péptido (200 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Bba	DCIPGGENC DV FROYRCC SGY CILLCAA	3165.67	3078.0
S.A.	O P		3095.0 3111.0 3139.0 3155.0

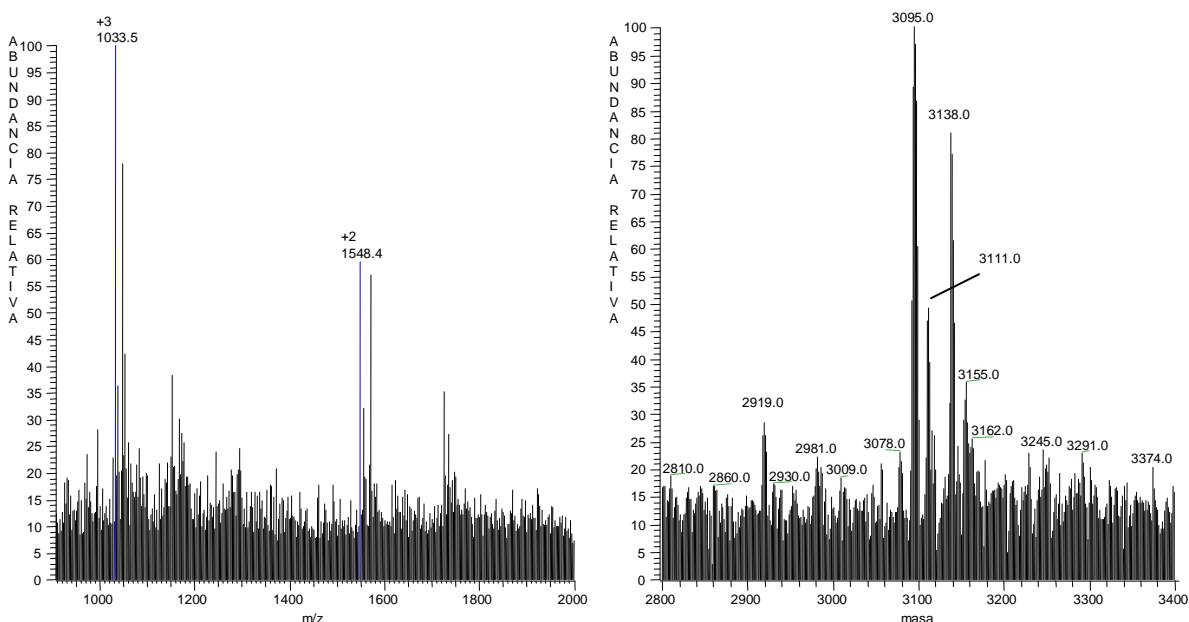


Fig. 26. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bba.

La masa calculada para la secuencia obtenida químicamente es mayor que cuatro de las cinco masas mayoritarias observadas en el espectro de masas. Considerando que el fenómeno de



retraso pudo haberse presentado en el último residuo, se calculó la masa de los primeros 28 residuos (3078.59 Da) y se encontró que concuerda muy bien con una de las masas experimentales mayoritarias (3078.0 Da); por lo tanto, se concluyó que la alanita (Ala) de la posición 29 es un artificio debido al fenómeno de retraso. Como en los casos anteriores, la proporción entre la secuencia mayoritaria y las minoritarias fue muy grande (en este caso, >100). Sin embargo en las posiciones 4 (Pro) y 14 (hidroxi-Pro), se observó una cantidad apreciable de hidroxi-Pro y Pro, respectivamente (en negrillas en el renglón de secuencias minoritarias), lo que indica la presencia de variantes postraduccionales. Además, en la posición 7 la cantidad de Glu fue aproximadamente la mitad de la observada en la posición 6 (Gly) y 8 (Asn), lo que indica que cerca de la mitad de las moléculas no contienen Glu en dicha posición. Dado que no se detectó ningún otro PTH en esta posición, era probable que se trate de gamma-carboxi-Glu, el cual se descarboxila parcialmente durante la etapa de corte de la secuenciación de Edman y produce una pequeña cantidad de Glu. En el espectro de masas se observan dos especies mayoritarias (3095.0 y 3138.0 Da) con una diferencia de 43.0 Da, que concuerda bien con la masa de un grupo carboxilo (44.0 Da). Por lo tanto, tomando en cuenta los resultados de la secuenciación automática y de la espectrometría de masas, se concluye que el péptido Bba es en realidad una mezcla de dos componentes mayoritarios (3095.0 y 3138.0 Da) y tres componentes minoritarios (3078.0, 3111.0 y 3155.0 Da). (Tabla 14 y Fig. 25 y 26) Los detalles acerca de la identidad de los cinco componentes del péptido Bba se dan en la discusión.



Bc.

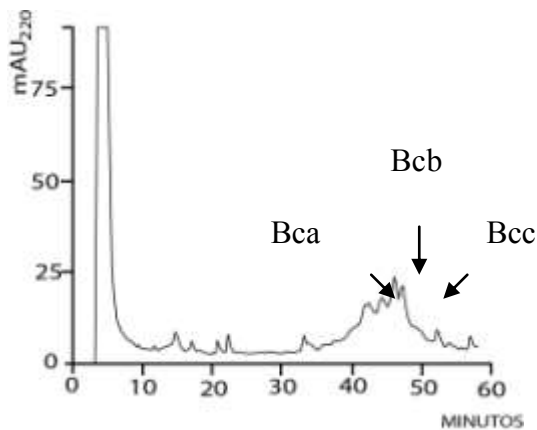


Fig. 27. Perfil cromatográfico del pico Bc. Los picos fueron purificados con el programa P6. Bca, Bcb y Bcc son los picos elegidos para la secuenciación y espectrometría de masas.

Tabla 15. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bca. O = hidrox-Pro; W = bromo-Trp.

Péptido (25 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Bca	AGCDOQONG <u>SW</u> G	1299.12	Indefinido (¿alto peso molecular?)

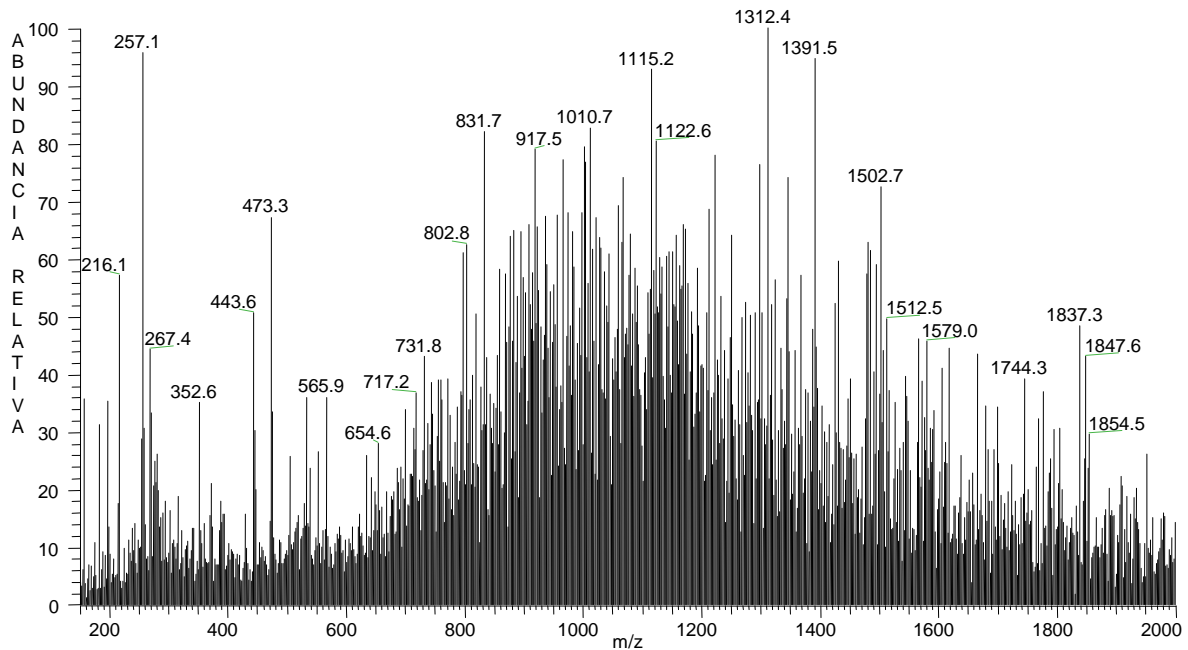


Fig. 28 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bca.

Tabla 16. Secuencias parciales, pesos moleculares calculados de las secuencias y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bcb. O = hidroxiproline; W = bromotriptófano.

Péptido (52 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Bcb	AGCDOQONGSW <u>C</u> GLCO	1729.68	Indefinido (¿alto peso molecular?)

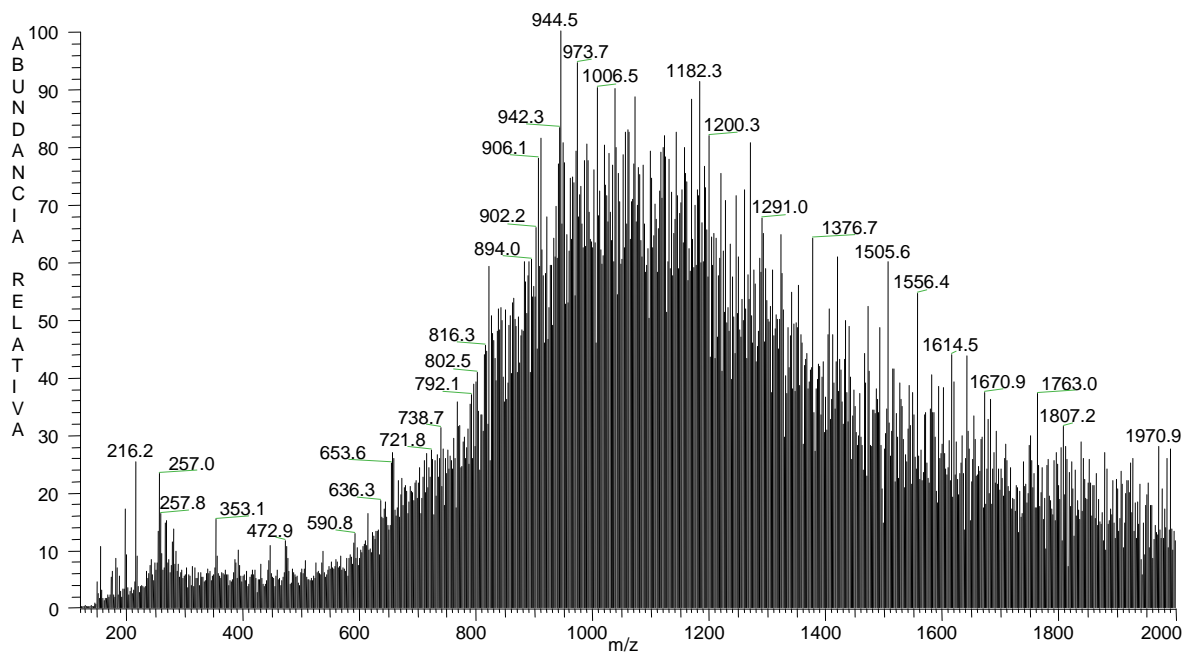


Fig. 29 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bcb.

Tabla 17. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bcc. O = hidrox-Pro; W = bromo-Trp.

Péptido (64 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Bcc	AGCDOQONGSWCGLCOLCCXSGFCQDQX	2810.91	Indefinido (¿alto peso molecular?)

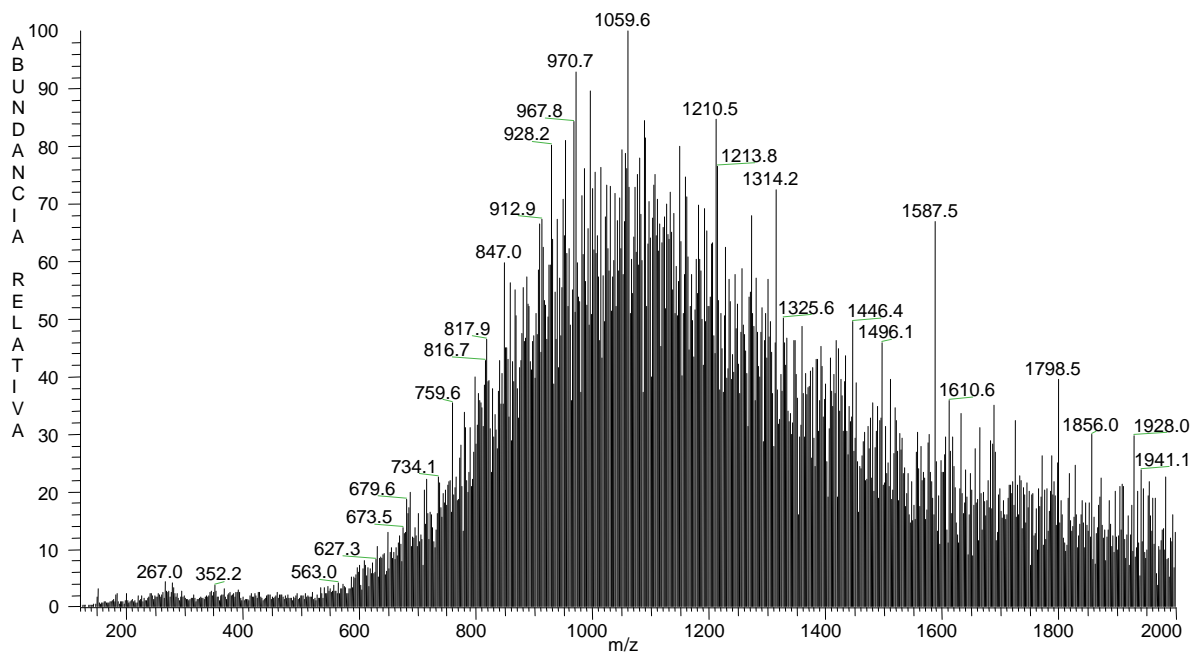


Fig. 30 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bcc.

Hasta donde pudo determinarse, los péptidos Bca, Bcb y Bcc tienen una secuencia casi idéntica a la del péptido Ba (Tabla 13). Dado que ambos péptidos tienen varias modificaciones postraduccionales, es muy probable que la diferencia entre ellos se deba a modificaciones postraduccionales adicionales en las partes de la secuencia que falta determinar; otra posibilidad es que tengan distintos aminoácidos en dichas regiones (Fig. 27 y 28).



Bd.

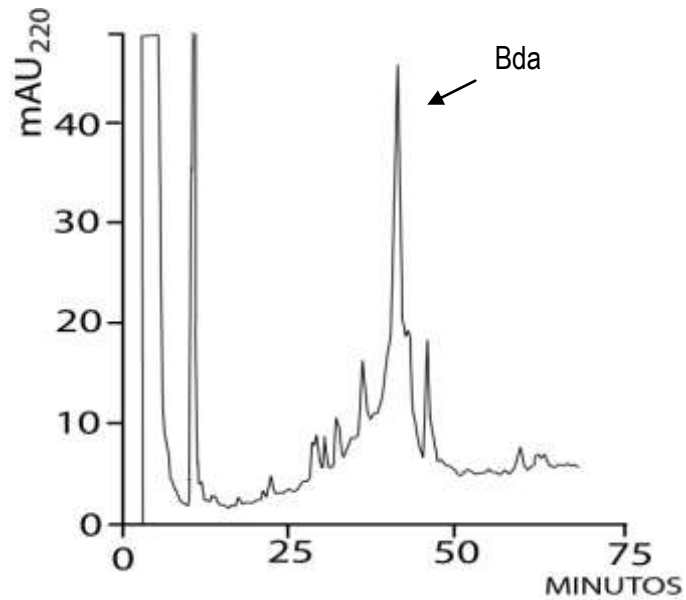


Fig. 31. Perfil cromatográfico del pico Bda. El pico fue purificado con el programa P6'.

Tabla 18. Secuencia parcial, peso molecular calculado de la secuencia y pesos moleculares experimentales obtenidos por espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bda. O = hidrox-Pro; W = bromo-Trp.

Péptido (20 pmol)	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Bda	AGCDOQONGSW <u>W</u> CGQLQLQDQ	2239.16	Indefinido (¿alto peso molecular?)

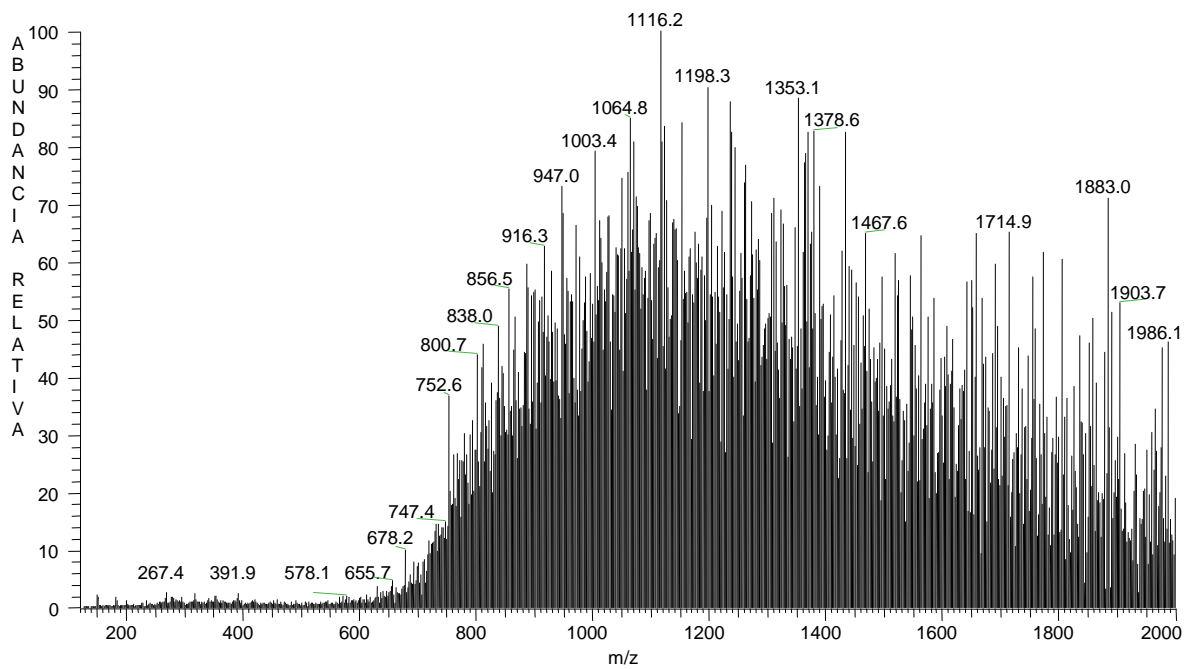


Fig. 32 Espectrometría de masas (ESI) de la muestra que contiene al péptido Bda.

Este péptido también tiene una secuencia N-terminal idéntica a la de los péptidos Ba (Tabla 13), Bca (Tabla 15), Bcb (Tabla 16) y Bcc (Tabla 17). La comparación entre todos los péptidos con secuencia similar es presentada en la discusión.



7. DISCUSIÓN

En la experimentación realizada en este trabajo se lograron purificar y secuenciar parcialmente doce péptidos y completamente un péptido aislado del veneno del caracol marino *C. delessertii*. En cada uno de los casos se eligieron los picos principales para las etapas de secuenciación y la espectrometría de masas. Como se puede observar en los cromatogramas de cada una de las etapas finales de la purificación, los picos obtenidos presentan contaminación por otros péptidos, los cuales también se observaron en la secuenciación y la espectrometría de masas.

Cabe mencionar que después de ser purificados los péptidos, con mayor o menor éxito, se tomaron alícuotas de ellos para la secuenciación de Edman automática. Los resultados indican que las muestras analizadas contenían cantidades variables de sus componentes mayoritarios (19-200 pmol). Excepto en el caso del péptido IVaaa, la secuencia mayoritaria obtenida fue por lo menos 20 veces más abundante que cualquier secuencia contaminante. Con base en los resultados de la secuenciación y en la cantidad disponible de cada péptido, se tomaron alícuotas con contenido variable (60-200 pmol) del componente mayoritario para el análisis mediante espectrometría de masas; en teoría, estas cantidades son suficientes para determinar la masa molecular de un péptido. Sin embargo, cabe mencionar que la calidad de los espectros de masas, y por lo tanto de los resultados de este análisis, depende de varios factores, tales como la cantidad y pureza de la muestra, la ocurrencia de supresión iónica, la fuente de ionización, y la resolución y sensibilidad del equipo, entre otros. En la mayoría de los casos de los péptidos estudiados en este trabajo se analizaron mezclas con componentes mayoritarios en cantidades pequeñas y que pudieron sufrir supresión iónica.

Es un hecho de que los venenos de los *Conus* representan una fuente rica en péptidos biológicamente activos, sin embargo no todos los péptidos que componen el veneno se encuentran presentes en la misma concentración, y algunos son muy poco abundantes. Además, la pérdida de material debida a los distintos pasos de purificación (Kaufenstein *et al.*, 2004) contribuye a la dificultad del estudio de estos compuestos. El problema principal que se presentó en la realización de este estudio fue la pérdida de material por purificación; si se observan los cromatogramas, se puede ver que en algunos casos hubo una pérdida de hasta el



90 % del material que originalmente se tenía disponible, lo cual nos impidió elaborar otros experimentos que se tenían contemplados (bioensayos). En la práctica, no es raro recuperar solo el 50% del material en cada paso de cromatografía, lo que deja 50, 25, 12.5 y 6.3% del material original después de 1, 2, 3 y 4 pasos de purificación, respectivamente. Sin embargo la cantidad de material resultante, nos permitió obtener las secuencias parciales de doce péptidos distintos y la secuencia completa de uno de ellos, así como información sobre las masas de cuatro péptidos.

El problema de la pérdida de material se podría resolver si se tuviera una cantidad grande de ejemplares de caracoles disponibles para la extracción del veneno, lo cual normalmente no ocurre, ya que la obtención de caracoles es un proceso caro, debido a que se requiere de buques camaroneros u oceanográficos o de buceo SCUBA para su colecta. Por esta razón el material que se extrae debe ser cuidadosamente trabajado con el fin de optimizar su uso. Una de las herramientas que han sido utilizadas con éxito para hacer estudios más completos (por ejemplo, para identificar blancos moleculares) es la de la producir artificialmente (mediante síntesis química o expresión en células procariontes y eucariontes) los péptidos, una vez que estos han sido caracterizados bioquímicamente; tal es el caso de algunos de los péptidos que se encuentran en las distintas etapas de la investigación clínica como la α -conotoxina Vc1.1 del caracol marino *C. victoriae* que ha demostrado ser muy útil contra el dolor neuropático periférico y para acelerar la recuperación de neuronas dañadas, y la ω -conotoxina CVID de *C. catus* que se pretende utilizar para tratar el dolor neuropático, además de que se ha demostrado que tiene mejores efectos que el Prialt (Livett *et al.*, 2004).

Otra de las herramientas que se utilizan para el caso de los péptidos de los que solo se puede obtener secuencias parciales, es la deducción de la secuencia completa a partir de la secuencia parcial obtenida químicamente, mediante clonación del ADNc y su secuenciación (Kaufenstein *et al.*, 2004). La secuencia completa de la toxina madura así obtenida puede sintetizarse en cantidades apropiadas mediante los métodos descritos en el párrafo anterior.

De las siete secuencias obtenidas de la sección A, dos mostraron similitud con las secuencias parciales que previamente había estudiado Meyer en el 2001 (Tabla 19).



Tabla 19. Secuencias parciales, peso molecular calculado y peso molecular experimental de tres de las fracciones de la sección "A" del cromatograma del extracto crudo comparadas con las secuencias obtenidas por Meyer en el 2001.

Péptido	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
MEYER	MPGCVHPCIPIVALCDYRRCPNYPSA *****	2872.41	3512.7
IIIaaaa	WPGCVHPCIPIVALCDYRRCPNYPSARCLPDYCVCGCFYRGCRLTCD WPGCVHPCIPIVALCDYRRCPNYPSAR	5606.56 3083.60	3081.37 3435.86 4153.86 6190.50
MEYER	NDDNSCLVYCCLEAFPLCFFAQVYXE *** ** * * * *	2903.36	8861.2
IIaaaa	AGDNSQLVYQQLKAFPTCCLAFLA	2574.99	Indefinido
Iaaaa	MPCFMGSC EGH CCCVSPNX	1901.25	3334.01- 3495.94

La secuencia que presentó mayor similitud con una de las estudiadas por Meyer fue la secuencia que corresponde al péptido "IIIaaaa". Al compararlos, se encontró que estos péptidos coinciden en 25 aminoácidos y solo se diferencian en el extremo amino, en donde el primer residuo es metionina (en el péptido de Meyer) en lugar de triptofano. Es posible que el péptido de Meyer y el "IIIaaaa" sean una variante del mismo péptido debido a su similitud y a que fueron purificados de fracciones similares del cromatograma de *C. delessertii*, sin embargo el valor por espectrometría de masas que obtuvo Meyer del péptido purificado se aleja del valor del peso calculado de su mismo péptido, lo que indica que la secuencia está incompleta (Tabla 19); lo mismo se aplica al péptido IIIaaaa.

Por otro lado la secuencia del péptido "IIaaaa" también presentó similitudes con una de las secuenciadas por Meyer: de los 24 aminoácidos comparables 13 fueron iguales.

El péptido "Iaaaa" presentó 18 aminoácidos en su secuencia parcial y no mostró similitud con ningún otro péptido antes estudiado (Tabla 19). En el caso de los tres péptidos anteriores no se encontraron evidencias de ninguna modificación postraduccional a pesar de que se ha reportado



que algunas familias de péptidos de *Conus* presentan un gran número de estas modificaciones (Buczek *et al.*, 2005).

Una vez obtenida la secuencia parcial, se realizó una comparación para determinar si alguna de las secuencias compartía similitudes con el arreglo de cisteínas de alguna de las superfamilias de las conotoxinas, y no se encontró ninguna coincidencia clara. En el péptido IIIaaaa se encontraron 10 cisteínas en un arreglo que podría sugerir que pertenece a la superfamilia S; sin embargo, esto no puede ser confirmado debido a que se desconoce si la estructura primaria está completa. En el caso del péptido "laaaa" aparentemente se encontraron 5 cisteínas; sin embargo, la posición 12 podría en realidad estar ocupada por una Gly, cuyo aumento pudo ser enmascarado por el de la Gly de la posición 10; si este fuera el caso, se trataría de 4 cisteínas en un arreglo que sugiere que pertenece a la superfamilia O de las conotoxinas (Kerr *et al.*, 1984); esta posibilidad no puede ser comprobada ya que se carece de la estructura primaria completa. Sin embargo, la presencia de O-conotoxinas en el vermívoro *C. delessertii* ya ha sido previamente descrita, con el caso de una posible γ - conotoxina (Aguilar *et al.*, 2005a). Por otro lado es posible que estos péptidos no se encuentren dentro de las superfamilias ya establecidas de conotoxinas; por esta razón, es necesario completar y confirmar la estructura primaria de los mismos para poder así determinar con seguridad si pertenecen o no a estas superfamilias.

Para tratar de determinar el peso molecular exacto de los péptidos "laaaa" "IIaaaa" y "IIIaaaa", se utilizó la espectrometría de masas y se obtuvieron los espectros mostrados en las Fig. 11, 15 y 20. La espectrometría de masas muestra diferentes pesos moleculares, algunos de los cuales corresponden a la contaminación con secuencias adicionales observadas durante la secuenciación de las muestras analizadas. El resultado de la espectrometría de masas se comparó con el peso molecular calculado y no se encontraron coincidencias; en el caso del péptido "laaaa" el valor de peso molecular obtenido con la secuenciación parcial queda muy por debajo de los valores que se obtuvieron en la espectrometría de masas, lo que indica que la secuencia está incompleta.

En el caso del péptido "IIIaaaa", el peso molecular obtenido de la secuencia parcial no concuerda con ninguno de los obtenidos en la espectrometría de masas y aunque se encontraron 49 aminoácidos en la secuencia principal no hay seguridad de que todos estos residuos pertenezcan a la misma, ya que al comparar los pesos moleculares obtenidos en la



espectrometría de masas con los pesos obtenidos de la secuencia parcial no se encontró ninguna coincidencia. Una posibilidad es que no todos los aminoácidos pertenecen a la secuencia principal; una razón que sugiere esto es que al hacer el cálculo del peso molecular hasta el aminoácido N° 27 (secuencia subrayada en la Tabla 18) el resultado (3083.60 Da) es muy cercano a uno de los valores encontrados en la espectrometría de masas (3081.37 Da); esto podría indicar que el péptido “IIIaaaa” está formado por 27 aminoácidos y 4 residuos de cisteína (Tabla 19), y que los aminoácidos presentes a partir del residuo 28 pertenecen a secuencias contaminantes. Recientemente se ha reportado que la presencia de péptidos con un arreglo de cuatro cisteínas puede ser un componente común en los componentes de venenos de caracoles vermívoros, además de que el arreglo y la conectividad de sus puentes disulfuro puede ser variable (Moller *et al.*, 2005). El arreglo de cuatro cisteínas separadas se ha descrito en la superfamilia J de las conotoxinas, de las cuales se ha reportado que bloquean canales de K⁺ activados por voltaje tipo Kv1.6 y también los receptores de acetilcolina $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ y $\alpha 3\beta 4$ (Imperial *et al.*, 2006); este arreglo de Cys también ha sido encontrado en la superfamilia L, de la cual la toxina It14a es un antagonista de receptores nicotínicos de las células PC12 (Peng *et al.*, 2006). Haciendo una comparación del péptido “IIIaaaa” (tomando en cuenta los primeros 27 residuos) con algunos péptidos reportados de la superfamilia J (Tabla 20), podemos observar que además de presentar cuatro residuos de cisteína en su estructura primaria, el arreglo de cisteínas varía en comparación al que presenta una de las toxinas de *C. geographus* (Olivera *et al.*, 1990) y a las toxinas que se caracterizaron de *C. floridanus floridanus*, *C. villepini* y *C. planorbis* (Moller *et al.*, 2005 ; Imperial *et al.*, 2006).

Tabla 20. Algunas conotoxinas de la Superfamilia J comparados con el péptido IIIaaaa.

Péptido	Estructura Primaria	Especie
IIIaaaa	WPGCVHPCIPIVALCDYRRCPNYPSAR	<i>C. delessertii</i>
pl14a	FPRPRICNLACRAGIGHKYPFCHCR	<i>C. planorbis</i>
vill4a	GGLGRCIYNCMNSGGGLSFIQCKTMCY	<i>C. villepini</i>
flfl4a	WDVNDCIHFCLIGVVERSYTECHTMCT	<i>C. floridanus floridanus</i>
-----	KFLSGGFKγIVCHRYCAKGIACEFCNCPD	<i>C. geographus</i>

De las purificaciones realizadas con los péptidos “Iba” “Ilba” “Ilca” y “IVaaa” se obtuvieron las secuencias parciales que se muestran en la Tabla 21. Estos péptidos tienen varios residuos de



cisteína. En el caso del péptido "IIba" el arreglo de cisteínas podría sugerir que es un péptido de la superfamilia O de las conotoxinas. Por otro lado, a pesar de su parecido con el péptido Iba, el arreglo de cisteínas que presenta el péptido "Iba" no corresponde a alguno antes descrito, por lo que el péptido no pudo ser colocado como miembro de alguna familia de conotoxinas. En los otros dos casos, dado que las secuencias no están completas quedan abiertas varias posibilidades, en el caso del péptido "IIca" el arreglo de cisteínas podría sugerir que pertenece, ya sea a la superfamilia A o a la superfamilia M de las conotoxinas. El péptido "IVaaa" tiene la particularidad de que solo presentó un residuo de cisteína en la posición 20. La presencia de una modificación postraducciona se hizo evidente en el péptido IIba que presentó carboxilación del glutamato en la posición 9 (Tabla 21).

Tabla 21. Secuencias parciales de las fracciones correspondientes a la sección "A" del cromatograma del extracto crudo, Peso molecular calculado con base en el peso molecular de cada uno de los residuos obtenidos en la secuenciación.

γ = gammacarboxiglutamato; \times = residuo no identificado.

Péptido	Estructura Primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Iba	MPQFMGSTEIHGVSGLSCKFCCTCYGA	2941.40	Indefinido
IIba	MPQFMDST γ IGVCGSLSCKFCCTCYVGXQ	3078.54	8875.0 8893.0
IIca	XDDNSRLVYCCLKAFPTCPLACVPK	2653.14	3000.0 3042.0
IVaaa	XVSIQSQLDYTTSEDAYTF \times CAR \times FYPCCA \times VVCIP \times PNEYERTISNR	2389.53 1212.50 1378.43	Indefinido

Una vez obtenidas las secuencias parciales, se calculó el peso molecular de los péptidos y el resultado se muestra en la Tabla 21; estos valores no muestran el peso molecular real de los péptidos ya que solo están calculados con base en el peso de los residuos que se observan en la secuencia primaria. Así mismo se realizó la espectrometría de masas de los péptidos y no se pudo definir el peso molecular de dos de ellos debido a que los espectros no fueron de buena calidad por la contaminación y la poca cantidad de muestra. En el caso del péptido "Iba" el valor del pico máximo en la espectrometría es, aparentemente, de 3514.0 Da (aunque este valor no es del todo seguro, ya que la señal es de muy baja intensidad), el cual queda por encima del valor de peso molecular calculado e indicaría que la secuencia está incompleta. Por otro lado el



péptido “Ilba” presenta un valor máximo en la espectrometría de masas de 8893.0 Da, valor que queda muy por encima del valor del peso molecular calculado de la secuencia parcial. En el caso del péptido “Ilca” se presentaron dos masas moleculares principales con diferencia de 42, es posible que esta diferencia se deba a una tri-metilación o a una acetilación del péptido, sin embargo los valores de espectrometría de masas están por encima del valor de peso molecular calculado, lo que indica que la secuencia del péptido está incompleta. En el caso del péptido “IVaaa”, en el cual se observó una secuencia mayoritaria y dos minoritarias, no se pudo interpretar el espectro de masas ya que no se pudo definir el “envelope” de cargas y por tanto no se pudo realizar la desconvolución de la masa debido a la alta contaminación de la muestra y a la poca cantidad presente del péptido. Aunque ninguna de las secuencias anteriores está completa, los residuos de cisteína de los péptidos Ilca y el primer péptido minoritario del pico IVaaa sugieren que podrían pertenecer a las superfamilia A o M, mientras que los péptidos Iba y Ilba, al parecer, tienen arreglos de cisteínas distintos de los conocidos hasta el momento.

En el caso de la sección “B” del cromatograma del extracto crudo se obtuvieron 6 secuencias parciales, cinco de las cuales se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Secuencias parciales de las fracciones correspondientes a la sección “B” del cromatograma del extracto crudo, Peso molecular calculado con base en el peso molecular de cada uno de los residuos obtenidos en la secuenciación.

γ = gammacarboxiglutamato, W=bromotriptofano.

Péptido	Secuencia parcial	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
4-587-589-1	AGCDOQONGSWCGLCOLCC γ SGFCVCF CXS	3150.44	No determinado
Ba	AGCDOQONGSWCGLCODCCQ C SFY	2675.74	Indefinido
Bca	AGCDOQONGSW <u>C</u> G	1299.12	Indefinido
Bcb	AGCDOQONGSWCGL <u>C</u> O	1729.68	Indefinido
Bcc	AGCDOQONGSWCGLCOLCCXSGFCQDQ X	2810.91	Indefinido
Bda	AGCDOQONGSWC <u>G</u> QLOLOQDQ	2239.16	Indefinido



En el caso de los cinco péptidos de la sección B presentados en la tabla anterior es preciso resaltar que existe un gran parecido entre las estructuras primarias encontradas. Además, todas ellas son muy similares a las del péptido 4-587-589-1 caracterizado por López. En todos los casos se encontró la presencia de residuos de cisteína y de bromación del triptofano. Haciendo una comparación entre los péptidos podemos decir que no se presenta ninguna diferencia entre todos ellos sino, aparentemente, a partir del residuo doce. En el caso del péptido “Bca” ya no hubo la posibilidad de seguir comparando ya que de éste péptido solo se obtuvieron doce residuos. Sin embargo los péptidos “Ba” y “Bcb” siguieron siendo similares hasta el aminoácido 16, mientras que los péptidos “Bcc” y “Bda” mostraron diferencias a partir del aminoácido 14. Los péptidos en donde más residuos se obtuvieron durante la secuenciación fueron el “Bcc” con 26 aminoácidos identificados y el “Ba” con 24 aminoácidos; sin embargo, al compararlos observamos que a partir del aminoácido número 17 presentan diferencias en algunas posiciones.

La similitud que existe entre estos péptidos no es poco común dentro de los venenos de los *Conus*. A pesar de que se ha mencionado que la parte madura de la toxina es hipervariable, la posición de las cisteínas se conserva cuando se trata de péptidos de la misma familia (Zhangsung *et al.*, 2006). En el caso de los péptidos mostrados en la Tabla 22, se puede pensar que podrían pertenecer a la misma familia de conotoxinas ya que en la mayoría de los casos se conserva la posición de varias cisteínas. Dado el gran parecido de los cinco péptidos de la sección B con el péptido 4-587-589-1 caracterizado por López, es muy probable que el arreglo de cisteínas de dichos péptidos sea igual al de éste; si no hay más residuos de cisteína en el péptido 4-587-589-1, su arreglo de cisteínas sería similar al del péptido de 13a, caracterizado también a partir del veneno de *C. delessertii* (Aguilar *et al.*, 2005b), aunque con diferentes números de residuos intercisteína. En ninguno de los péptidos mostrados en la Tabla 22 se pudo definir el peso molecular por espectrometría de masas. El “envelope” de cargas no pudo ser definido porque no se logró hacer la desconvolución de las masas; se cree que esto es debido a la poca cantidad del péptido mayoritario presente en las muestras (20-64 pmol), y a la formación de agregados de alto peso molecular. Este último fenómeno solo se presentó en los últimos cuatro péptidos mostrados en la Tabla 22, y no se tiene una explicación aceptable para él. Una posibilidad es que se trate de agregados covalentes mediante puentes disulfuro intermoleculares; sin embargo, los péptidos siempre estuvieron en medio ácido, el cual impide el



intercambio de disulfuros que podría dar origen a los agregados covalentes. Otra posibilidad es que se trate de agregados no covalentes; ya que estos péptidos son hidrofóbicos, es probable que la agregación se deba a interacciones hidrofóbicas muy fuertes; sin embargo, no es común que los agregados no covalentes se mantengan intactos durante el proceso de ionización de la espectrometría de masas.

El péptido “Bba” es la sexta secuencia de la sección B del cromatograma del extracto crudo. Esta secuencia no mostró similitud con las otras cinco, por esta razón no fue incluida en la comparación que se realizó en la Tabla 22. El péptido “Bba” fue el único péptido del cual que se obtuvo la secuencia completa, con un total de 28 residuos, seis de los cuales corresponden a cisteínas. El peso molecular calculado corresponde claramente a la señal más alta de espectrometría de masas (3095.0 Da), razón por la cual podemos decir que éste péptido está completo. Uno de los detalles que podemos observar del espectro de masas que se obtuvo de este péptido (Fig. 25) es la presencia de varias señales, las cuales, en algunos casos, deben corresponder a contaminación de la muestra por secuencias adicionales que no pudieron ser interpretadas; sin embargo, hay evidencia de que en cuatro de los casos corresponden a variantes postraduccionales del mismo péptido que se presentan en la muestra, en orden decreciente de abundancia aparente (Tabla 23):

1) La intensa señal con valor de 3138.0 Da: si se considera que la variante de 3095.0 Da contiene en la posición 7 un residuo de gammacarboxiglutamato en lugar del glutamato (como se describió en la sección correspondiente de Resultados), se obtiene un valor de 3139.0 Da, lo que explica la diferencia de masas de 44.0 Da ($3095.0 + 44.0 = 3139.0$). Por lo tanto podemos decir que el glutamato fue modificado postraduccionalmente a gammacarboxiglutamato en casi la mitad de las moléculas presentes en el péptido Bba.

2) La señal con valor de 3110.57 Da: en este caso se calculó el peso molecular suponiendo que la variante de 3095.0 Da presenta en la posición 4 una hidroxiprolina en lugar de la prolina (como se describió en la sección correspondiente de Resultados), lo que da un valor de 3111.0 Da ($3095.0 + 16.0$).

3) La señal con valor de 3155.0 Da: si se considera que la variante de 3138.0 Da (que presenta gammacarboxiglutamato en la posición 7) contiene en la posición 4 un residuo de hidroxiprolina en lugar de prolina (como se describió en la sección correspondiente de Resultados), se obtiene



un valor de 3154.0 Da, lo que explica razonablemente la diferencia de masas experimentales de 17.0 Da (3155.0 – 3138.0 = 17.0).

4) La señal con valor de 3078.0 Da: en este caso se calculó el peso molecular suponiendo que la variante de 3095.0 Da presenta en la posición 14 una prolina en lugar de hidroxiprolina (como se describió en la sección correspondiente de Resultados), lo que da un valor de 3079.0 Da (3095.0 – 16.0), que concuerda bien con el valor experimental.

Tabla 23. Variantes del Péptido “Bba”

Péptido	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons)	Peso molecular experimental (Daltons)
Bba	DCIPGGENC DVFROYR CCSGYCILLCA	3094.58	3095.0
Variante 1	DCIPGGγNC DVFROYR CCSGYCILLCA	3138.58	3138.0
Variante 2	DCIOGGENC DVFROYR CCSGYCILLCA	3110.57	3111.0
Variante 3	DCIOGGγNC DVFROYR CCSGYCILLCA	3154.57	3155.0
Variante 4	DCIPGGENC DVFRPYR CCSGYCILLCA	3078.59	3078.0

Una de las características importantes que se observó durante la secuenciación del péptido “Bba” fue que, presentó un arreglo de cisteínas que sugiere pertenece a la superfamilia O de las conotoxinas. Diferentes péptidos de distintas especies de caracoles piscívoros así como molusquívoros han sido clasificados dentro de esta superfamilia. Sin embargo, han sido pocos los péptidos de caracoles vermívoros que han sido clasificados dentro de la superfamilia O, tales como: de7a, as7a y sr7a de *C. delessertii*, *C. austini* y *C. spurius*, respectivamente (Aguilar *et al.*, 2005a; Zugasti-Cruz *et al.*, 2006; Luna-Ramírez *et al.*, 2007). La superfamilia O de las conotoxinas se divide en cinco familias que tienen diferente actividad farmacológica a pesar de que poseen el mismo arreglo de cisteínas. En la Tabla 24 se muestra una comparación del péptido “Bba” con las conotoxinas mencionadas que pertenecen, aparentemente, a la superfamilia O de las conotoxinas.

Tabla 24. Secuencia del péptido “Bba”, correspondiente a la sección “B” del cromatograma del extracto crudo, comparada con otras O-conotoxinas de caracoles vermívoros. &, = extremo amino amidado; γ = gamma-carboxi-Glu; O = hidrox-Pro.

Péptido	Estructura primaria	Especie
sr7a	CLQFGSTCFLGDDDI CCSECFYSGGTFGICS&	<i>C. spurius</i>



as7a	TCKQKGEGCSLDV γ CCSSCKPGGPLDFDC	<i>C. austini</i>
de7a	ACKOKNNLCAIT γ MA γ CCSGFCLYRC	<i>C. delessertii</i>
Bba	DCIPGGENCDFVROYRCCSGYCILLLCA	<i>C. delessertii</i>

Como se puede observar en la Tabla 24, el péptido “Bba” comparte el arreglo de cisteínas con las toxinas antes estudiadas de *C. spurius* (Luna-Ramírez *et al.*, 2007), *C. austini* (Zugasti-Cruz *et al.*, 2006) y *C. delessertii* (Aguilar *et al.*, 2005a). En el caso del péptido aislado de *C. spurius* se menciona que tiene actividad en ratones causándoles hiperactividad y parálisis cuando se inyecta en moluscos. Por otro lado los péptidos aislados de *C. austini* y *C. delessertii* se cree que tienen efecto en canales catiónicos no específicos activados por voltaje tipo marcapasos, por la similitud que presentan con la γ -conotoxina de *C. pennaceus* (Fainzilber *et al.*, 1998). Además presentan similitud con δ y ω conotoxinas de especies molisquívoras del Indopacífico sugiriendo que pueden afectar canales de Na⁺ y de Ca²⁺. Aunque el péptido “Bba” comparte el mismo arreglo de cisteínas que las O-conotoxinas y tiene algunos residuos que se presentan en la misma posición, es difícil predecir si este péptido tiene la misma actividad que presentan los péptidos antes mencionados. Por tal razón sería necesario hacer bioensayos que determinen la actividad de este péptido.



8. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron siete secuencias parciales de la sección A y cinco secuencias parciales de la sección B del cromatograma del extracto del conducto venenoso de *C. delessertii*.
- Se obtuvieron las secuencias completas de 5 variantes del péptido "Bba"
- El péptido "Bba" pertenece, aparentemente, a la superfamilia O de las conotoxinas.
- Es probable que la secuencia del péptido "IIIaaaa" esté completa.
- Excepto en el caso del péptido "IVaaa", los péptidos mostraron poca contaminación por la presencia de secuencias adicionales.
- No se pudo definir el peso molecular de nueve de los trece péptidos purificados debido a que algunas de las muestras contenían poca cantidad de péptidos y no fue material suficiente para los análisis de espectrometría de masas. En cuatro casos al parecer se formaron agregados de alto peso molecular con espectros no interpretables.
- Es posible que algunos de los péptidos pertenezcan a nuevas superfamilias de conotoxinas.

Nota: la caracterización del péptido "Bba" fue publicada en enero del presente año, a continuación citamos la referencia.

Aguilar M.B., Flores-Torres A., Batista C.V.F., Falcón A., López-Vera E. y Heimer de la Cotera E.P. 2009. Structural characterization of five post-translationally modified isomorphs of a novel putative δ -conotoxin from the vermivorous snail *Conus delessertii* from the Mexican Caribbean Sea. *Peptides* 30:458-466



9. PERSPECTIVAS

A lo largo del presente trabajo se ha mencionado y resaltado la importancia del estudio de las conotoxinas en diferentes áreas. Desde el punto de vista biológico las toxinas han sido una herramienta para entender algunos de los procesos de selección natural que han actuado sobre los caracoles *Conus* durante la evolución. Además, las toxinas han mostrado tener gran potencial en el área de la neurología por su capacidad de ser ligandos altamente selectivos de los canales iónicos del sistema nervioso central de mamíferos. Por otro lado, en la farmacología son importantes por su potencial para descubrir y crear nuevos medicamentos para tratar diversas enfermedades.

A pesar de que diferentes grupos de investigación en el mundo han dedicado muchos esfuerzos al estudio de las conotoxinas, existen numerosos casos en que el mecanismo de acción de las toxinas se desconoce, aunque ellas mismas ya han sido caracterizadas químicamente.

A nivel del género, se han descubierto alrededor de 1000 toxinas mediante purificación y clonación. Si se considera que existen 500 especies de *Conus* y que cada una de ellas produce 100 toxinas distintas, faltarían alrededor de 49000 conotoxinas por ser descubiertas. Así mismo el número de toxinas de especies mexicanas que queda por descubrir es muy grande y queda mucho por hacer en este campo ya que en México solo se han caracterizado químicamente, de manera completa, 13 toxinas (incluyendo al péptido Bba reportado en esta Tesis).

Existen varios aspectos que deben ser considerados a futuro para poder seguir estudiando estas toxinas. Se ha observado durante las campañas oceanográficas que se realizan para la obtención de organismos que las poblaciones de *Conus* no son tan abundantes como se podría desear; por esta razón la extracción de estos organismos de su hábitat puede tener un impacto negativo en las poblaciones de caracoles e inclusive en las comunidades de especies que conviven con los *Conus*, alterando el equilibrio ecológico del bentos. Así, dado que el impacto sobre las comunidades de organismos en donde no se han realizado estudios ecológicos es incierto, es de importancia fundamental realizar estudios ecológicos enfocados en la abundancia,



tasa de reproducción, depredación etc., de las especies mexicanas para asegurarse de que la captura de éstas con fines de investigación no representa un peligro para su supervivencia.

Otra de las áreas que debe ser cubierta es la de la síntesis de conotoxinas, ya sea mediante síntesis química o por medio de estrategias de biología molecular como es la síntesis de los genes y su subclonación in Vitro para su expresión en células procariontes. Esto representaría una ventaja en dos sentidos: 1) se podría omitir el sacrificio adicional de caracoles para la obtención del veneno; 2) las toxinas se podrían producir en gran cantidad para estudiarlas detalladamente (estructura tridimensional, mecanismo de acción, afinidad hacia diferentes tipos y subtipos de blanco molecular), con el fin de encontrar o diseñar herramientas moleculares y medicamentos. Dadas algunas de las características de las conotoxinas (modificaciones postraduccionales y los puentes disulfuro) la síntesis de conotoxinas no representa una tarea fácil, sobre todo la de aquellas que presentan mayor cantidad de puentes disulfuro y modificaciones postraduccionales; sin embargo, aún no sabemos el efecto de las modificaciones postraduccionales en la actividad biológica.

Hasta el momento, en la mayoría de los trabajos realizados en México solo se ha hecho la caracterización química de los péptidos. Esto es de suma importancia, pero falta hacer estudios electrofisiológicos para identificar la actividad sobre canales iónicos, transmisores y receptores que presentan los diferentes péptidos. Aunque en algunos casos se puede inferir tentativamente la actividad de una conotoxina basándose en el patrón de cisteínas, no se tiene la seguridad de que las toxinas que presentan características estructurales similares tengan como blanco los mismos canales iónicos o receptores. Debido a la alta selectividad de las conotoxinas por diferentes subtipos de blancos moleculares, es importante seguir trabajando con los estudios de electrofisiología para poder determinar cuáles conotoxinas son potencialmente útiles. El estudio de las conotoxinas como herramientas en el estudio de canales iónicos es un campo que debe ser más explorado. Existen toxinas que han servido para determinar la presencia de ciertos canales e inclusive para entender mejor el funcionamiento de ciertos receptores.

Una de las tareas que es de gran interés, sería la de contribuir con una base de datos o una biblioteca de datos de las distintas conotoxinas de las especies mexicanas que se han estado descubriendo en esta última década en México. Esta base de datos junto con la que ya se está



elaborando a nivel mundial resultaría en un recurso muy útil en el campo de la toxicología de los caracoles *Conus*.



10. LITERATURA CITADA

- Abbott R.T. y Dance S.P. 1998. *Compendium of seashells. A full-color guide to more than 4,200 of the world's marine shells*. Odyssey Publishing. El Cajon CA. 411 pp.
- Adams D.J., Smith A.B., Schroeder Ch.I., Yasuda T. y Lewis R.J. 2003. ω -conotoxin CVID inhibits a pharmacologically distinct voltage-sensitive calcium channel associated with transmitter release from preganglionic nerve terminals. *J. Biol. Chem.* 278: 4057-4062.
- Aguilar M. B., López-Vera E., Imperial J. S., Falcón A., Olivera B. M. y Heimer de la Cotera E. P. 2005a. Putative γ -conotoxins in vermivorous cone snails: the case of *Conus delessertii*. *Peptides* 26: 23-27.
- Aguilar M. B., López-Vera E., Ortiz E., Becerril B., Possani L. D., Olivera B. M. y Heimer de la Cotera E.P. 2005b. A novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry* 44: 11130-11136.
- Aguilar M.B., Lezama-Monfil. L., Maillo M., Pedraza-Lara H., López-Vera E. y Heimer de la Cotera E.P. 2006. A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides* 27: 500-505.
- Aguilar M.B., López-Vera E., Heimer de la Cotera E.P., Falcón A., Olivera B.M. y Maillo M. 2007. I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: Peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides* 28: 18-23.
- Aguilar M.B., Luna-Ramírez K.S., Echeverría D., Falcón A., Olivera B.M., Heimer de la Cotera E.P. y Maillo M. 2008. Conorfamidae-Sr2, a gamma carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and molluscs. *Peptides* 29: 186-195.



- Aneiros A. y Garateix A. 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J. Chromatogr.* 803: 41-53
- Barbier J., Lamthanh H., Le Gall F., Favreau P., Benoit E., Chen H., Gilles N., Llan N., Heinemann S.H., Gordon D., Ménez A. y Molgó J. 2005. δ -conopeptide EVIA isolated from *Conus ermineus* is a new pharmacological tool for discriminating sodium channel subtypes. *J. Physiol.* 99: 2-3.
- Brusca R.C. y Brusca G.J. 1990. *Invertebrates*. Sinauer associates. 922 pp.
- Buczek O., Bulaj G. y Olivera B. M. 2005a. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 3067-3079.
- Buczek O., Yoshikami D., Watkins M., Bulaj G., Jimenez E.C. y Olivera B.M. 2005b. Characterization of D-amino-acid-containing excitatory conotoxins and redefinition of the I-conotoxin superfamily. *FEBS J.* 272: 4178-4188.
- Buczek O., Wei D., Babon J.J., Yang X., Fiedler B., Chen P., Yoshikami D., Olivera B.M., Bulaj G y Norton R.S. 2007. Structure and sodium channel activity of an excitatory I1-superfamily conotoxin. *Biochemistry* 46: 9929-9940.
- Bulaj G., Buczek O., Goodsell I., Jimenez E.C., Kranski J., Nielsen J.S., Garrett J.E. y B.M. Olivera. 2003. Efficient oxidative folding of conotoxins and the radiation of venomous cone snails. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:14562-14568.
- Calderón C.R. y Field C.J.J. 1999. Envenenamiento por contacto con caracol *Conus*. *Rev. Mex. Pue. y Ped.* 7: 2-4.
- Carté B. K. 1996. Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience* 46: 271-286.



- Cortéz L.M., del Canto S.G., Testai F.D. y Biscoglio de Jiménez Bonino M.J. 2002. Conotoxin MI inhibits the α - δ acetylcholine binding site of the torpedo marmorata receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 791-795.
- Craig A.G., Norberg T., Griffin D., Hoeger C., Akhtar M., Schmidt K., Low W., Dykert J., Richelson E., Navarro V., Mazella J., Watkins M., Hilyard D., Imperial J., Cruz L.J. y Olivera B.M. 1999. Contulakin-G, an O-Glycosylated Invertebrate Neurotensin. *J. Biol. Chem.* 274: 13752-13759.
- Cruz L.J., Gray W.R., Yoshikami D. y Olivera B.M., 1985. Conus venoms a rich source of neuroactive peptides. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* 4: 107-132.
- Cruz L.J. y White J. 1995. *Clinical toxicology of Conus snail stings*, In: *Clinical Toxicology of animal Venoms*, ed. J. Meier and J. White, Boca ratón, pp. 117-127.
- Dowell Ch., Olivera B.M., Garrett J.E., Staheli S.T., Watkins M., Kuryatov A., Yoshikami D., Lindstrom J. M. y McIntosh J.M. 2003. α -conotoxin PIA is selective for α 6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 23: 8445-8452.
- Ellison M., McIntosh J.M. y Olivera B.M. 2003. α - conotoxins Iml and Imll: similar α 7 nicotinic receptor antagonist act at different sites. *J. Biol. Chem.* 278: 757-764.
- England L. J., Imperial J., Jacobsen R., Craig A.G., Gulyas J., Akhtar M., Rivier J., Julius D. y Olivera B.M. 1998. Inactivation of serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* 281: 575-578.
- Fainzilber M., Gordon D., Hasson, A., Spira ME. y Zlotkin E. 1991. Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *Eur J Biochem.* 202:589-595.
- Fainzilber M., Nakamura T., Lodder J.C., Zlotkin E., Kits K.S. y Burlingame A.L. 1998. γ -conotoxin-PnVIIA, a gamma-carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry* 37:1470-1477



- Fan Ch. X., Chen X. K., Zhang Ch., Wang L. X., Duan K.L., He L.L., Cao Y., Liu S.Y., Zhong M. N., Ulens Ch., Tytgat J., Chen J.S., Chi C. W. y Zhou Z. 2003. A novel conotoxin from *Conus betulinus*, κ -Btx, Unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator. *J. Biol. Chem.* 278: 12624-12633.
- Faulkner D.J. 2000. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 135-145.
- Favreau P., Gilles N., Lamthanh H., Bournaud R., Shimahara T., Bouet F., Labute P., Letouneux Y., Ménez A., Molgó J. y Le Gall F. 2001. A new ω -conotoxin that targets N-type voltage-sensitive calcium channels with unusual specificity. *Biochemistry* 40: 14567-14575.
- Ferber M., Sporning A., Jeserich G., De la Cruz R., Watkins M., Olivera B.M. y Terlau H. 2003. A novel *Conus* peptide ligand for K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 278: 2177-2183.
- Floeter S.R. y Soares-Gomes A. 1999. Biogeographic and species richness patterns of Gastropoda on the southwestern Atlantic. *Rev. Bras. Biol.* 59: 567-575.
- Gray W.R., Olivera B.M. y Cruz L.J. 1988. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 665-700.
- Haack J.A., Rivier J., Parks T.N., Mena E.E., Cruz L.J. y Olivera B.M. 1990. Conantokin-T. A γ -carboxyglutamate containing peptide with N-methyl-D-aspartate antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 265: 6025-6029.
- Halvorson H.O. 1998. Aquaculture, marine sciences and oceanography: A confluence connection. *New England J. High. Edu. & Econ. Devel.* 13: 28-42.
- Hammerland L.G., Olivera B.M. y Yoshikami D. 1992. Conantokin-G selectively inhibits N-methyl-D-aspartate-induced currents in *Xenopus* oocytes injected with mouse brain mRNA. *J. Pharmacol.* 226: 239-244.
- Han Y.H., Wang Q., Jiang H., Miao X.W., Chen J.S. y Chi C. W. 2005. Sequence diversity of T-superfamily conotoxins from *Conus marmoreus*. *Toxicon* 45: 481-487.



- Hann R. M., Pagan, O. R. y Eterovic, V.A. 1994 The alpha-conotoxins GI and MI distinguish between the nicotinic receptor agonist sites while SI does not. *Biochemistry* 33:14058-14063.
- Hansson K., Ma X., Eliasson L., Czerwiec E., Furie B., Furie B.C., Rorsman P. y Stenflo J. 2004. The first γ -carboxyglutamic acid-containing contryphan. A selective L-type calcium ion channel blocker isolated from the venom of *Conus marmoreus*. *J Biol Chem* 279:32453-32463.
- Heinemann S.H. y Leipold E. 2007. Conotoxins of the O-superfamily affecting voltage-gated sodium channels. *Cell. Mol. Life Sc.* 64: 1329-1340.
- Hoffman E. y Stroobant V. 2007. Mass spectrometry: Principles and applications. 3rd Edition. USA. Wiley, John & Sons, Incorporated. 528 pp.
- Imperial J.S., Bansal P.S., Alewood P F., Daly N. L., Craik D.J., Sporning A., Terlau H., López-Vera E., Bandyopadhyay P.K. y Olivera B.M. 2006. A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry* 45: 8331-8340.
- Jacobsen R., Jimenez E.C., Grilley M., Watkins M., Hillyard D., Cruz L.J. y Olivera B.M. 1998. The contryphans, a D-tryptophan-containing family of *Conus* peptides: interconversion between conformers. *J. Peptide Res.* 51: 173-179.
- Jacobsen R.B., Jimenez E.C., C De la Cruz R.G., Gray W.R., Cruz L.J. y Olivera B. M. 1999. A novel D-Leucine-containing *Conus* peptide: diverse conformational dynamics in the contryphan family. *J. Peptide Res.* 54: 93-99.
- Jha K.R. y Zi-rong X. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar. Drugs* 2: 123-146.



Jimenez E.C., Olivera B.M., Gray W.R. y Cruz L.J. 1996. Contryphan is a D- tryptophan containing *Conus* peptide. *J. Biol. Chem.* 271: 28002-28005.

Jimenez E.C. Donevan S., Walter C., Zhou L.M., Nielsen J., Cruz L.J., Armstrong H., White H.S. y Olivera B.M. 2002. Conantokin-L, a new NMDA receptor antagonist: determinants for anticonvulsant potency. *Epilepsy Research* 51: 73-80.

Jimenez E.C., Reshma S., Lirazan M., Rivier J., Walter C., Abogadie Fe.C., Yoshikami D., Cruz L.J. y Olivera B.M. 2003. A novel excitatory *Conus* peptides define a new conotoxin superfamily. *J. Neurochem.* 85: 610-621.

Jones M.R. y Bulaj G. 2000. Conotoxins-New Vistas for Peptide Therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 6: 1249-1285.

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

Kaufenstein S., Huys I., Lamthanh H., Stöcklin R., Sotto F., Menez A., Tytgat J. y Mebs D. 2003. A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* 42: 43-52.

Kaufenstein S., Huys I., Kuch U., Melaun Ch., Tytgat J. y Mebs D. 2004. Novel conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails. *Toxicon* 44: 539-548.

Kerr L. M. y Yoshikami D. 1984. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 308:282-284.

Kijjoa A. y Sawangwong P. 2004. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar. Drugs* 2: 73-82.

Kohn J.A., Saunders R.P. y Wiener S. 1960. Preliminary studies on the venom of the marine snail *Conus*. *Ann. NY Acad. Sci.* 90: 706-725.



- Lirazan M.B., Hooper D., Corpuz G.P., Ramilo C.A., Bandyopadhyay P., Cruz L.J y Olivera B.M. 2000. The spasmodic peptide defines a new conotoxin superfamily. *Biochemistry* 39: 1583-1588.
- Livett B.G., Gayler K.R. y Khalil Z. 2004. Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 11: 1715-1723.
- López -Vera J. E. 2000. Purificación y caracterización de toxinas extraídas de caracoles marinos del género *Conus*. Tesis de Maestría. Instituto de Neurobiología, UNAM. 45 pp.
- López- Vera J.E., Aguilar M.B., Schiavon E., Marini C., Ortiz E., Restano Cassulini R., Batista C.V., Possani L.D., Heimer de la Cotera E.P., Peri F., Becerril B. y Wanke E. 2007. Novel α -conotoxins from *Conus spurius* and the α -conotoxin EI share high affinity potentiation and low affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS J.* 274: 3972-3985.
- Loughnan M., Bond T., Atkins A., Cuevas J., Adams D.J., Broxton N.M., Livett B.G., Down J.G., Jones A., Alewood P.F. y Lewis R.J. 1998. α - Conotoxin Epl, a novel sulfated peptide from *Conus episcopatus* that selectively targets neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 273: 15667-15674.
- Luna-Ramírez K. S., Aguilar M. B., Falcón A., Heimer de la Cotera E.P., Olivera B. M. y Maillo M. 2007. An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. *Peptides* 28: 24-30.
- Maillo M., Aguilar M.B., López-Vera E., Craig A.G., Bulaj G., Olivera B.M. y Heimer de la Cotera E. P. 2002. Conorfamide a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon* 40: 401-407.
- Malacolog Version 4.1.0. A Database of Western Atlantic Marine Mollusca. The Academy of Natural Sciences. <http://www.malacolog.org/>.



- Massilia G.R., Eliseo T., Grolleau F., Lapied B., Barbier J., Bournaud R., Molgó J., Cicero DO., Paci M., Schininà M.E., Ascenzi P. y Polticelli F. 2003. Contryphan-Vn: a modulator of Ca^{2+} dependent K^+ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 303:238-246.
- McCarthy P.J. y Pomponi S.A. 2004. A search for new pharmaceutical drugs from marine organisms. *Mar. Biomed. Res.* 1-2.
- McDonoug S.I., Boland L.M., Mintz I.M. y Bean B.P. 2002. Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *J. Gen. Physiol.* 119: 313-328.
- McIntosh, J.M., Olivera B.M., Cruz L.J. y Gray W.R. 1984. γ -Carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J. Biol. Chem.* 259: 14343-14346.
- McIntosh M.J., Ghomashchi F., Gelb M. H., Dooley D.J., Stoehr S.J., Giordani A.B. Naisbitt S.R. y Olivera B.M. 1995. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* 270: 3518-3526.
- McIntosh M.J., Santos D.A. y Olivera B.M. 1999. *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 58-88.
- McIntosh J.M., Dowell Ch., Watkins M., Garrett J.E., Yoshikami D. y Olivera B.M. 2002. α -Conotoxin GIC from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 33610-33615.
- Mena E.E., Gullak M.F., Pagnozzi M.J., Richter K.E., Rivier J., Cruz L.J. y Olivera B.M. 1990. Conantokin-G: a novel peptide antagonist to the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor. *Neuroscience Letters* 118: 241-244.
- Meiglitsch P.A. 1972. *Invertebrate Zoology*. 2nd Ed. Oxford University Press. New York. 834 pp.
- Meyer L. 2001. Characterization of the venom of the marine snail *Conus delessertii*. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin. 73 pp.



- Miles L.A., Dy C.Y., Nielsen J., Barnham K.J., Hinds M.G., Olivera B.M., Bulaj G. y Norton R.N. 2002. Structure of a novel P-superfamily spasmodic conotoxin reveals an inhibitory cysteine knot motif. *J. Biol. Chem.* 277: 43033-43040.
- Moller C., Rahmankhah S., Lauer-Fields J., Bubis J., Fields G.B. y Mari F. 2005. A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs α/α) fold. *Biochemistry.* 44: 15986-15996.
- Mondal S., Vijayan R., Schichia K., Babu R. M. y Ramakumar S. 2005. I-superfamily conotoxins: sequence and structures analysis. *In Silico Biology* 5: 557-571.
- Myers A. R., McIntosh M.J., Imperial J., Williams W.R., Oas T., Haack J.A. Hernández J.F., Rivier J., Cruz L.J. y Olivera B.M. 1990. Peptides from *Conus* venoms which affect Ca(++) entry into neurons. *J. Toxicol.* 9: 179-202.
- Nakamura T., Yu Z., Fainzilber M. y Burlingame L. 1996. Mass spectrometric: based revision of the structure of a cysteine-rich peptide toxin with gamma-carboxyglutamic acid, TxVIII, from the sea snail, *Conus textile*. *Protein Sci.* 5: 524-530
- Nicke A., Loughnan M.L., Millard E.L., Alewood P.F., Adams D.J., Daly N.L., Craik D. J. y Lewis R.J. 2003. Isolation, structure and activity of GID, a novel $\alpha 4/7$ - conotoxin with an extended N-terminal sequence. *J. Biol Chem.* 278: 3137-3144
- Nielsen D.B., Dykert J., Rivier J.E. y McIntosh J.M. 1994. Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail, *Conus imperialis*. *Toxicon* 32: 845-848.
- Olivera M.B. 1997. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol. Biol. of the Cell.* 8: 2101-2109.
- Olivera, B.M. 2000. ω -Conotoxin MVIIA: from marine snail venom to analgesic drug. In *Drugs from the Sea*. Ed. N. Fusetani. Karger, Basel, pp. 74-85.



- Olivera M.B. 2002. *Conus* venom peptides: Reflections from the biology of clades and species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 25-47.
- Olivera M. B. y Cruz J. L. 2001. Conotoxins in retrospect. *Toxicon* 39: 7-14.
- Olivera B. M., Imperial J. S. y Bulaj G. 2002. Cone snails and conotoxins: evolving sophisticated neuropharmacology, in perspectives in molecular toxinology. Ed. Menez A. pp. 143–158.
- Olivera B.M., McIntosh J.M., Cruz L.J., Luque F.A. y Gray W.R. 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *C. geographus* venom. *Biochemistry* 23: 5087-5090.
- Olivera B.M., Gray W.R., Zeikus R., McIntosh J.M., Varga J., Rivier J., de Santos V. y Cruz L.J. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230: 1338-1343.
- Olivera M. B., Rivier J., Craig C., Ramilo A. C., Corpuz P.G., Abogadie F. C., Mena E.E., Woodward R.S., Hyllyard R.D. y Cruz L.J. 1990. Diversity of *Conus* Neuropeptides. *Science* 249: 257- 263.
- Pallaghy P.K., Melnikova A.P., Jimenez E.C., Olivera B.M. y Norton R.S. 1999. Solution structure of contryphan-R, a naturally occurring disulfide-bridged octapeptide containing D-tryptophan: comparison with protein loops. *Biochemistry* 38: 11553-11559.
- Peng C., Tang S., Pi C., Liu J., Wang F., Wang L., Zhou W. y Xu A. 2006. Discovery of a novel class of conotoxin from *Conus litteratus*, It14a, with a unique cysteine pattern. *Peptides* 27:2174-2181.
- Ruppert E.E. y Barnes R.D. 1996. *Invertebrate zoology*. Saunders College Publishing. Orlando Florida. p. 1054.
- Sandall D.W., Satkunanathan N., Keays D.A., Polidano M.A., Liping X., Pham V., Down J.G., Khalil Z., Livett B.G. y Gayler K.R. 2003. A novel α -conotoxin identified by gene



sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry* 42: 6904-6911.

Sasaki T., Feng Z. P., Scott R., Grigoriev N., Syed N.I., Fainzilber M. y Sato K. 1999. Synthesis, bioactivity and cloning of the L-type calcium channel blocker ω -conotoxin TxVII. *Biochemistry* 38: 12876-12884.

Sharpe I. A., Thomas L., Loughnan M., Motin L., Palant E., Croker D. E., Alewood D., Chen S., Graham R.M., Alewood P.F., Adams D. y Lewis R.J., 2003a. Allosteric α_1 -Adrenoreceptor antagonism by the conopeptide ρ -TIA. *J. Biol. Chem.* 278: 34451-34457.

Sharpe I. A., Palant E., Schroeder C.I., Kaye D.M., Adams D.K., Alewood P.F. y Lewis R.J. 2003b. Inhibition of the norepinephrine transporter by the venom peptide χ -MrIA. *J. Biol. Chem.* 278: 40317-40323.

Shon K. J., Grilley M., Jacobsen R., Cartier E., Hopkins C., Gray W.R., Watkins M., Hillyard D.R., Rivier J., Torres J., Yoshikami D. y Olivera B.M. 1997. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 36: 9581-9587.

Shon K., Olivera B.M., Watkin M., Jacobsen R.B. Gray., W. R. Floresca C. Z., Cruz L. J., Hillyard D. R., Bring A., Terlau H. y Yoshikami D. 1998. μ -conotoxin PIIIA a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J. Neurosci.* 18: 4473-4481.

Sines S.M., Kreienkamp H.J., Bren N., Maeda R. y Taylor P. 1995. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of a α -Conotoxin M1 selectivity. *Neuron* 15: 205-211.

Teichert R.W., Jimenez E.C. y Olivera B.M. 2005. α S-conotoxin RVIIIA: a structurally unique conotoxin that broadly targets nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 44: 7897-7902.



- Terlau H., Stocker M., Shon K.J., McIntosh J.M., y Olivera B.M. 1996a. μ O-conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels but not through site I. *J. Neurophysiol.* 76: 1423-1429.
- Terlau H., Shon K.J., Grilley M., Stocker M., Stümer W. y Olivera B.M. 1996b. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* 381: 148-151.
- Terlau H., Boccaccio A., Olivera B.M. y Conti F. 1999. The block of shaker K⁺ channels by κ -conotoxin PVIIA is state dependent. *J Gen. Physiol.* 114: 125-140.
- Trussell G.C. y Etter R.J. 2001. Integrating genetic and environmental forces that shape the evolution of geographic variation in a marine snail. *Genetica* 112-113: 321-337.
- Van Wagoner ., Jacobsen R.B., Olivera B.M. y Ireland C.M. 2003. Characterization and three-dimensional structure determination of ψ -conotoxin PIIIF, a novel noncompetitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 42: 6353-6362.
- Walker C.S., Steel D., Jacobsen R.B., Lirazan M.B., Cruz L.J., Hooper D., Shetty R., De la Cruz R.C., Nielsen J.S., Zhou L.M., Bandyopadhyay P., Craig A.G. y Olivera B.M. 1999. The T superfamily of conotoxins. *J. Biol.Chem.* 274: 30664-30671.
- Wang Ch-Z. y Chi C-W. 2004. Conus peptides a rich pharmaceutical treasure. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36: 713-723.
- West P.J., Bulaj G., Garret J.E., Olivera B.M y Yoshikami D. 2002. μ -conotoxin SmIIIA., a potent inhibitor of tetrodotoxin-resistant sodium channels in amphibian sympathetic and sensory neurons. *Biochemistry* 41: 15388-15393.
- West P.J., Bulaj G. y Yoshikami D. 2005. Effects of δ -conotoxins PVIA and SVIE on sodium channels in the amphibian sympathetic nervous system. *J. Neurophysiol.* 94: 3916-3924.



White H.S., McCabe R.T., Armstrong H., Donevan S.D., Cruz L.J., Abogadie F.C., Torres J., Rivier J.E., Paarmann I., Hollman M. y Olivera B.M. 2000. *In vitro* and *in vivo* characterization of conantokin-R, a selective NMDA receptor antagonist isolated from the venom of the fish-hunting snail *Conus radiatus*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 425-432.

Zhangsun D., Luo S., Wu Y., Zhu X., Hu Y. y Xie L. 2006. Novel O-superfamily conotoxins identified by cDNA cloning from three vermivorous *conus* species. *Chem. Biol. Drug. Des.* 68: 256-265.

Zugasti-Cruz A., Maillo M., López-Vera E., Falcón A., Heimer de la Cotera E.P., Olivera B.M. y Aguilar M.B. 2006. Amino acid sequence and biological activity of a γ -conotoxin-like peptide from the worm- hunting snail *Conus austini*. *Peptides* 27: 506-511.

Zugasti-Cruz A., Aguilar M.B., Falcón A., Olivera B.M. y Heimer de la Cotera E.P. 2008. Two new 4-Cys conotoxins (framework 14) of the vermivorous snail *Conus austini* from the Gulf of Mexico



Abreviaturas

cm = centímetros.

AA o a.a. = aminoácidos.

P = Piscívoro.

V = Vermívoro.

M = Molusquívoro.

nAChR = receptor nicotínico de Acetilcolina.

VIH = Virus de inmunodeficiencia humana.

C = *Conus*.

ACN = Acetonitrilo.

TFA = Ácido trifluoroacético.

mg = miligramos.

RP-HPLC = Cromatografía de alta resolución en fase reversa.

mm = milímetros.

μm = micrómetros.

ml = mililitros.

P1 = programa 1.

P2 = programa 2.

P2' = programa 2 prima.

P3 = programa 3.

P4 = Programa 4.

P5 = Programa 5.

P6 = programa 6.

P6' = progama 6 prima.

PITC = Fenilisotiocianato.

PTH = Feniltiohidantonia.

ATZ = anilinothiazolinona.

UNAM = Universidad Nacional Autónoma de México.

MALDI = Desorción/ Ionización mediante láser asistida por matriz.

ESI = Ionización por electrospray.

Da = Daltons.

pmol = picomoles.

Δ = diferencia.

W = bromotriptofano

K = hidroxilisina

γ = gammacarboxiglutamato

O = hidroxiprolina

TTX-R = resistente a la tetrodoxina

TTX-S = sensible a la tetrodoxina



Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácidos	Códigos a tres letras	Códigos a una letra
alanina	ala	A
arginina	arg	R
asparragina	asn	N
ácido aspártico	asp	D
asparragina o ácido aspártico	asx	B
cisteína	cys	C
fenilalanina	phe	F
glicina	gly	G
glutamina	gln	Q
ácido glutámico	glu	E
glutamina o ácido glutámico	glx	Z
histidina	his	H
isoleucina	ile	I
leucina	leu	L
lisina	lys	K
metionina	met	M
prolina	pro	P
serina	ser	S
tirosina	tyr	Y
treonina	thr	T



triptófano	try	W
valina	val	V