



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE CONOPÉPTIDOS DEL VENENO
DEL CARACOL MARINO**

Conus nux

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

EDUARDO ALVAREZ LÓPEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA**

2014



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.

1. Datos del alumno

Alvarez

López

Eduardo

54 84 83 86

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304062759

2. Datos del tutor

Dr

José Estuardo

López

Vera

3. Datos del sinodal 1

Dr

Manuel Benigno

Aguilar

Ramírez

4. Datos del sinodal 2

Dra

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

5. Datos del sinodal 3

Dra

Imilla Ilnamiqui

Arias

Olguín

6. Datos del sinodal 4

M en C

Brian

Urbano

Alonso

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de conopéptidos del caracol marino *Conus nux*

75 p

2014

*A mis padres y
hermanos*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Estuardo López Vera, por haber aceptado ser mi tutor y poder realizar este trabajo en su grupo de laboratorio, así como enseñarme minuciosamente el arte de la ciencia e investigación; y el brindarme su valiosa amistad.

Al Dr. Manuel Aguilar Ramírez, un ejemplo a seguir en investigación y enseñanza. Gracias por dedicarle tiempo a esta pequeña aportación científica.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, investigadora dedicada, quien me enseñó las maravillas de la investigación toxicológica.

A la Dra. Imilla Ilnamiqui Arias Olgún, por el tiempo dedicado a las correcciones a mi trabajo y a sus valiosos consejos para terminar este trabajo.

Al M. en C. Brian Urbano Alonso, por aportar los caracoles *Conus nux* utilizados para elaborar esta tesis, así como sus valiosos comentarios y aportaciones a mi trabajo escrito.

A mis compañeros de laboratorio: Luis, Elba, Gerardo y Angélica, gracias por su apoyo, discusiones y enseñanzas, así como su compañía brindada durante mi estancia en el laboratorio, así como a Artemisa, por enseñarme el uso del HPLC.

Al Programa Nacional de Becas de Educación Superior por la beca otorgada en modalidad: Titulación. Con número de Folio 386593.

Al apoyo por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN213808-3. Así también a los proyectos CONACyT 153915 y 15809.

DEDICATORIAS

Principalmente a mis padres, quienes me brindaron la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, son la columna vertebral de mi vida y quienes me han apoyado en mil y un proyectos personales.

Eduardo Alvarez Ticante (padre) el hombro en el que descansan mis triunfos y fracasos.

María de Lourdes López López (madre) la mano que me acompaña y aconseja siempre.

Verónica, Angélica, Mauricio y Vanessa, mis hermanos quienes me han apoyado siempre y a quienes les debo este trabajo.

Rosita, Brian, Alan, Demian, Samantha y Héctor, mis sobrinos, espero este trabajo sea una guía para sus futuros brillantes.

A mis abuelos, Esteban, Rosita, Genaro y Petra, quienes fueron los pilares de esta familia, siempre los llevo en mi pensamiento.

A Layla Michán Aguirre, quién me brindo muchas oportunidades en tan poco tiempo, estoy muy contento de poder compartir a tu lado esta etapa de mi vida. Me has enseñado el mundo desde una perspectiva diferente, la cual he adoptado para poder disfrutarla juntos.

A mis amigos de la carrera: Luis, Federico, Iván y Baldomero, quienes me acompañaron en mil y una aventuras, en los triunfos y fracasos mil gracias, siempre serán las personas en las que puedo confiar; sin olvidar a Izchel Romana, Jaqueline, Carmina, Jesús, Olmo, Dianita, quienes me brindaron su valiosa y sincera amistad.

Índice

1. RESUMEN (ABSTRACT).....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 Reino Animal.....	11
2.2 <i>Phylum</i> Mollusca.....	12
2.3 Clase Gastropoda.....	12
2.4 Subclase Prosobranquia.....	15
2.5 Orden Neogastropoda.....	16
2.6 Familia Conidae.....	16
2.7 Género <i>Conus</i>	16
2.8 <i>Conus nux</i>	19
3. Conotoxinas.....	19
3.1 Estructura bioquímica.....	20
3.2 Clasificación de conotoxinas.....	23
3.3 Conotoxinas y sus blancos moleculares.....	24
3.3.1 α -Conotoxinas.....	24
3.3.2 γ -Conotoxinas.....	24
3.3.3 ε -Conotoxinas.....	24
3.3.4 ι -Conotoxinas.....	25
3.3.5 κ -Conotoxinas.....	25
3.3.6 μ y δ -Conotoxinas.....	25
3.3.7 ρ -Conotoxinas.....	25
3.3.8 σ -Conotoxinas.....	26
3.3.9 τ -Conotoxinas.....	26
3.3.10 χ -Conotoxinas.....	26
3.3.11 ω -Conotoxinas.....	26
3.4 Conopéptidos y sus blancos moleculares.....	26
3.4.1 Conopresinas.....	26
3.4.2 Contulankinas.....	27
3.4.3 Conantokinas.....	27
3.4.4 Contrifanos.....	27
3.4.5 Conorfamidas.....	27
4. ANTECEDENTES.....	28

5. JUSTIFICACIÓN.....	30
6. OBJETIVOS.....	31
6.1 Objetivo General.....	31
6.2 Objetivos particulares.....	31
7. HIPÓTESIS.....	32
8. MATERIAL.....	33
8.1 Material biológico.....	33
9. MÉTODO.....	33
9.1 Extracción del veneno.....	33
9.2 Purificación de péptidos por RP-HPLC.....	33
9.3 Secuenciación de péptidos.....	34
9.4 Espectrometría de masas.....	34
9.5 Análisis de secuencias obtenidas.....	34
10. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35
11. RESULTADOS.....	36
11.1 Extracción del veneno.....	36
11.2 Fraccionamiento del veneno, purificación por RP-HPLC y Espectrometría de masas.....	36
11.3 Determinación de la estructura primaria.....	42
11.4 Comparación <i>in silico</i> de las secuencias.....	43
12. DISCUSIÓN.....	45
13. CONCLUSIONES.....	48
14. PERSPECTIVAS.....	49
15. REFERENCIAS.....	50
16. ANEXO 1.....	60
17. ANEXO 2.....	61
18. ANEXO 3.....	62
19. ANEXO 4.....	63
20. ANEXO 5.....	68
21. ANEXO 6.....	74

1. RESUMEN

Es interesante la diversidad de procesos biológicos, resultado de la adaptación y evolución de los seres vivos, como estrategia para la supervivencia. Una respuesta biológica relevante es la síntesis de venenos. Los caracoles cono, son taxa pancrónicos que han desarrollado la producción de veneno como mecanismo de defensa o de ataque para alimentación. El estudio del veneno de estos organismos se ha desarrollado desde hace cuatro décadas, cuando se reportó por primera vez que el veneno de los caracoles cono es capaz de hacer daño al ser humano, incluso matarlo. En este trabajo se caracterizaron parcialmente tres nuevos conopeptidos contenidos en el veneno del caracol *Conus nux* (**Cnu6.1**, **T6CN11** y **Cnu6.2**), pertenecientes por homología a las superfamilias G, I1 y O1, con posible acción como bloqueadores de canales de potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) activados por voltaje, o bien, podrían afectar a los canales de sodio (Na^+) activados por voltaje, principalmente al subtipo $Na_v1.6$.

Palabras clave: conopeptidos, *Conus nux*, caracterización bioquímica, RP-HPLC.

1. ABSTRACT

It is interesting the biodiversity of biological process due to adaptation and evolution of living beings, as a strategy for survival. A relevant biological response is the synthesis of venoms. Cone snails, are taxa panchronic who have developed the production of venom as a defense mechanism and prey capture strategy. Since, four decades ago, the study of the venom of these organisms has been developed, when it was reported for the first time that the venom of the cone snails is capable to harm humans, and even to kill them. In this work, three new conopeptides contained in the venom of *Conus nux* were characterized partially (**Cnu6.1**, **T6CN11** y **Cnu6.2**), and belonging by homology to G, I1, and O1 superfamilies, with possible action as blockers of potassium (K^+), and calcium (Ca^{2+}) voltage-gated ion channels, or, they could affect the sodium (Na^+) voltage-gated channels, mainly to the subtype $Nav1.6$.

Keywords: conopeptides, *Conus nux*, biochemical characterization, RP-HPLC.

2. INTRODUCCIÓN

El medio marino se caracteriza por ser una valiosa fuente de recursos naturales, que van desde la producción de alimentos y combustibles, hasta el desarrollo de compuestos con actividades farmacológicas. Tal es el caso de los animales depredadores que se ayudan de venenos almacenados en glándulas, ya sea para atrapar a su presa y alimentarse, o bien como estrategia de defensa de otros depredadores. Existe una diversidad de animales marinos, invertebrados principalmente, cuya producción de toxinas ha sido estudiada, cada vez aumenta; como ejemplo están las esponjas, los briozoarios, tunicados, cnidarios y moluscos; sin dejar a un lado los animales terrestres, tales como: serpientes, monstruo de gila, escorpiones y arañas, por mencionar a los más representativos (Figura 1).

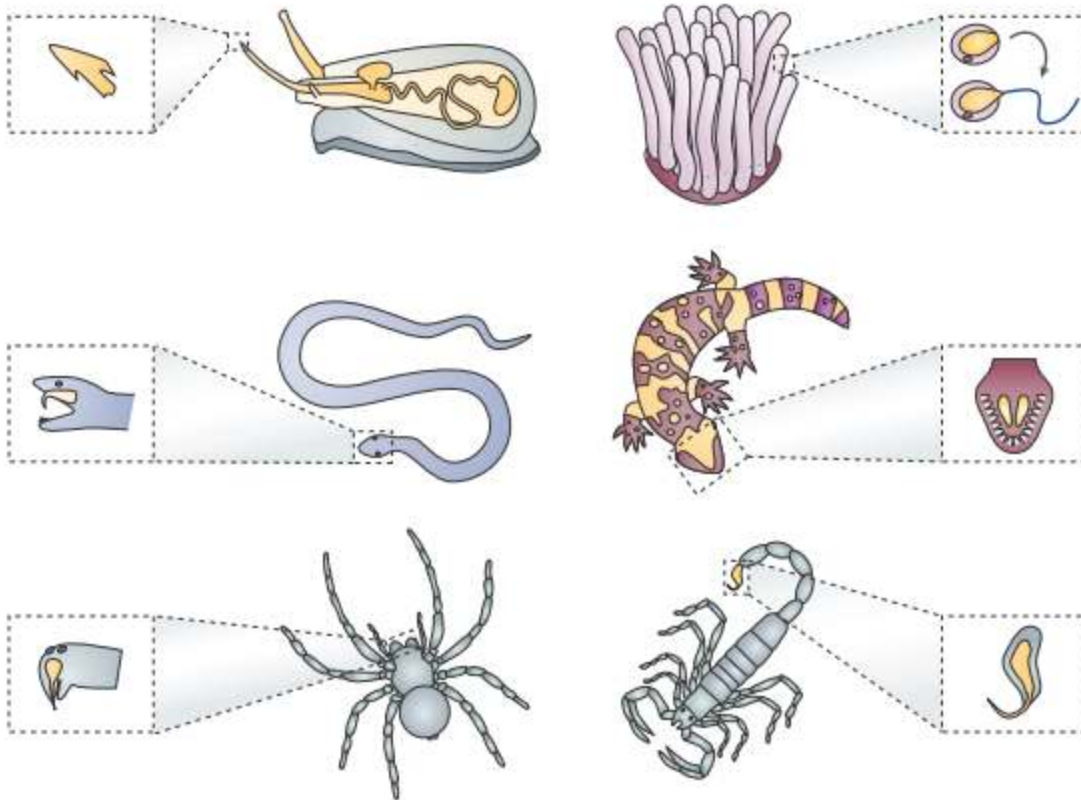


Figura 1. Diversidad de animales cuyos venenos, compuestos de péptidos, poseen acción terapéutica. Tomada de Lewis y García (2003).

El estudio de dichos venenos ha sido un punto importante en ciencia, ya que es a través de diversas investigaciones que se han podido caracterizar los blancos moleculares a los cuales se unen las toxinas que componen al veneno y sirven también como fármacos innovadores para

muchas enfermedades, principalmente las enfermedades neurodegenerativas. Particularmente, los componentes peptídicos de los venenos de ciertos moluscos, como en el caso de los caracoles cono, han resultado ser eficaces analgésicos en ensayos en ratones, lo cual, abre un potencial comercial en el desarrollo de productos farmacéuticos aplicados a ensayos clínicos para humanos.

El caracol estudiado en esta tesis está clasificado de la siguiente manera:

Clasificación taxonómica

Reino Animalia

Phylum Mollusca Cuvier, 1797

Clase Gastropoda Cuvier, 1795

Subclase Prosobranquia

Orden Neogastropoda

Superfamilia Conoidea Fleming, 1822

Familia Conidae Gmelin, 1791

Género *Conus* Linnaeus, 1758

Especie *Conus nux* Broderip, 1833

2.1 Reino Animal

Para el reino animal, aproximadamente 1, 552, 319 especies han sido descritas en los 40 *phyla* en una nueva clasificación evolutiva. Entre éstos, sólo el *phylum* Arthropoda representa 1, 242, 040 especies, es decir alrededor de un 80% del total de las especies descritas. El grupo más exitoso es Insecta (1, 020, 007 especies) con el 66% de todos los animales. El orden de insectos de mayor éxito es *Coleóptera* (387, 100 especies) que representa el 38% de todas las especies en 39 órdenes de insectos. Otro grupo importante de artrópodos es la Clase Arachnida (112, 201 especies), que está dominado por los ácaros, las garrapatas (54, 617 especies) y las arañas (43, 579 especies). También es de destacar dentro de los artrópodos a los crustáceos (66, 914 especies), los trilobitomorfa (19, 606 especies extintas) y los miriápodos (11, 885 especies). El *phylum* **Mollusca** (117, 358 especies) es el segundo grupo más diverso entre los *phyla* de invertebrados marinos representando el 7.5% del total de especies, seguido por los *phyla* Platyhelminthes (29, 285 especies), Nematoda (24,783 especies), Echinodermata (20, 509 especies), Annelida (17, 210 especies) y Bryozoa (10, 941 especies). El *phylum* Cordata, incluidos los vertebrados, representa a 64, 832 especies (por taxones recientes, con excepción de los anfibios) con el 4.1% de especies habitantes de la Tierra; entre estos 7, 694 son especies de anfibios; 31, 958 especies de peces y 5, 750 especies de mamíferos (Zhang, 2011), todos representados en la Figura 2.

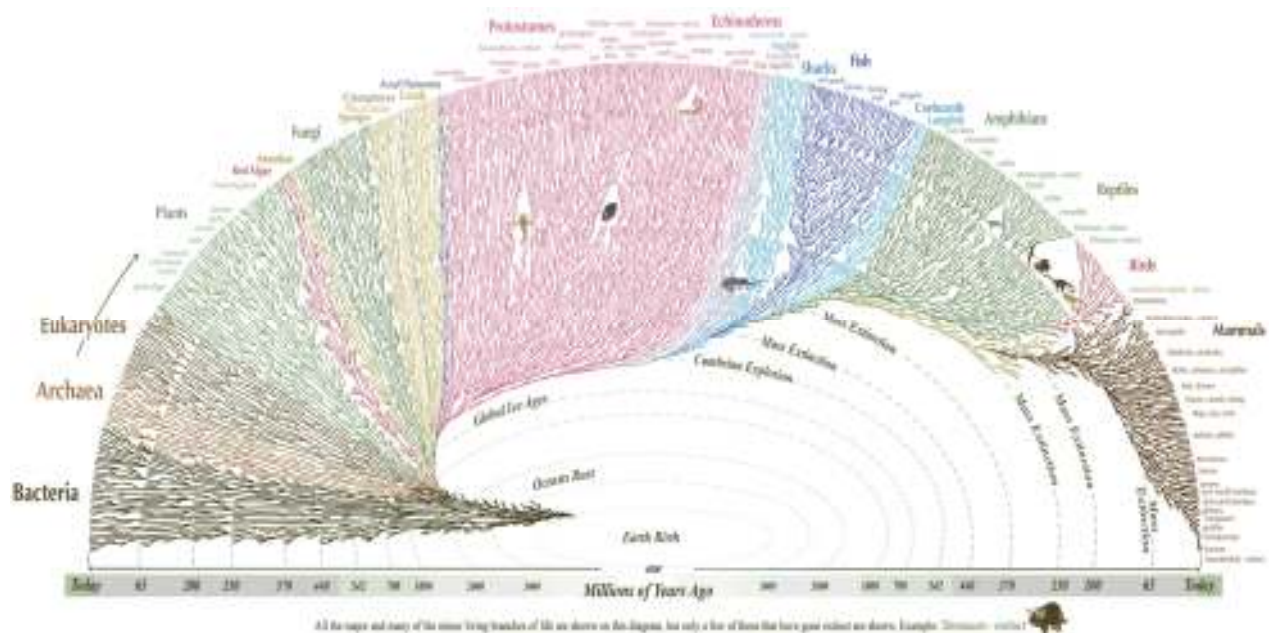


Figura 2. Representación esquemática de las relaciones evolutivas. Tomado y modificado de Eisenberg (2013).

2.2 Phylum Mollusca

Del latín <<*molluscum*>> que significa "blando"; cuenta con un número aproximado de 117, 358 de especies actuales y 70, 000 especies extintas (Heller, 1990; Ponder y Lindberg, 2008; Zhang, 2011). El registro fósil indica que este grupo apareció en el precámbrico tardío hace 541 millones de años, por el representante del periodo ediacárico *Kimberella quadrata* (Ponder y Lindberg, 2008; Wade, 1972). Es el *phylum* de invertebrados marinos más numeroso, después de los artrópodos, descrito por Linnaeus en 1758; incluye formas tan conocidas como las almejas, ostras, calamares, pulpos, babosas y una gran diversidad de caracoles, tanto marinos como terrestres (Brusca y Brusca, 2003).

El plan corporal general de un molusco se divide en tres partes principales: 1) Un pie largo definido, cuya función es la locomoción; 2) una masa visceral localizada dorsalmente, que contiene los órganos internos, corazón en la cámara pericárdica (compuesta por ventrículo y atrio separados), un celoma limitado alrededor del corazón, nefridios, sistema circulatorio abierto (hemocele) y vísceras y 3) un manto, tejido plegado que cubre toda la masa visceral, cubierto de una epidermis cuticular que contiene glándulas que secretan espículas calcáreas, formando así las placas de la concha (en las especies con concha externa) (Brusca y Brusca, 2003).

Este *phylum* comprende a las siguientes clases de moluscos: Bivalvia, Caudofoveata, Cephalopoda, **Gastropoda**, Monoplacophora, Polyplacophora, Scaphopoda y Solenogastres (Figura 3), más dos clases fósiles Rostroconchia e Hyolitha (Ponder y Lindberg, 2008).

2.3 Clase Gastropoda

La clase Gastropoda comprende el grupo más diverso dentro del *phylum* Mollusca, tanto en sus formas como en los hábitats que ocupa, desde el límite de costa hasta el mar profundo. El número de especies podría superar las 150, 000 entre actuales y fósiles (solamente superada por los insectos). Su gran radiación adaptativa se originó en el mar, colonizando luego ambientes dulceacuícolas y terrestres (Felder y Camp, 2009; Ponder y Lindberg, 2008). Esta clase se divide en tres subclases: Prosobranquios (caracoles marinos con concha), Opisthobranquios (babosas marinas) y Pulmonados (caracoles y babosas terrestres) (Marshall, 1980).

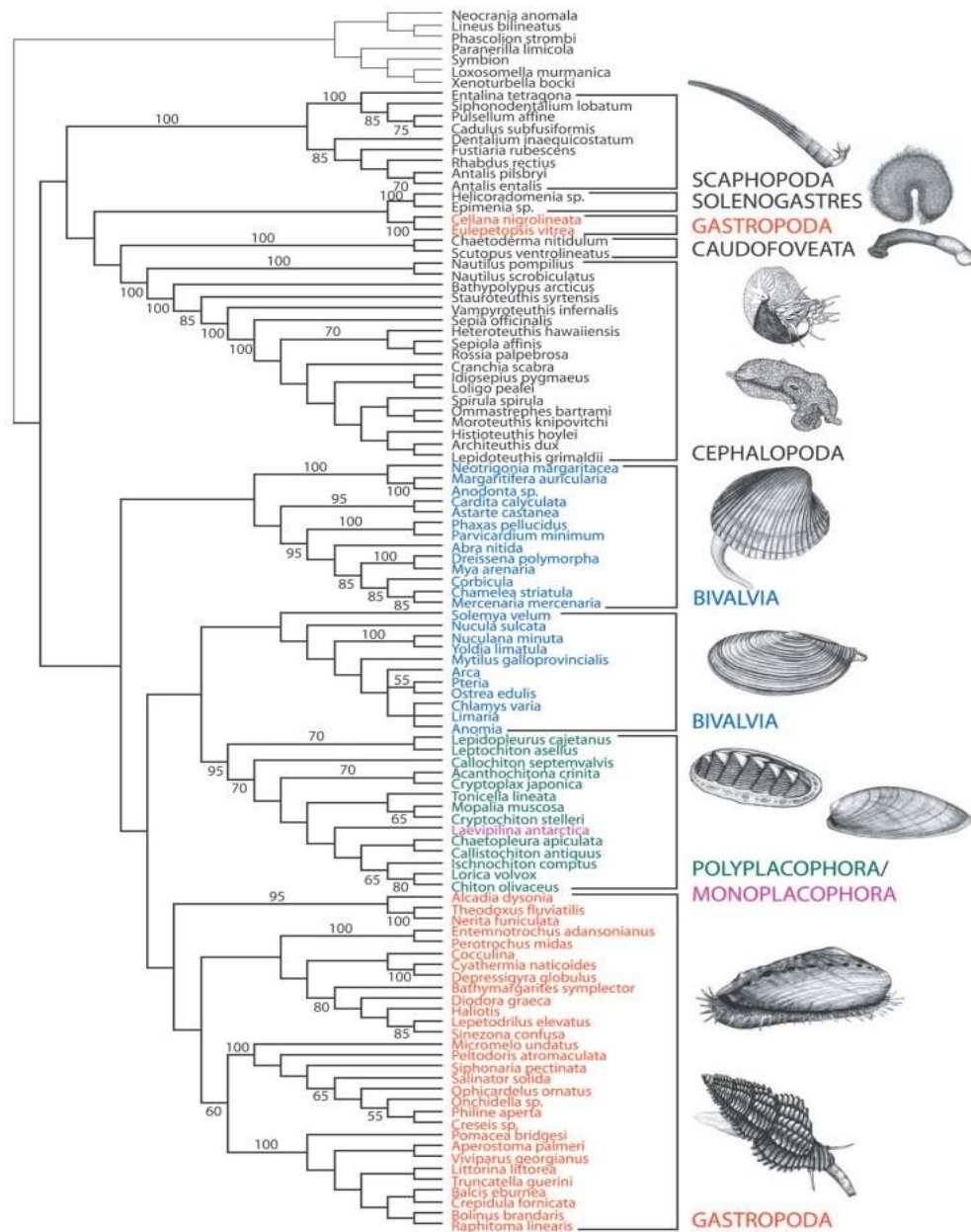


Figura 3. Árbol filogenético que indica las relaciones de las ocho clases de moluscos, con el marcador molecular 28 S. Tomado de Giribet *et al.* (2006).

El plan corporal general de los gasterópodos puede variar de forma drástica; sin embargo la morfología característica describe que los organismos presentan una concha calcárea secretada por el manto, un sistema circulatorio abierto, una rádula utilizada para alimentación, un pie muscular para locomoción, una cabeza con un par de ojos y un par de tentáculos cefálicos (Brusca y Brusca, 2003; Felder y Camp, 2009; Ponder y Lindberg, 2008). Esta clase se distingue de las demás por la torsión de 180° de la masa visceral con respecto a la cabeza y pie durante

el desarrollo, generalmente durante la fase tardía de larva veliger, como resultado de una acción muscular y crecimiento diferencial (Figura 4); a los gasterópodos con esta disposición de órganos se les llama Prosobranquios, subclase con mayor diversidad de organismos (Jackson *et al.*, 2007).

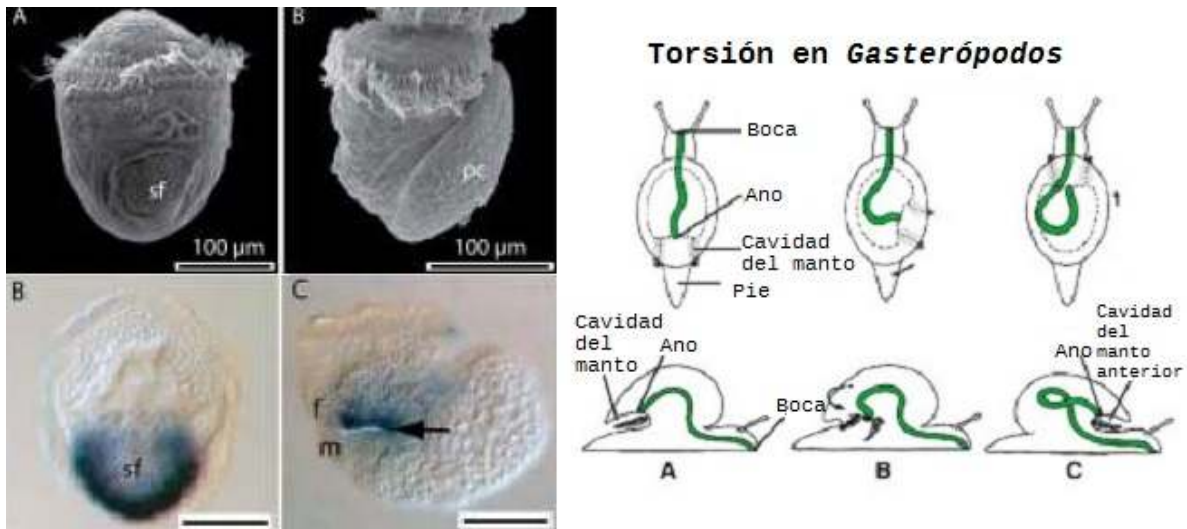


Figura 4. Esquema de torsión en Gasterópodos. Imagen izquierda: Micrografía electrónica de larva trocófora (parte superior [ps]) y micrografía óptica de larva Veliger (parte inferior [pi]). La micrografía electrónica (ps) muestra en A), la formación de la concha (sf) y B) la rotación de 180°, así como la formación de la proto-concha calcificada (pc). La micrografía óptica (pi), muestra B) la formación de la concha (sf) y C) la formación del pie (f) y manto (m). Tomado y modificado de Jackson *et al.* (2007). Imagen derecha: Representación del proceso de torsión en gasterópodos. A) Antes de la torsión. B) Estado intermedio hipotético. C) Torsión completa (Agrouniversidad, 2014).

Los gasterópodos poseen una cabeza definida, que incluye estatocistos y ojos (puede perderlos secundariamente), uno o dos pares de tentáculos, uno o dos pares de nefridios; la cavidad del manto cubre los ctenidios (puede ser reemplazados por cámaras de intercambio gaseoso), osfradios y glándula hipobranquial, además de una concentración de tejido nervioso (ganglios). Son organismos dioicos y algunas formas son hermafroditas, quienes forman paquetes de cambio de esperma para evitar la autofecundación; la copulación puede ser compleja (Brusca y Brusca, 2003).

Un carácter distintivo del grupo es la rádula, ya que es transformada del tejido cartilaginoso presente en la zona bucal, a un órgano para alimentarse, desarrollando diferentes estrategias de uso; la modificación de estos dientes radulares ha sido explotada en la clasificación de los organismos (Katsuno y Sasaki, 2008). Presente en la boca, con dientes quitinosos en arreglo

longitudinal dispuestos de manera central, a los laterales hay dientes marginales y laterales, según los organismos que lo presenten (Figura 5) (Véliz *et al.*, 2003).

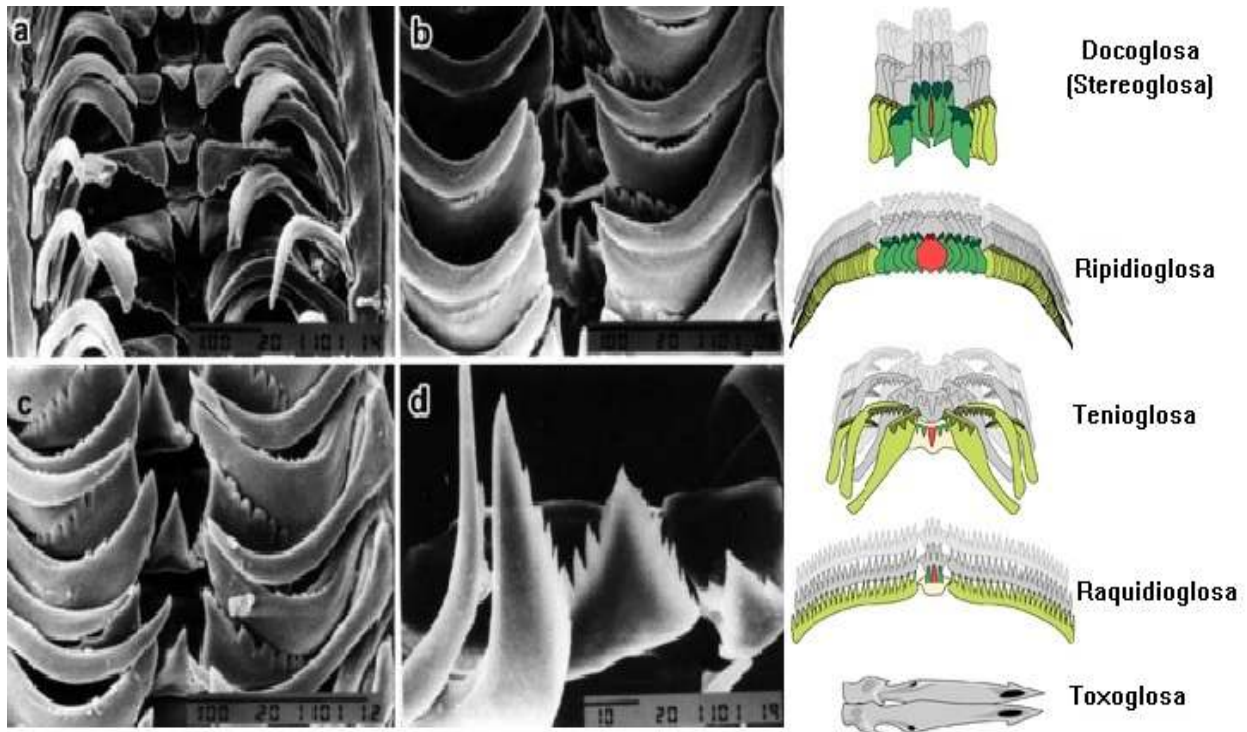


Figura 5. Estructura del aparato radular. Lado izquierdo: micrografía electrónica de la rádula de *Crepidula sp.* a) Dientes centrales, b) dientes laterales, c) dientes marginales, d) acercamiento a los dientes marginales. Lado derecho: diversas formas de rádula ilustradas, según el orden de los dientes. Modificado de Véliz *et al.* (2003).

2.4 Subclase Prosobranquia

Los prosobranquios son organismos de cuerpo blando no segmentados, con pie muscular y manto, y presentan generalmente una concha enrollada en espiral. La cavidad del manto generalmente está dirigida hacia el extremo anterior (cerca de la cabeza) y contiene a los osfradios, los ctenidios, las glándulas hipobranquiales, el ano y los nefridioporos (Brusca y Brusca, 2003). En la cabeza generalmente tienen ojos basales. Típicamente lleva un opérculo, córneo o calcáreo. La rádula es variable. Tienen un sistema nervioso tipo estreptoneuro (mediante la torsión es incurvado en forma de "8"). Dentro de esta subclase están sistematizados los órdenes: Archaeogastropoda, Mesogastropoda y **Neogastropoda** (Brusca y Brusca, 2003).

2.5 Orden Neogastropoda

El plan corporal de los neogasterópodos es que la concha carece de capa nácar y su forma es variada; la rádula tiene de uno a tres dientes en cada fila y puede ser raquiglosa o toxoglosa; son de hábitos carnívoros, siendo así la modificación de la probóscide extensible, que forma parte del tubo digestivo y se encuentra alojada en un saco o receptáculo de la probóscide; el manto forma un sifón que queda alojado en un canal sifonal o una muesca en la concha; el opérculo es quitinoso. Es en este orden donde se clasifica a la familia **Conidae**, entre muchas otras familias (Ruppert y Barnes, 1995).

2.6 Familia Conidae

La familia Conidae está englobada junto a las familias Turridae y Terebridae dentro de la superfamilia Conoidea, también conocida como el suborden *Toxoglossa* (Peng *et al.*, 2007). Se trata de un grupo de gasterópodos prosobranquios muy especializados, exclusivamente marinos, con alrededor de 700 especies vivientes (Paredes *et al.*, 2010) que se distribuyen principalmente en la zona tropical de todos los océanos del mundo; la mayoría de ellas se encuentra en el Indopacífico y el Pacífico Occidental (Keen, 1971). La familia Conidae es, sin duda, uno de los grupos más inconfundibles entre los moluscos gasterópodos por la forma cónica característica y la variedad de colores que suele presentar su concha. Entre los coleccionistas aficionados de conchas, los cónidos son uno de los grupos más apreciados, y las conchas de ciertas especies raras pueden alcanzar precios exorbitantes. Los géneros pertenecientes a la familia Conidae son: *Hemiconus* (ya extinto), *Conorbis* (con una especie) y *Conus* (López, 2001). Estos moluscos se caracterizan por complejos mecanismos de caza, que les permitieron ser uno de los pocos grupos de invertebrados marinos que se alimentan de peces.

2.7 Género Conus

Los caracoles marinos del género *Conus*, con un estimado de 700 especies (Daly y Craik, 2009), representan al menos el 10% de la diversidad conoidea total (Fedosow *et al.*, 2012); son animales venenosos y depredadores; capturan a sus presas inmovilizándolas principalmente por envenenamiento. Se alimentan de diferentes taxa principalmente poliquetos, equiúridos y hemicordados (vermívoros), moluscos (molusquívoros), y peces (piscívoros) (Keen, 1971; Kohn, 1983) actividad que se realiza generalmente durante la noche. Poseen un aparato venenoso

altamente sofisticado, el cual está constituido por un bulbo muscular, un ducto venenoso, un saco radular donde resguardan las rádulas toxoglossas en forma de arpón, acanaladas y barbadas (Figura 6). Generalmente la concha de los cónidos presenta paredes gruesas como en *C. litteratus*; sin embargo existen conchas considerablemente delgadas como el caso de *C. geographus*. Se presenta una reducción de odontóforo y el esófago está localizado en la parte media. La glándula esofágica es alargada (glándula del veneno), con el bulbo musculoso en el extremo distal, localizándose cerca de anillo nervioso (Simone, 2011).

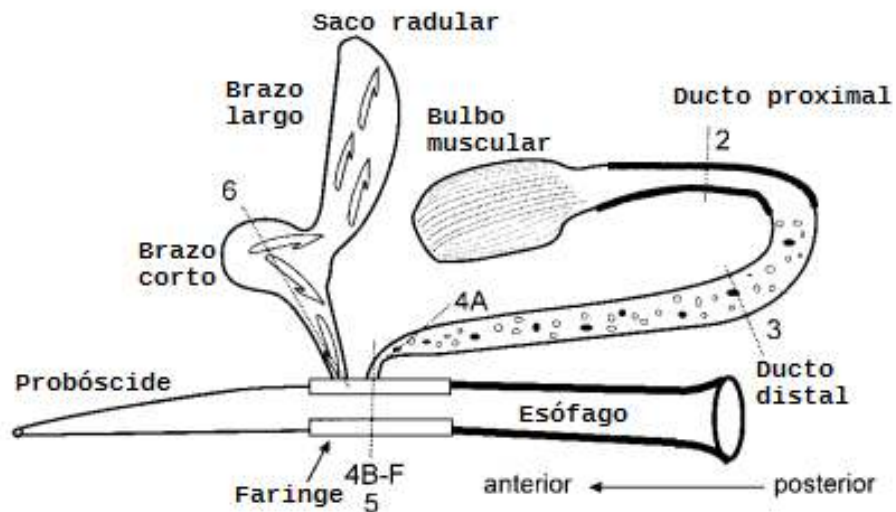


Figura 6. Aparato venenoso del género *Conus*. Tomado y modificado de Franklin *et al.* (2007).

Los dientes de la rádula están modificados en dardos en forma de arpón, quienes están conectados a la faringe a través del saco radular y son disparados hacia una presa cercana a través de la probóscide (Keen, 1971). Aunque la morfología de los dientes radulares de los cónidos sufre cambios ontogénicos, en general su forma se correlaciona con el tipo de dieta de las especies (Nybakken, 1990) y se utilizan en la clasificación de los cónidos, según las características de los dientes radulares, tal como se muestra en la Figura 7 (Franklin *et al.*, 2007).

Comparados con otros gasterópodos depredadores, una de las características inusuales del género *Conus* es el tamaño de la presa que pueden ingerir, siendo ésta de igual o de mayor tamaño que el caracol. Debido a que los dientes radulares no pueden ser utilizados para desgarrar a la presa, estos caracoles suelen tragar presas enteras (Kantor, 2007).

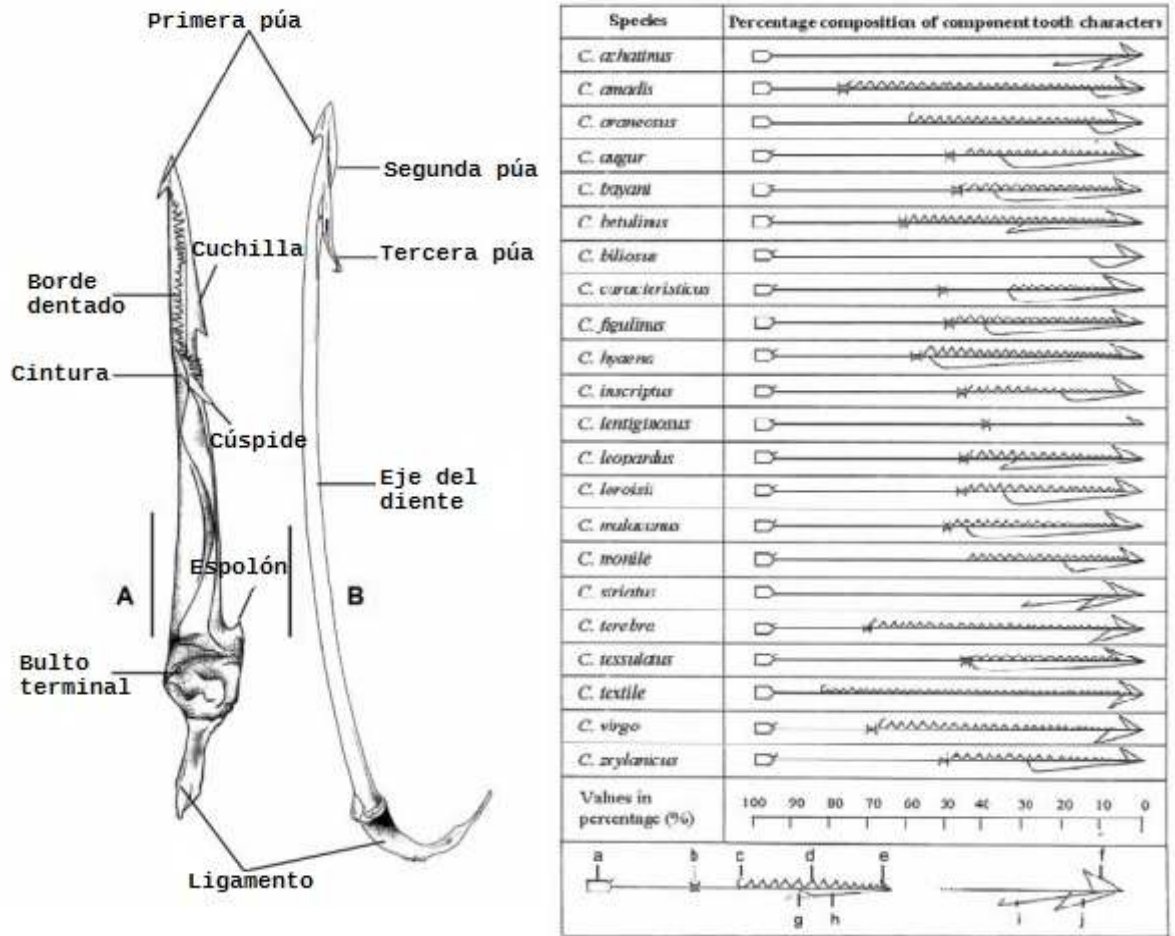


Figura 7. Características taxonómicas de la rádula. Lado izquierdo: Típico diente radular y sus componentes principales. Lado derecho: Distintas especies de *Conus* con su diente radular. Tomado y modificado de Franklin *et al.* (2007).

El registro fósil sugiere dos grandes radiaciones en la especiación de los caracoles como: una inicial hace 56 millones de años en el Eoceno y una más tarde hace 23 millones de años en el Mioceno (con una aparente contracción en su diversidad en el Oligoceno hace 33 millones de años) (Duda y Kohn, 2005; Kohn, 1990). La distribución actual de los caracoles como se establece en hábitats submareales someros en mares tropicales (Kohn y Perron, 1994) distribuidos en la región Indo-Pacífica, que comprende la región tropical y subtropical del Océano Índico así como la región tropical central y occidental del Océano Pacífico (Duda y Kohn, 2005). Los cónidos, como integrantes del bentos marino, habitan diversos tipos de sustrato, incluyendo fondos rocosos, arenosos, fangosos, arrecifes de coral, fondos cubiertos de vegetación, entre otros, desde la zona intermareal hasta los 1000 m de profundidad (Dance y Cosel, 1977).

2.8 *Conus nux*

Descrito por William Broderip en 1833. Son los caracoles cono más pequeños y posiblemente los más comunes de la región este del Océano Pacífico. Presenta tres bandas café-rojizas arregladas de manera indistinta, una mancha púrpura en la punta anterior, y en la apertura tiene comúnmente dos bandas púrpura en un fondo blanco, tal como se muestra en la Figura 8; la ornamentación presenta espiras débiles; el pie del animal es rosa; la concha tiene una longitud promedio de 22 mm y un diámetro promedio de 14 mm. Se localizan desde Baja California-México hasta el sur del Ecuador (Flores-Martínez, 2011; Keen, 1971).



Figura 8. Fotografía de *Conus nux*. Tomado de ConeShell Net¹.

3. Conotoxinas

Los componentes bioactivos responsables del envenenamiento son péptidos relativamente pequeños (12-46 residuos de aminoácidos), ricos en puentes disulfuro y con 1 a 6 aminoácidos entre los residuos de cisteína, los cuales se presentan en varios arreglos diferentes; son conocidos como **conotoxinas** o **conopéptidos** (Lluisma *et al.*, 2008) y actúan entre otros sitios en la unión neuromuscular, dirigidos específicamente a canales iónicos activados por voltaje y a los receptores, causando una rápida inmovilización de la presa.

Estas toxinas también actúan en los canales iónicos homólogos de mamíferos, debido al grado de conservación estructural exhibido por los canales iónicos y los canales activados por ligando a través de la escala de organismos eucariotas superiores (Terlau y Olivera, 2004). Los canales

¹Giancarlo Paganelli Collection.

iónicos de mamíferos exponen diversos patrones de expresión en los tejidos, y esta diferencia se ha demostrado mediante conotoxinas que se dirigen a los subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) presentes en las uniones neuromusculares de invertebrados. Así, los péptidos de invertebrados que se dirigen a estos canales pueden ser potenciales agentes analgésicos en los vertebrados (Essack *et al.*, 2012).

Algunos otros péptidos son utilizados en experimentación para conocer más sobre el blanco farmacológico al cual se unen: su papel fisiológico o aspectos estructurales (Olivera y Cruz, 2001). Muchos de ellos han pasado algunos de los ensayos clínicos con éxito y son posibles candidatos como innovadores fármacos; tal es el caso de ω -conotoxina MVIIA (ziconotide, como sustancia activa) comercializado bajo el nombre de Prialt®, aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) para uso terapéutico en humanos (ver anexo 1) (Bowersox y Luther, 1998). Las primeras conotoxinas se aislaron y caracterizaron hace más de cuarenta años y el número de estudios sobre conotoxinas está creciendo exponencialmente (Fedosov *et al.*, 2012).

3.1 Estructura bioquímica

La biosíntesis de los conopéptidos se da en las células epiteliales del conducto venenoso, y éstos se sintetizan en los ribosomas durante la traducción del mRNA correspondiente (Figura 9). Los precursores de los conopéptidos contienen de 60 a 90 aminoácidos (aa) aproximadamente y se caracterizan por presentar tres zonas peculiares, dos de ellas muy conservadas: un péptido señal que es la región amino terminal (también llamado región pre) de aproximadamente 25 aa, un pro-péptido (o región central) de entre 20 y 40 aa, y el péptido maduro hipervariable en la región carboxilo terminal, de entre 10 y 40 aa (Figura 10) (Aguilar *et al.*, 2013; Jones y Bulaj, 2000; Kaas *et al.*, 2010; Laht *et al.*, 2012); durante la maduración de las conotoxinas se someten a escisión proteolítica del precursor, para eliminar las regiones pre y pro (Puillandre *et al.*, 2010; Terlau y Olivera, 2004).

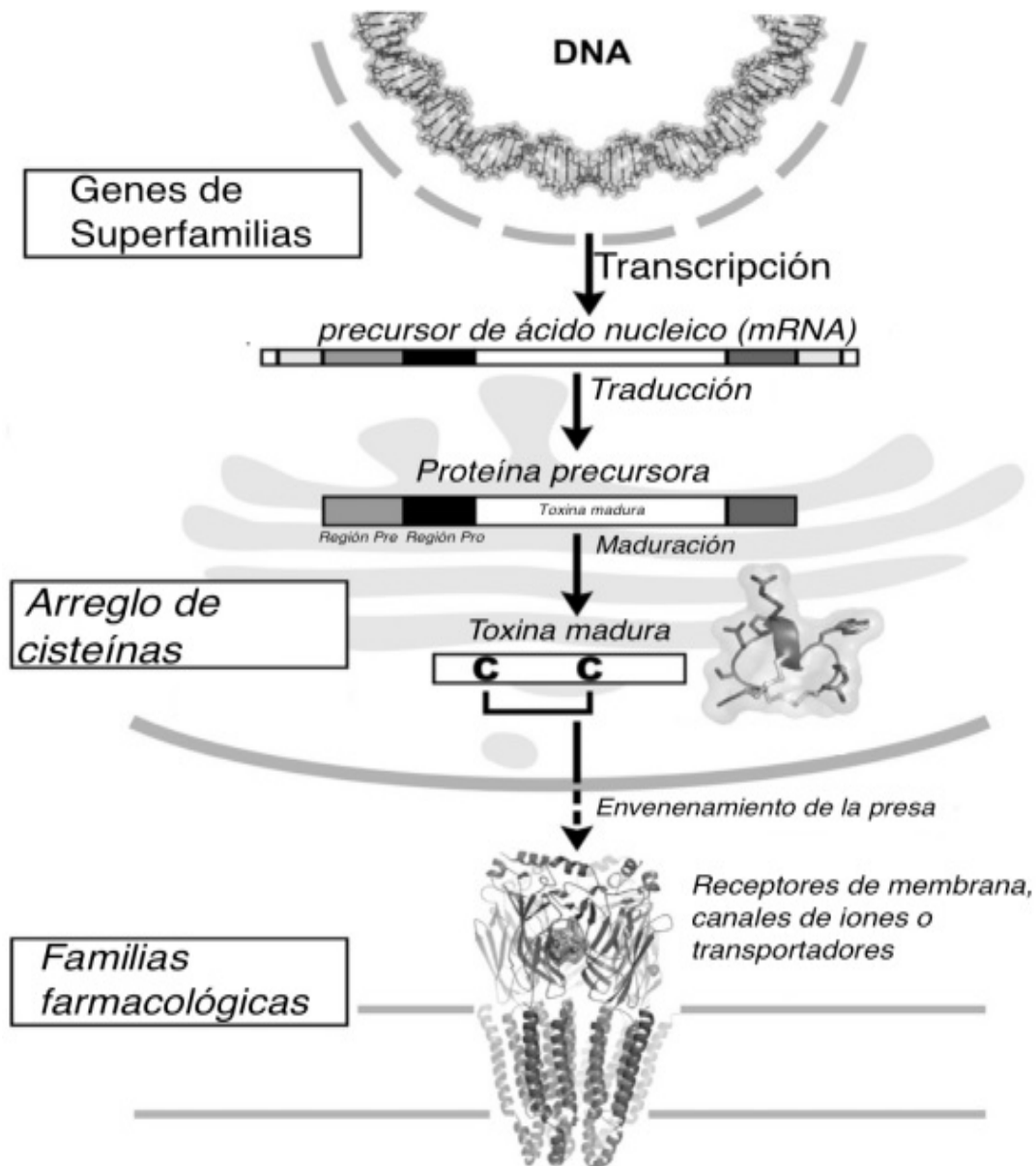


Fig. 9. Esquema de la síntesis y maduración de los conopéptidos. Modificado de Kaas *et al.* (2010).

Además, los conopéptidos son blanco de diversas modificaciones post-traduccionales, tales como la amidación en el carboxilo terminal, hidroxilación de prolina y lisina, carboxilación del glutamato, brominación de triptofano (6- bromo-triptofano), glucosilación de serina y treonina, así como la sulfatación de tirosina, hasta encontrar D aminoácidos (llamado correctamente epimerización de aminoácidos) (Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 1999; Jimenez *et al.*, 1996; Loughnan *et al.*, 1998). Esto es una característica importante, ya que también contribuye de manera significativa a la diversidad química de las conotoxinas (Figura11).

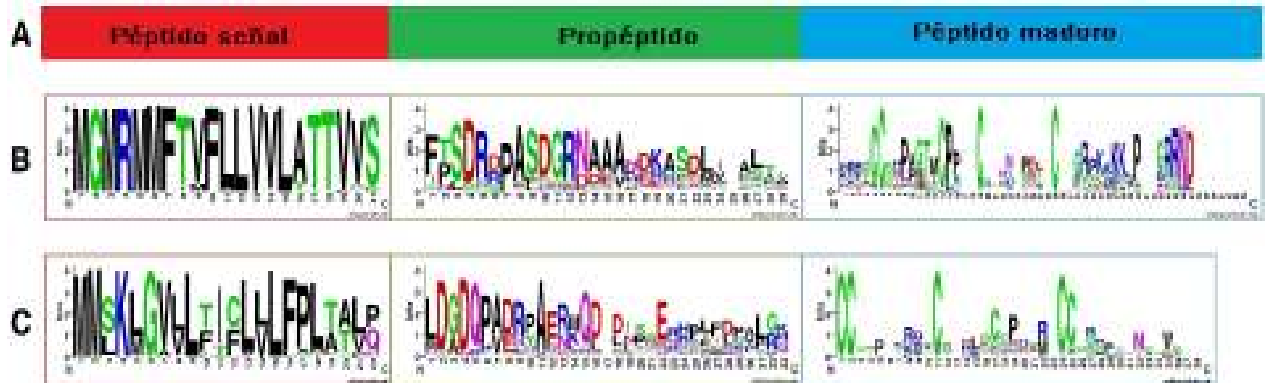


Figura 10. Representación esquemática de dos superfamilias (A y M). **A)** Indicación de cada una de las regiones que componen los precursores, **B)** Secuencia de aminoácidos para el precursor de superfamilia A, y **C)** Precursor de la superfamilia M. El tamaño de las letras representan los aminoácidos conservados dentro de cada superfamilia de diferentes especies de cónidos. Modificado de Laht *et al.* (2012).

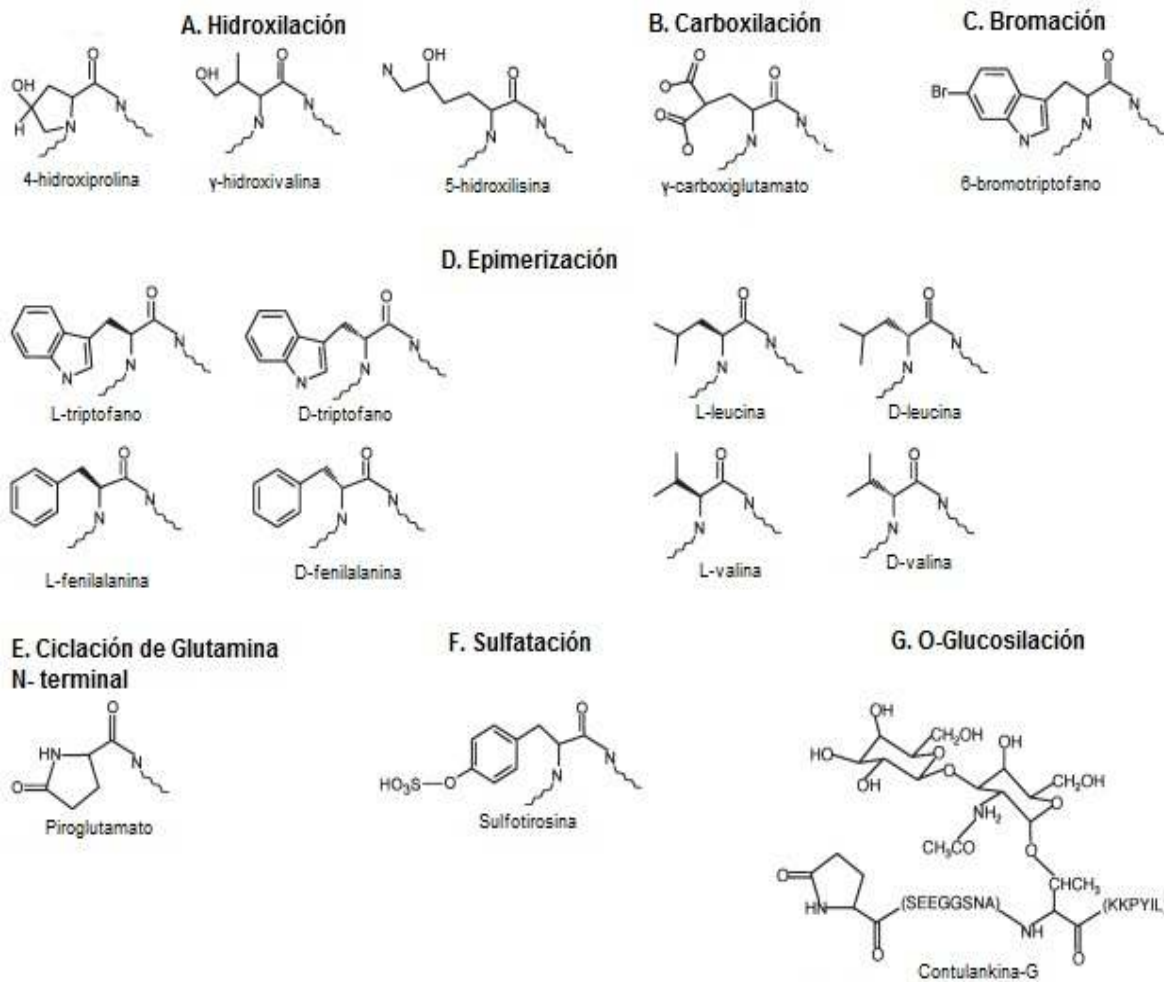


Figura 11. Modificaciones post-traduccionales presentes en péptidos de los caracoles cono. Tomada y modificada de Buczek *et al.* (2005a).

3.2 Clasificación de conotoxinas

Al ser un grupo numeroso de conotoxinas reportadas en la literatura a lo largo de cinco décadas de estudio, éstas se han clasificado en familias farmacológicas y superfamilias genéticas; las primeras se definen según el blanco molecular y el efecto de la toxina sobre el blanco, mientras que las segundas se definen de acuerdo a la secuencia del péptido señal de los precursores (Kaas *et al.*, 2012; Terlau y Olivera, 2004). En la actualidad existen aproximadamente 26 superfamilias de conotoxinas (Figura 12) (A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N, O1, O2, O3, P, S, T, V, Y; para más detalles ver anexo 2), con tres principales representantes A, M y O, debido a su presencia mayoritaria en los venenos (Kaas *et al.*, 2010).

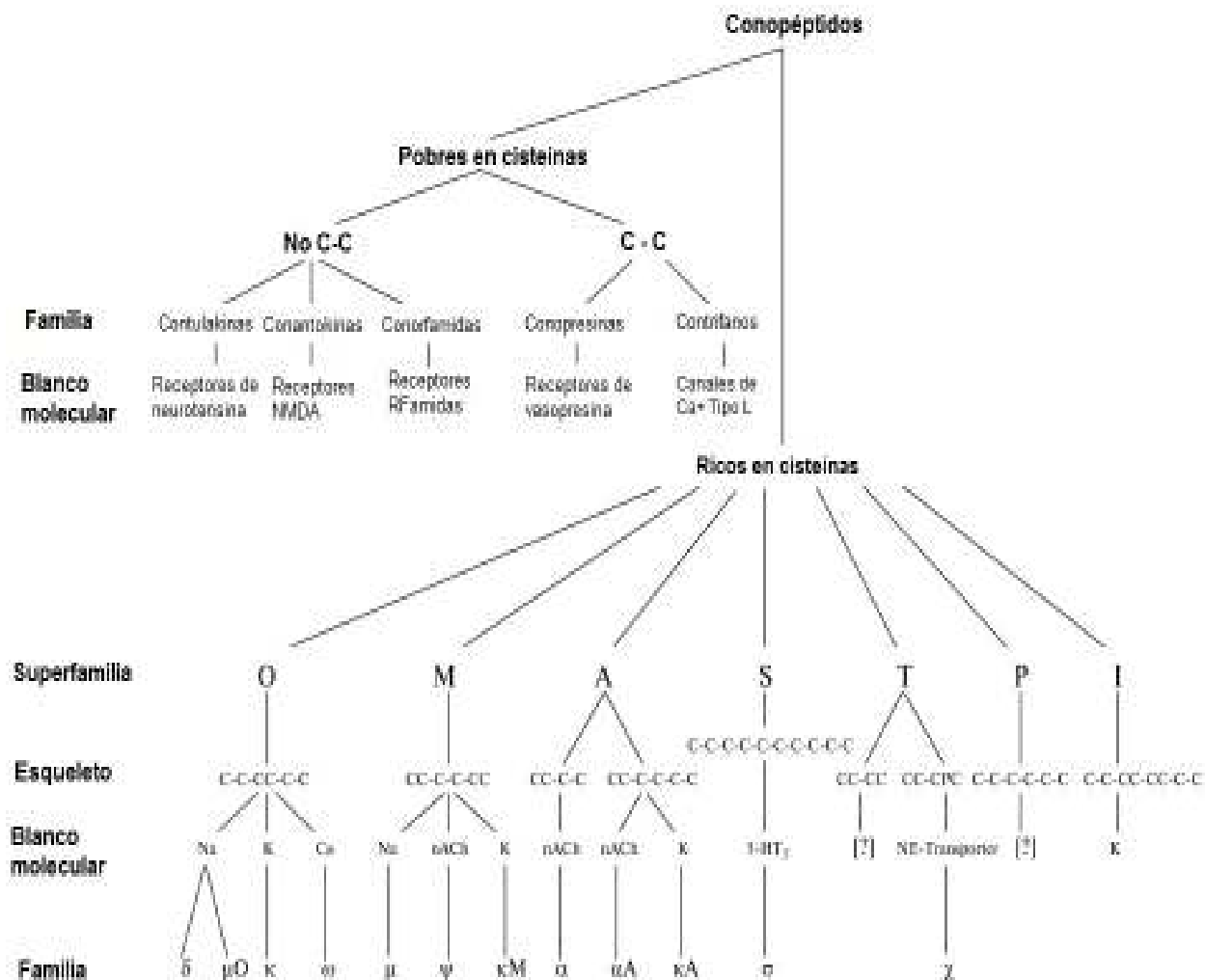


Figura 12. Clasificación moderna de conopéptidos. Modificado de Fedosov *et al.*, (2012); siguiendo el esquema clásico de Terlau y Olivera (2004).

3.3 Conotoxinas y sus blancos moleculares

3.3.1 α -Conotoxinas

Las alfa conotoxinas son las primeras toxinas aisladas del veneno del caracol cono, y por ende, los primeros conopéptidos caracterizados bioquímicamente. Estas conotoxinas inhiben canales iónicos dependientes de ligando; específicamente, son antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina de tipo neuronal y muscular, los cuales desempeñan la función principal de la transmisión sináptica a lo largo del sistema nervioso central. Las alfa conotoxinas se caracterizan por poseer dos pares de residuos de cisteína (Cys), por lo cual se han subclasificado en subfamilias basadas en el número de residuos entre las dos asas (*loops*) de Cys. Las subfamilias 4/3 y 4/7 son las más comunes (Inserra *et al.*, 2013). A partir de estas toxinas secuenciadas se han podido modelar las interacciones de ligandos que tienen acción sobre los neuronales, identificando así las interacciones precisas de estas conotoxinas con los diferentes subtipos de receptores (Pereañez y Vargas, 2009).

3.3.2 γ -Conotoxinas

Estas conotoxinas tienen acción sobre canales iónicos, causando efectos excitatorios en diferentes sistemas neuronales de moluscos. Se caracterizan por poseer un patrón de secuencia único (-gCCS-) que incluye a las Cys 3 y 4 que los distingue de las demás familias de conotoxinas (Zugasti-Cruz *et al.*, 2006). El efecto de estas conotoxinas es el retraso o inhibición de la activación de los canales de Na⁺ activados por voltaje, generando una respuesta de hiperexcitación eléctrica (Espíritu *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha reportado que no se muestran efectos en los canales sódicos musculares, considerando así el potencial en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una defectuosa conducción nerviosa (Barbier *et al.*, 2004; Volpon *et al.*, 2004).

3.3.3 ϵ -Conotoxinas

Estas conotoxinas podrían actuar en los canales presinápticos de Ca²⁺, así como en los receptores acoplados a proteínas G. Se reportó que en *Aplysia* al utilizar la ϵ -TxIX conotoxina, ésta disminuyó selectivamente la liberación de neurotransmisores en una sinapsis colinérgica, reduciendo la afluencia presináptica de Ca²⁺ de manera lenta y reversible (Rigby *et al.*, 1999). Esta toxina tiene cuatro residuos de Cys (dos pares de Cys adyacentes separados por 4 residuos)

que forman dos puentes disulfuro, y además, presenta diversas modificaciones postraduccionales las cuales son: bromación, hidroxilación, gamma-carboxilación y glucosilación (Rigby *et al.*, 1999).

3.3.4 I-conotoxinas

Una característica distintiva de las tres conotoxinas (r11a, r11b y r11c) descritas en esta familia es la modificación post-traducciona (epimerización) de un solo residuo de aminoácido cerca del carboxilo terminal a una configuración D, así como ser péptidos excitatorios en el ensayo del músculo pectoral cutáneo de rana. Además, para el caso de la conotoxina r11a se ha demostrado su estructura bioquímica, la cual presenta un motivo similar al nudo inhibidor de cistina (*ICK*: the *Inhibitor Cystine Knot*, por sus siglas en inglés), caracterizado en toxinas de arañas. Este motivo confiere selectividad por canales de sodio activados por voltaje. (Buczek *et al.*, 2005b; Buczek *et al.*, 2005c; Buczek *et al.*, 2007; Norton y Pallaghy, 1998).

3.3.5 κ-conotoxinas

Nombradas así, ya que su función es bloquear los canales de K⁺ activados por voltaje; algunas de estas conotoxinas registradas tienen la característica de ser cardioprotectoras en modelos animales, protegiéndolos de isquemia por infarto al miocardio (Shon *et al.*, 1998b). La mayoría de estas conotoxinas son selectivas a los diferentes tipos de canales de K⁺ (Yan y Wu, 2012).

3.3.6 μ- y δ-Conotoxinas

Responsables de la inhibición (μ-) o retraso de la inactivación (δ-) de los canales de Na⁺, debido a su especificidad y selectividad hacia los diferentes subtipos de los canales, ubicados en el músculo, neuronas y corazón (Moczydlowski *et al.*, 1986; Norton y Olivera, 2006).

3.3.7 ρ-Conotoxinas

Moléculas inhibitorias no competitivas de los receptores α1-adrenérgicos, estas conotoxinas regulan la respuesta a la liberación de noradrenalina en los nervios simpáticos, involucrando mecanismos del tono vascular; se está investigando su eficiencia en el tratamiento de la hipertensión (Langer y Shepperson, 1982; Sharpe *et al.*, 2001).

3.3.8 σ -Conotoxinas

Inactivan el receptor de serotonina (5-Hidroxitriptamina) del subtipo 5-HT₃ a través de antagonismo competitivo; la toxina ρ -GVIIA ya que es un inhibidor altamente selectivo de este receptor. Se ha propuesto que las conotoxinas que contengan el residuo Br-Trp sea un determinante de la especificidad farmacológica, debido a que el antagonista endógeno de los receptores 5-HT es un derivado de triptofano hidroxilado (England *et al.*, 1998).

3.3.9 τ -Conotoxinas

Se destaca su función de interacción selectiva con el receptor de somatostatina sst₃ de forma antagonista; la toxina CnVA es actualmente la única toxina conocida que interactúa con esta subfamilia de proteínas G acopladas a receptores (GPCRs) (Petrel *et al.*, 2013).

3.3.10 χ -Conotoxinas

Inhibidoras del transportador de noradrenalina, importantes en la reducción de la concentración de noradrenalina liberada por las neuronas, cuya aplicación se ha estudiado y llevado a casos experimentales sobre los posibles efectos antidepressivos o psicoestimulantes, así como en el tratamiento de desórdenes cardiovasculares (Sharpe *et al.*, 2001).

3.3.11 ω -Conotoxinas

Inhibidoras de los canales de calcio (Ca^{2+}) activados por voltaje, los cuales modulan varios procesos fisiológicos, como la liberación de neurotransmisores y la contracción muscular (Augustine *et al.*, 1987). Estas conotoxinas presentan selectividad por los diferentes subtipos de poros iónicos, siendo una herramienta fundamental para el estudio de estos canales iónicos (Feldman *et al.*, 1987).

3.4 Conopéptidos y sus blancos moleculares

3.4.1 Conopresinas

Nonapéptidos de estructura cíclica, debido al puente disulfuro presente en la Cys1 y Cys 6. Se caracterizan por un grupo amidado en el extremo carboxilo (Janzsó *et al.*, 2009).

Sorprendentemente la función biológica de estas conopresinas es muy similar a las hormonas neurohipofisarias (vasopresina/oxitocina) de mamíferos (Dutertre *et al.*, 2008). Se sugiere que estas conopresinas son un ejemplo en la conversión evolutiva de péptidos endógenos para usos especializados en el veneno (Nielsen *et al.*, 1994).

3.4.2 Contulankinas

Es el primer péptido miembro de la familia de la neurotensina obtenido de un invertebrado. Se ha reportado también su función como un agonista en un receptor de neurotensina. Se especula su función secundaria a la exposición del veneno en una presa de caracol cono, dejando a ésta sedada completamente (proceso fisiológico iniciado después de la inyección en la presa) (Craig *et al.*, 1999).

3.4.3 Conantokinas

Son pequeños péptidos que carecen de cisteínas en su estructura primaria; bloquean el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) un tipo de receptor del glutamato, relacionado con acciones inhibitorias del sobre el sistema nervioso central (Gowd *et al.*, 2012; Platt *et al.*, 2012).

3.4.4 Contrifanos

Conopéptidos ricos en modificaciones post-traduccionales. Modulan los canales de K⁺ activados por Ca²⁺, así como canales de Ca²⁺ activados por K⁺ (Raybaudi *et al.*, 2003).

3.4.5 Conorfamidas

Conopéptidos biológicamente activos en el sistema nervioso central de mamíferos. Pertenecen a la familia FMRFamida de los neuropéptidos (Maillo *et al.*, 2002). Se ha propuesto que los blancos moleculares pueden ser los receptores de tres distintos tipos de FaRPs: 1) receptores acoplados a proteínas G, 2) canales de Na⁺ activados por FMRFamida (**FaNaCs**) y 3) canales iónicos sensibles a ácido (**ASICs**, por su abreviatura del inglés) (Aguilar *et al.*, 2008).

4 ANTECEDENTES

Whyte y Endean publicaron una primera exposición del veneno al tejido nervioso de rata; en 1962 publican *Studies of the venoms of some Conidae* donde describen la primera aproximación experimental de los diferentes venenos, según la alimentación de los conos y en 1974, Endean publican otro artículo donde evidencian la presencia de diferentes péptidos presentes en los caracoles cono (Whyte y Endean, 1962; Endean et al., 1974). En 1978 el Dr. Baldomero Olivera publicó la primera caracterización bioquímica del veneno del caracol *Conus geographus* y *C. textile* (Cruz et al., 1978). Cerca de cumplir 40 años de que comenzó el estudio de estos venenos se han producido más de 4,500 artículos, contando al menos los indexados en la base de datos especializada en biomedicina, **PubMed**.

En México, la investigación sobre conotoxinas no se queda atrás; sin embargo aún hay mucho por investigar, principalmente por el número de especies descritas en México cuyos venenos inician a ser caracterizados, como es el caso de *C. nux*. Lo cual se observa por la revisión bibliográfica realizada por PubMed y analizada con *GoPubMed* (Figuras 13, 14 y 15).

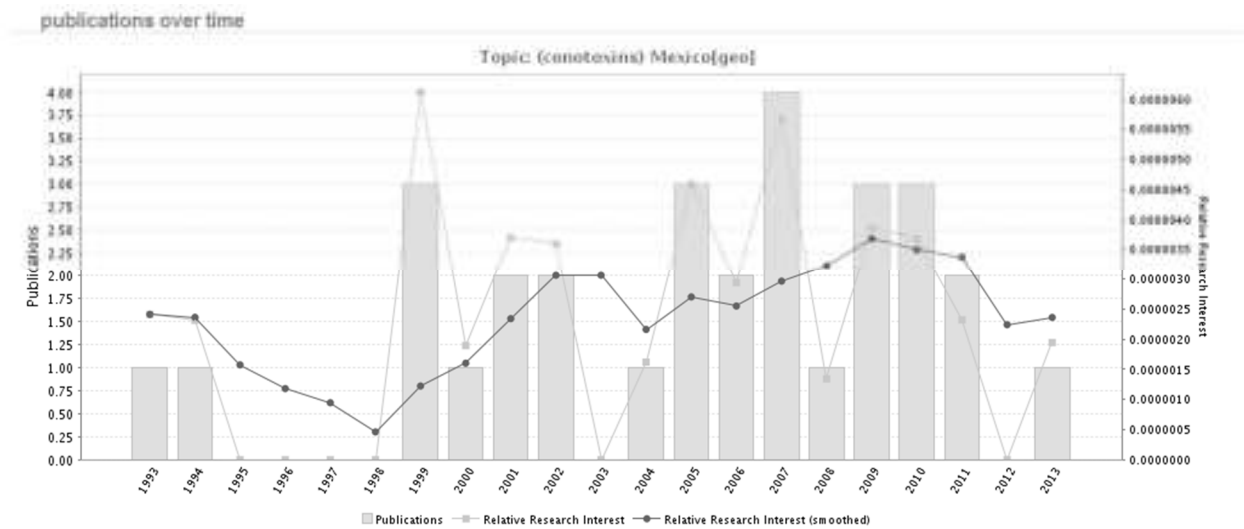


Figura 13. Histograma de publicaciones para México sobre conotoxinas.



Figura 14. Indicadores de la producción científica sobre conotoxinas en México, basados en PubMed.

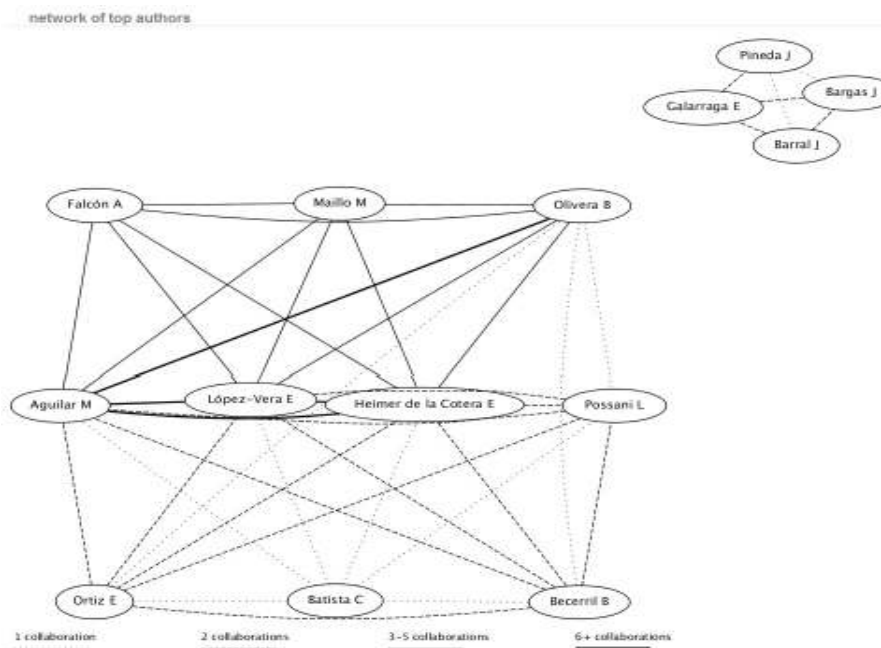


Figura 15. Principales autores y colaboración de los investigadores mexicanos con área de estudio sobre conotoxinas.

5 JUSTIFICACIÓN

Flores-Martínez reportó la presencia de conotoxinas pertenecientes a la superfamilia A, T y O, en el transcriptoma de *C. nux* por técnicas de RT-PCR. Sin embargo, no hay ningún trabajo que reporte la presencia de éstas en los conductos venenos para esta especie. Es por ello que en este trabajo nos enfocamos a la caracterización bioquímica de conotoxinas pertenecientes a la superfamilia A, T y O presentes en *C. nux*. Cabe mencionar que las superfamilias antes mencionadas, son las más estudiadas por su aplicación como herramientas moleculares y su potencial uso farmacológico (Flores-Martínez, 2011).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

- ✓ Identificar la expresión de conopéptidos pertenecientes a las superfamilias A, T y O en el veneno de *Conus nux*.

6.2 Objetivos particulares

- ✓ Purificar los conopéptidos mayoritarios presentes en el veneno
- ✓ Caracterizar la estructura primaria de los conopéptidos mayoritarios.
- ✓ Identificar si los conopéptidos mayoritarios y caracterizados en este trabajo coinciden con los reportados para las superfamilias A, T y O en *C. nux*.

7. HIPÓTESIS

- ✓ Dado a que las conotoxinas pertenecientes a las superfamilias A, T y O se encuentran en la mayoría de las especies de *Conus* y se ha demostrado su expresión por técnicas de biología molecular, en *C. nux* serán de igual manera componentes principales en el veneno.

8. MATERIAL

8.1 Material biológico

Los especímenes de moluscos pertenecientes al género *Conus nux* fueron obtenidos en playas las gatas, en las costas de Zihuatanejo Guerrero, México. Los moluscos se congelaron a -70°C hasta el momento del estudio.

9. MÉTODO

9.1 Extracción del veneno

El veneno de *C. nux* se obtuvo a partir de disecar el conducto venenoso de 28 organismos. Los conductos se colocaron en 1.5 ml de solución de extracción de proteínas [40% (v/v) acetonitrilo y 2% (v/v) ácido trifluoroacético]. Se homogenizó con 15 golpes en un homogeneizador de tejidos de vidrio y un émbolo de teflón. La solución obtenida se centrifugó a 16,300 x g por 15 minutos. Se separó y etiquetó el sobrenadante (veneno) y el sedimento. Ambas fracciones se almacenaron a -20°C .

9.2 Purificación de péptidos por RP-HPLC

Las separaciones de los péptidos del veneno se realizaron por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), en el laboratorio de Toxinología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, con un equipo *Varian ProStar*, una columna analítica C18 (Vydac, 218TP54, 4.6 x 250 mm, 5 μm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) equipada con una pre columna (218TP54, 5 μm de tamaño de columna, 4.6 x 10 mm). Los péptidos se eluyeron a temperatura ambiente con un gradiente de 5% - 100% de solución B en 95 minutos, con un incremento de B de 1% por minuto y un flujo de 1.5 ml/min. La detección de péptidos se realizó con un espectrofotómetro de flujo ajustado a 220 nm de longitud de onda. Los péptidos fueron colectados en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se llevaron a sequedad mediante un evaporador centrífugo *Thermo Savant SPD1010*. Se purificaron los péptidos mayoritarios obtenidos en la separación de venenos, empleando las mismas soluciones de elución (solución A y B) con diferentes gradientes de elución (Figura 16 y anexo 3).

9.3 Secuenciación de péptidos

La estructura primaria de los péptidos purificados se determinó mediante la secuenciación química automática, empleando el método de degradación de Edman; se usó un secuenciador de *Applied Biosystems* modelo PROCISE 491, ubicado en la unidad de proteogenómica del Instituto de Neurobiología-UNAM, en Juriquilla, Qro., y operado por el Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez.

9.4 Espectrometría de masas

La determinación de las masas de cada péptido se realizó a través de la técnica de ionización mediante rocío de electrones (*Electrospray Ionization Mass Spectra*; ESIMS) utilizando un espectrómetro de masas Micromass Quattro II de triple cuadrupolo, en la Universidad de Utah, en Salt Lake City.

9.5 Análisis de secuencias obtenidas

Dicho análisis se realizó en la *Web* con el programa llamado **BLAST**² para detectar similitud con conopéptidos reportados en la literatura, con el fin de poder clasificar nuestros péptidos dentro de una familia de conotoxinas. También se corroboró la información con la biblioteca de conopéptidos **ConoServer** (Kaas *et al.*, 2010; Kaas *et al.*, 2008; Kaas *et al.*, 2012).

²BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine.

10. DISEÑO EXPERIMENTAL

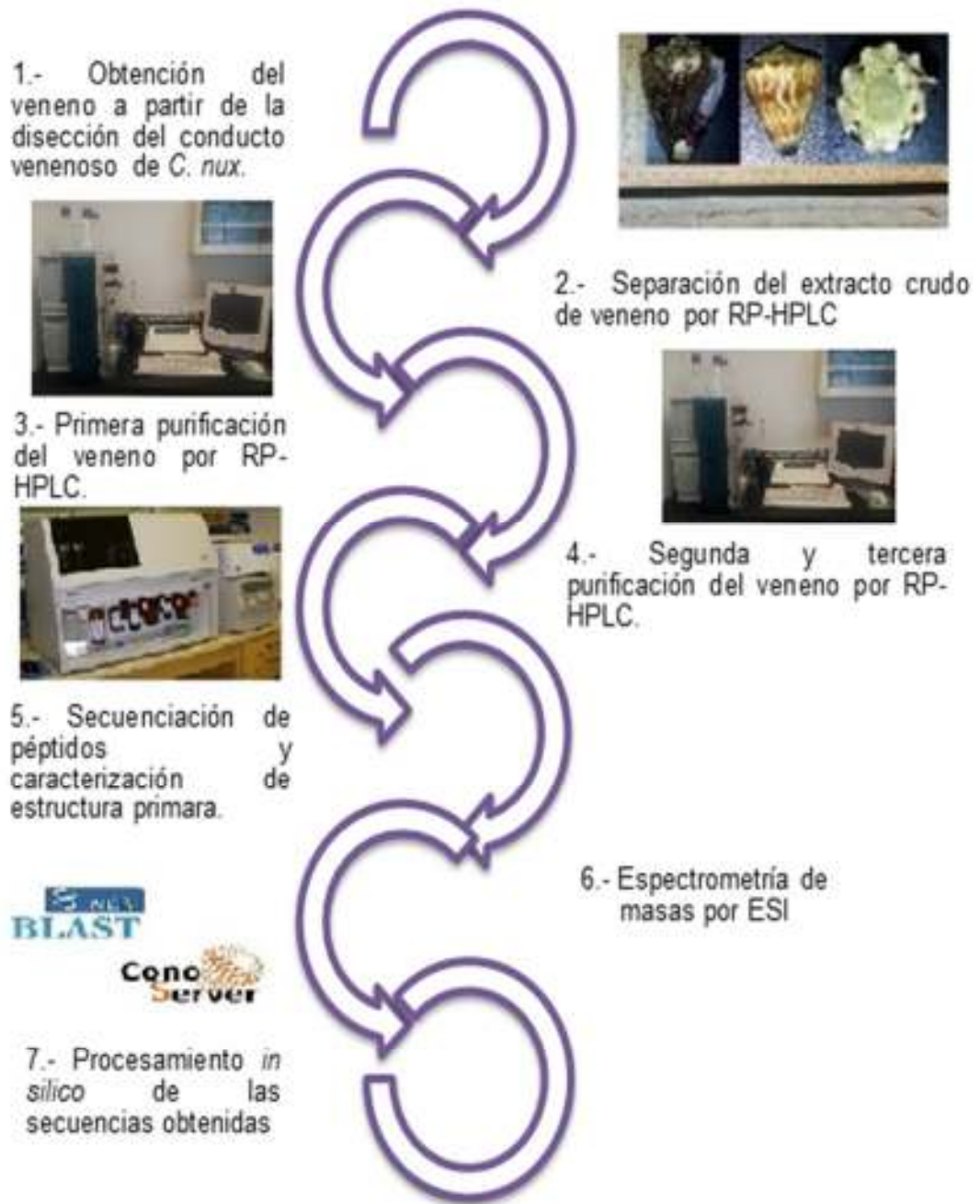


Figura 16. Representación esquemática del diseño experimental que se llevará a cabo en esta tesis.

11. RESULTADOS

11.1 Extracción de veneno

Se obtuvo un lote de veneno a partir de 28 organismos, los cuales presentaban una talla longitudinal de aproximadamente 3 cm. Se aislaron los conductos venenosos de solo 26 ejemplares, dado a que uno presentaba cierto grado de putrefacción y otra de las conchas estaba ocupada por un cangrejo ermitaño. Cabe, mencionar que la longitud de cada conducto venenoso era entre 15 y 30 cm (Figura 17). El lote se homogenizó en la solución de extracción y se obtuvo un volumen total de 3.5 ml de extracto crudo de veneno.

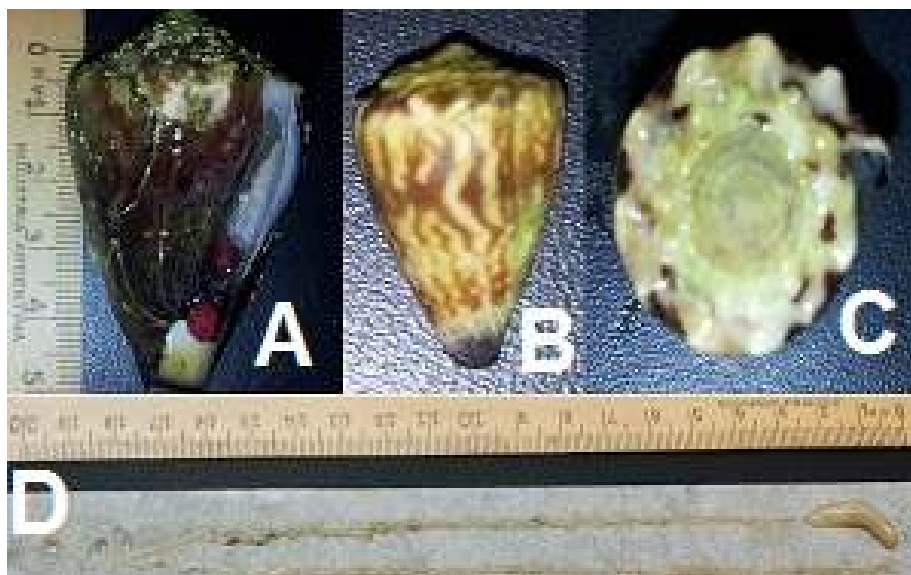


Figura 17. *Conus nux* procesado en esta tesis: A) cara ventral; B) cara dorsal; C) corona y D) ducto venenoso de aproximadamente 40 cm.

11.2 Fraccionamiento del veneno, purificación por RP-HPLC y espectrometría de masas

La caracterización sistemática de los componentes del veneno de *C. nux* se inició mediante la purificación de tres picos prominentes llamados fracciones 11, 16 y 19; a partir de la separación por RP- HPLC del extracto crudo de veneno, en un total de 22 fracciones (Figura 18).

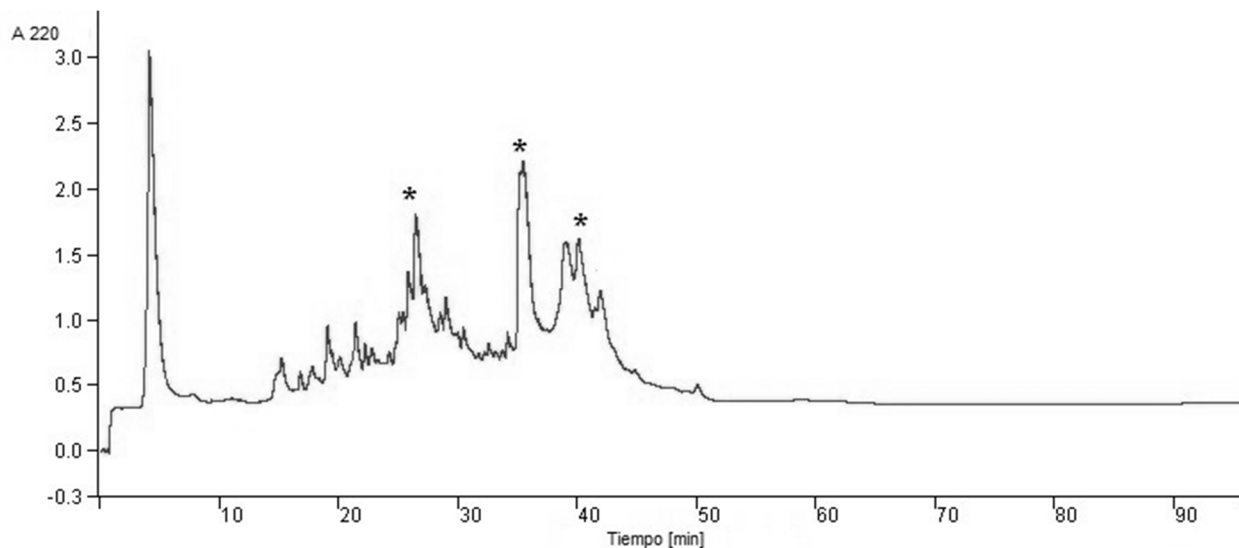


Figura 18. Extracto crudo de veneno aislado de *C. nux* fraccionado mediante RP-HPLC en una columna Vydac C18.* Se muestran las fracciones 11, 16 y 19 (de izquierda a derecha). El primer pico corresponde al artefacto de inyección o fracción no retenida.

En las repurificaciones de las fracciones 11, 16 y 19 obtenidas del extracto crudo se obtuvieron 9 subfracciones de la fracción 11 y 8 subfracciones de la fracción 19 como se muestran en la Figura 19. Para el caso de la fracción 16, el cromatograma refleja solo un componente mayoritario con una pequeña contaminación por presentar un hombro, el cual se nombró como **T13CN16** (Figura 20) y cuya masa experimental (m/z) es de 6308.53 Da (Figura 21).

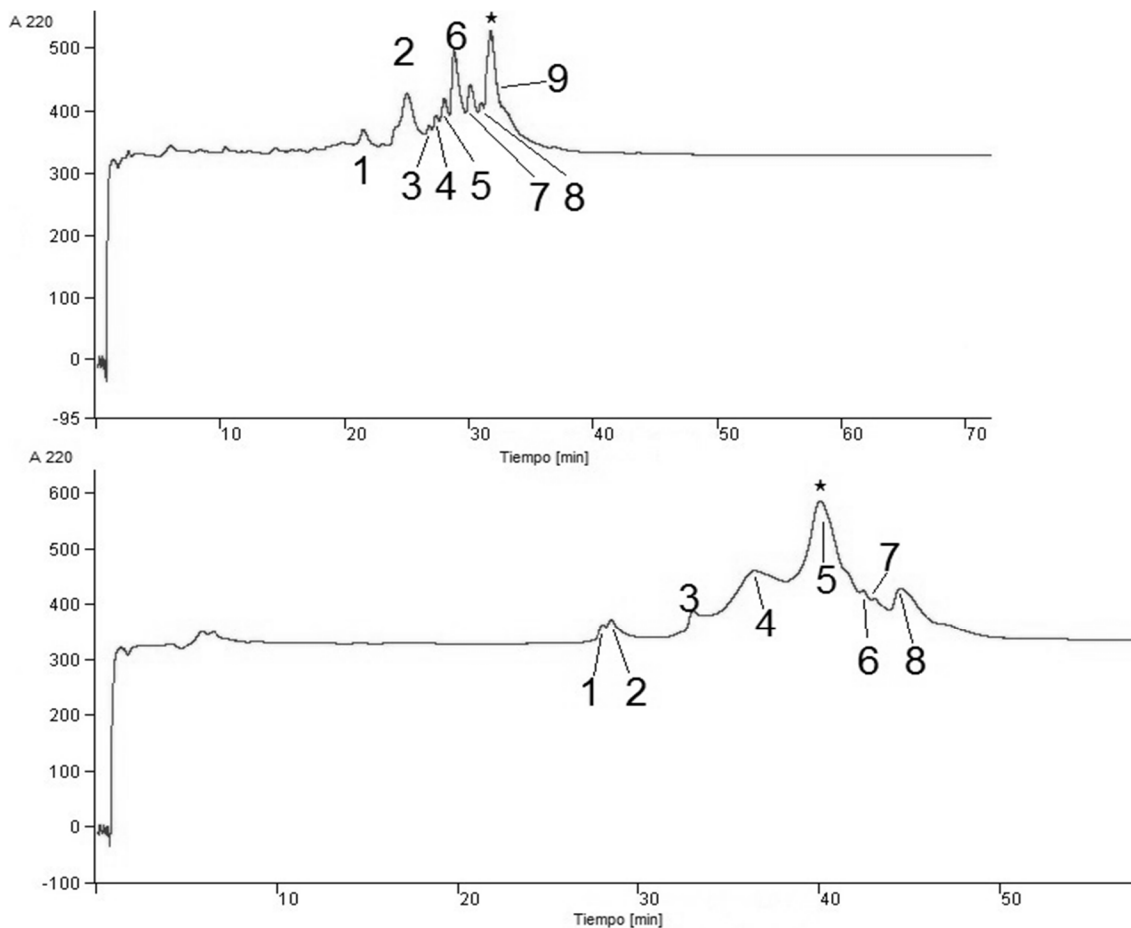


Figura 19. Cromatograma de las subfracciones obtenidas para las fracciones 11 y 19 (arriba y abajo respectivamente). Con * se muestran los picos relevantes para este estudio, sometidos a una re-purificación adicional.

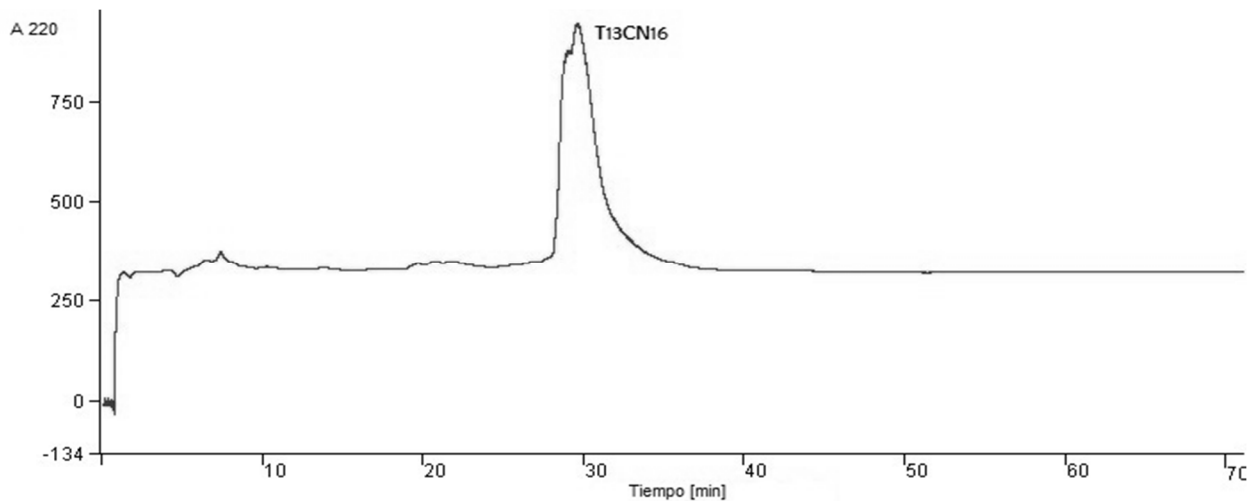


Figura 20. Cromatograma de la fracción 16 que muestra un solo componente, llamado en este trabajo como **T13CN16**.

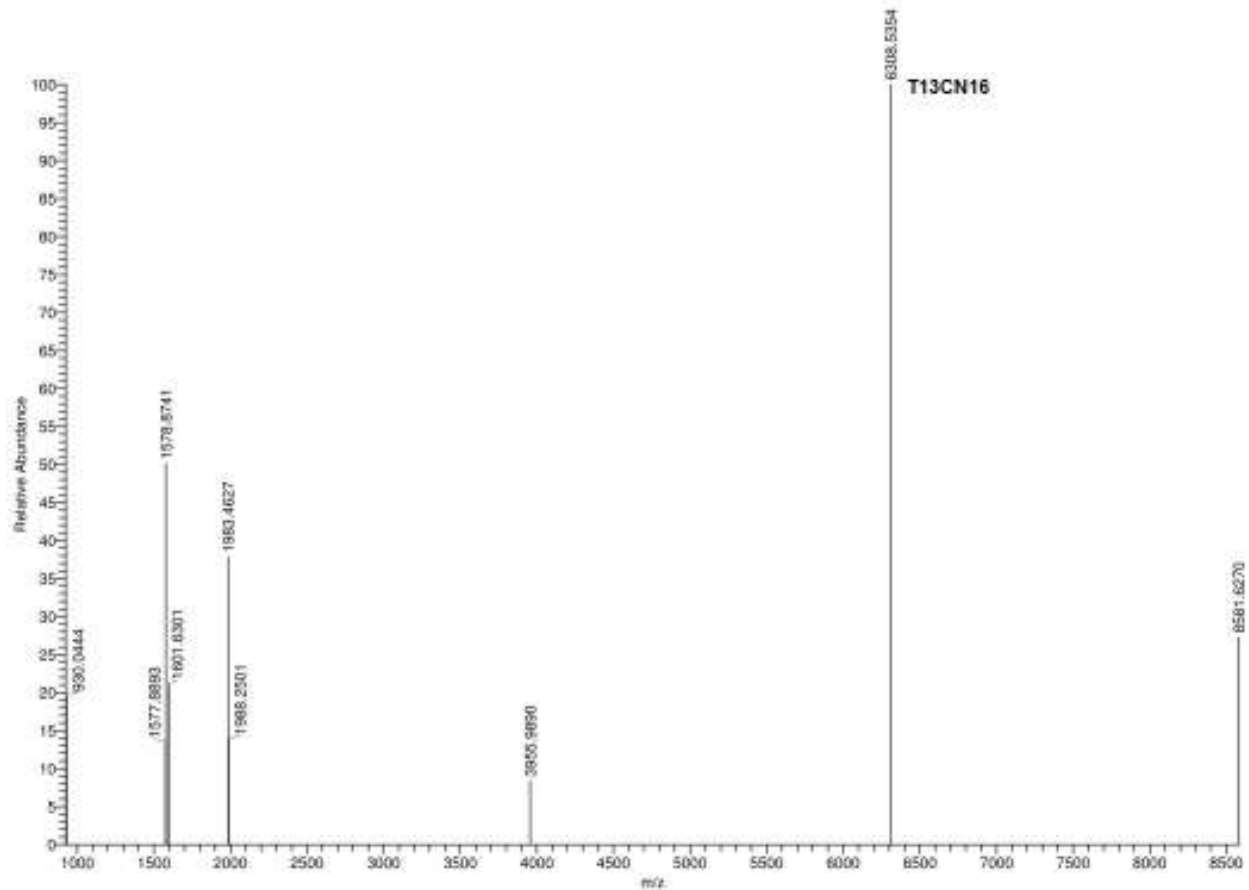


Figura 21. Espectrometría de masas (ESI) de la fracción **T13CN16**. La masa experimental de esta fracción es de 6308.53 Da.

En la re-purificación de la subfracción 9 de la fracción 11 se obtuvieron cinco subfracciones y se seleccionó el componente mayoritario para los análisis de la estructura primaria y peso molecular. Se le nombró **T6CN11** (Figura 22) cuya masa (m/z) obtenida por ESI fue de 1983.43 Da, como se muestra en la Figura 23. De la fracción 19 se re-purificó el pico 5 y se obtuvo una fracción llamada **T4CN19** (Figura 24) cuya masa (m/z) obtenida por ESI fue de 3527.34 Da, como se observa en la Figura 25.

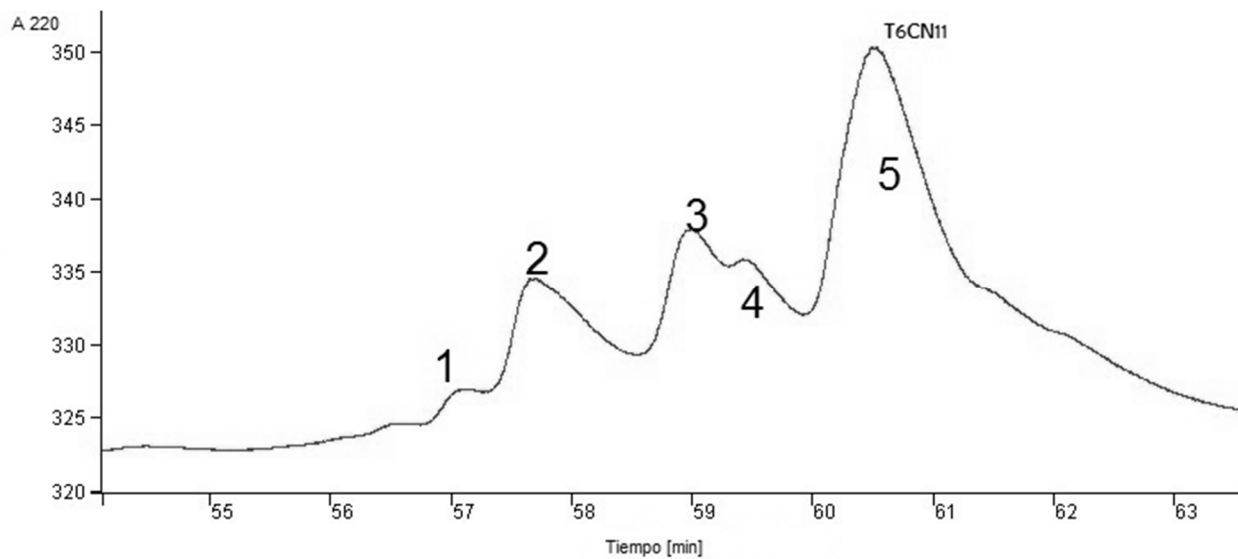


Figura 22. Cromatograma de la fracción 11 re-purificada que señala **T6CN11**.

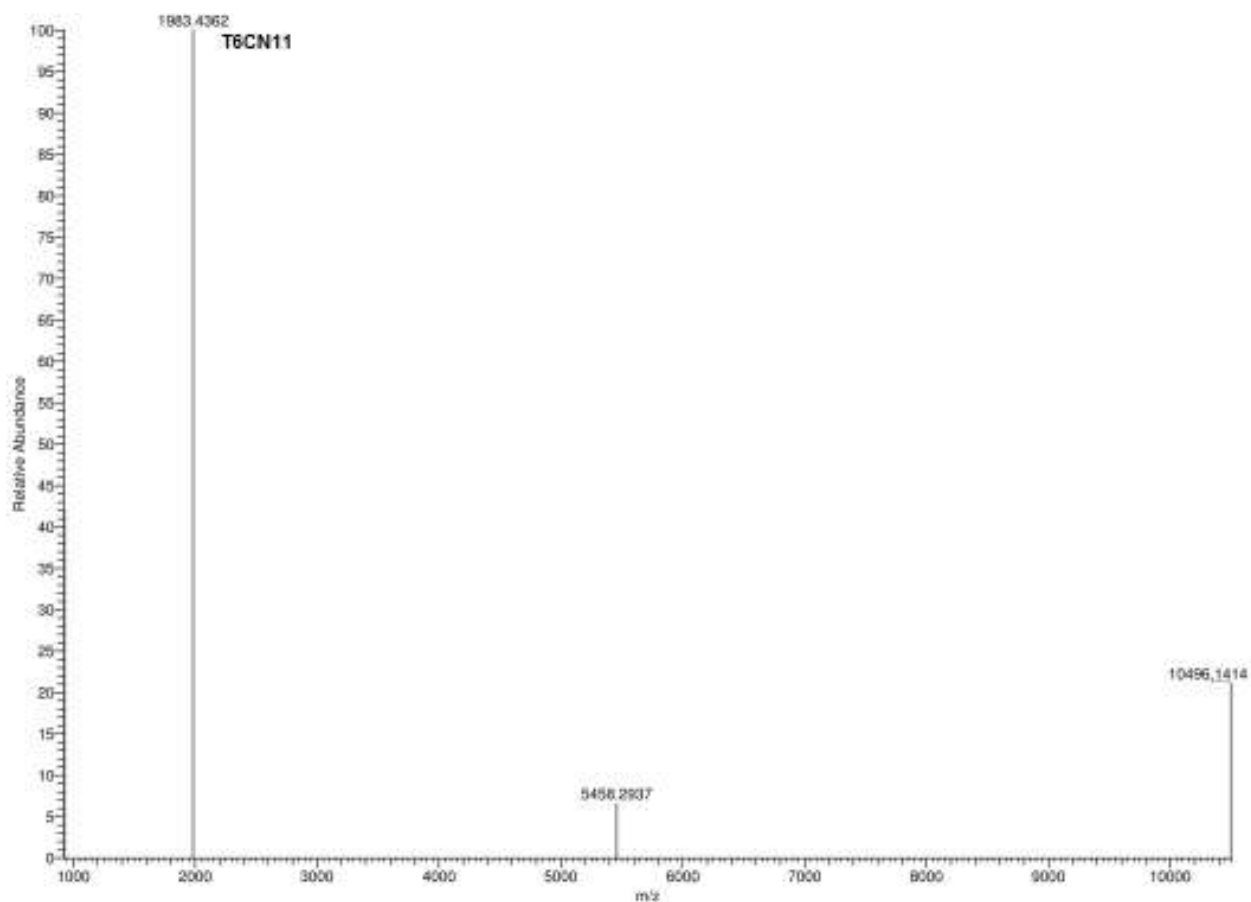


Figura 23. Espectrometría de masas (ESI) de la fracción **T6CN11**.

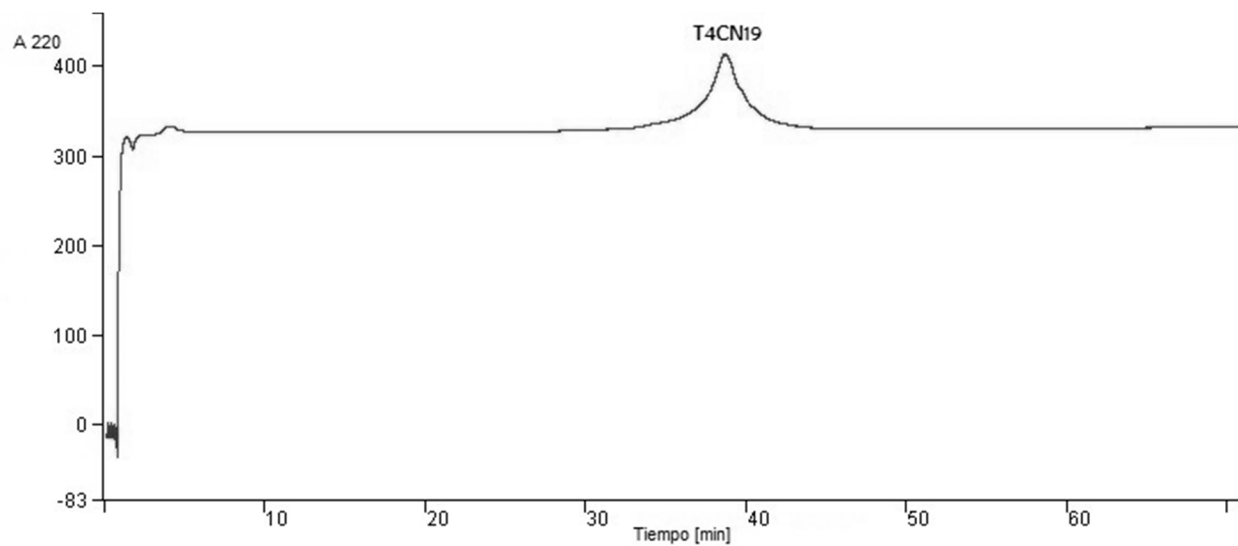


Figura 24. Cromatograma de la fracción 10 en la segunda re-purificación que señala **T4CN19**.

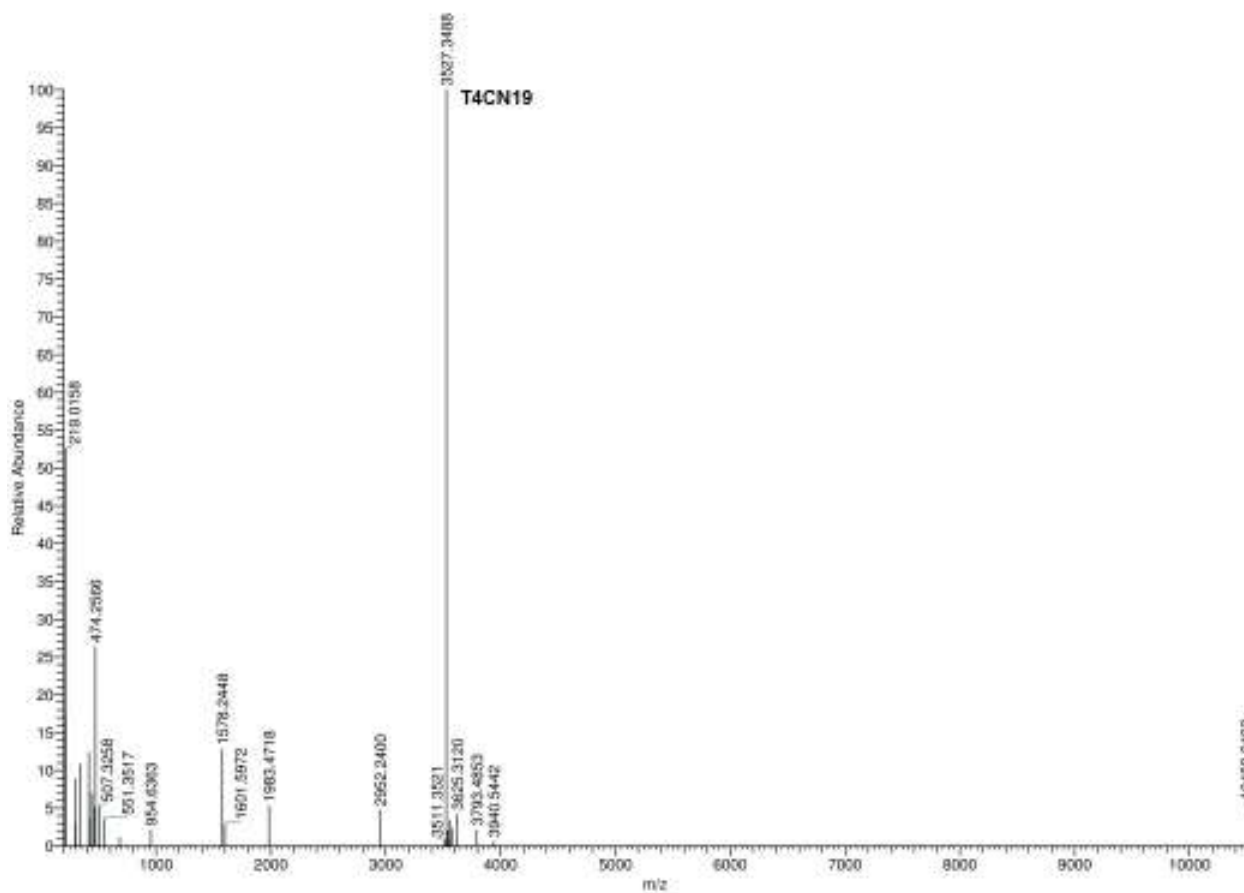


Figura 25. Espectrometría de masas (ESI) de la fracción **T4CN19**.

11.3 Determinación de la estructura primaria

En la Tabla 1 se muestra las secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos de las fracciones **T13CN16**, **T6CN11** y **T4CN19** determinadas por el método de degradación de Edman. Se procedió a secuenciar cada una de las muestras sin reducir y alquilar, por lo que no fue posible determinar los residuos Cisteína (Cys) por este método; sin embargo, el no ver incrementos en rendimientos para algunos ciclos, permite asumir que estas posiciones estén ocupadas por Cys (ver anexo 4 y 5). Para saber si los péptidos estaban totalmente caracterizados, se cotejaron las sumas de cada uno de los aminoácidos que los constituyen con las masas obtenidas por espectrometría de masas.

Tabla 1. Secuencias parciales de los conopéptidos purificados de *C. nux.* (C), posible cisteína; (_), aminoácidos no identificados por degradación de Edman; (O), hidroxiprolina; (av.), Masa promedio calculada para algunas variantes isotópicas presentes en la secuencia; (Mono), Masa calculada tomando una variante isotópica de cada elemento.

Péptido	Estructura primaria	Peso molecular calculado (Daltons) ³	Peso molecular experimental (Daltons)	No. aa
T13CN16	DEVSASLSHCYLPQFRMCFLVCQTLGDDASCCFAGCTVDI	4343.94 (av.) 4340.84 (mono)	6307.53	40
T6CN11	CQAYGESCSAVVTCCGRYAVCCQYPAEAVCVTRGYVCPA_T_I_	4389.07 (av.) 4385.87 (mono)	1982.43	42
T4CN19	CVKKYYFCGLPHHTOYCCGSLHCSCFVVR	3361.97 (av.) 3343.48 (mono)	3526.34	29

³ Calculado con el programa *Ion Source* (Andrew Guzzetta, 2000), pensando en la formación de puentes disulfuro (cisteínas oxidadas).

11.4 Comparación *in silico* de las secuencias

La comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo con las reportadas en las bases de datos digitales se realizó utilizando los servicios de BLAST y ConoServer; en el caso de BLAST se acotó la comparación solo con secuencias de proteínas reportadas para moluscos, mientras que ConoServer es una base de datos solo para conotoxinas.

Al realizar la comparación para la secuencia **T13CN16** mediante ConoServer, éste arrojó ninguna similitud y al utilizar BLAST mostró una homología con 2,467 secuencias, de las cuales: **Co6.7** de *C. coronatus* y **M11.2** de *C. magus* tuvieron valores de similitud del 45.45 y 47.05 %, respectivamente (Figura 26).

```
>>Co6.7 (31 aa)
  initn: 44 initl: 44 opt: 68 Z-score: 143.6 bits: 28.4 E(): 0.019
  Smith-Waterman score: 68; 45.455% identity (63.636% similar) in 22 aa overlap (21-38:5-26)

      10      20      30      40
Query. DEVSASLSHCYLPQFRMCFLVCQTLGD---DASCCFAGCTVDI
      ::  ::  :::::  ...
Co6_7      WIVGVCRLPGLDLCAGDASCCEHSCNIVHTCD
           10      20      30

>>M11.2 (35 aa)
  initn: 52 initl: 52 opt: 69 Z-score: 139.9 bits: 27.9 E(): 0.03
  Smith-Waterman score: 69; 47.059% identity (70.588% similar) in 17 aa overlap (23-39:7-23)

      10      20      30      40
Query. DEVSASLSHCYLPQFRMCFLVCQTLGDDASCCFAGCTVDI
      :  :::::  :  :
M11_2      TCSNKGQQCGDSDCCWHLCCVNNKCAHLILLCNL
           10      20      30
```

Figura 26. Resultados del análisis de homología en *ConoServer* de la secuencia **T13CN16**. Los dos puntos verticales entre las secuencias (:) indican que se trata del mismo aminoácido; (.) indica una substitución conservativa. Para mayor detalle de las secuencias homólogas ver el anexo 6.

El análisis de la secuencia de **T6CN11**, tanto en BLAST como en ConoServer, asegura una homología con **Rg11a** de *C. regius* con un 80% de identidad aproximadamente en los dos servicios de consulta (Figura 27).

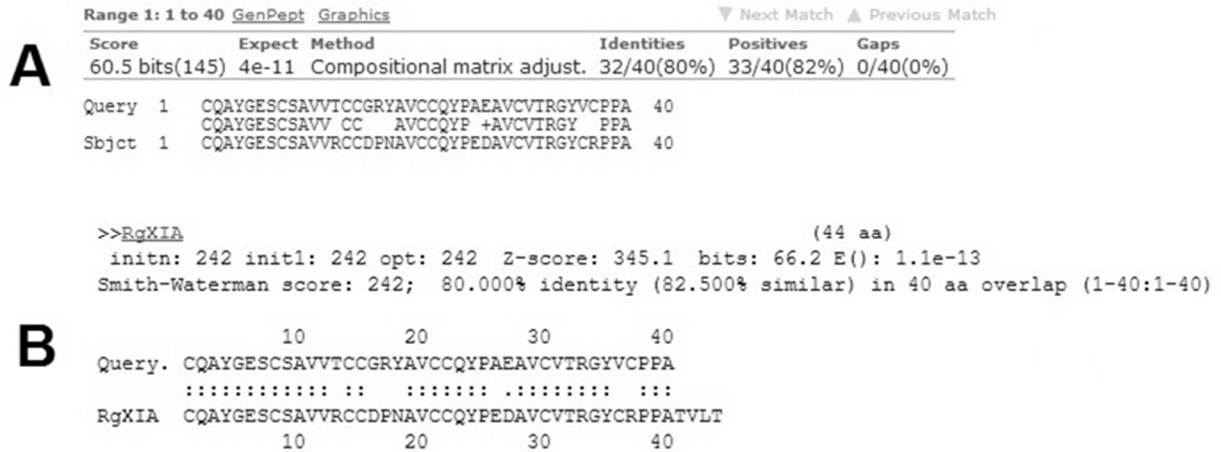


Figura 27. Comparación del péptido **T6CN11** por alineamiento utilizando. A) BLAST y B) ConoServer.

El análisis de la secuencia de **T4CN19**, tanto en BLAST como en ConoServer, evidencian la homología con la conotoxina registrada como **C16.2** de *C. californicus* con una homología promedio de 50.02% de identidad (Figura 28).

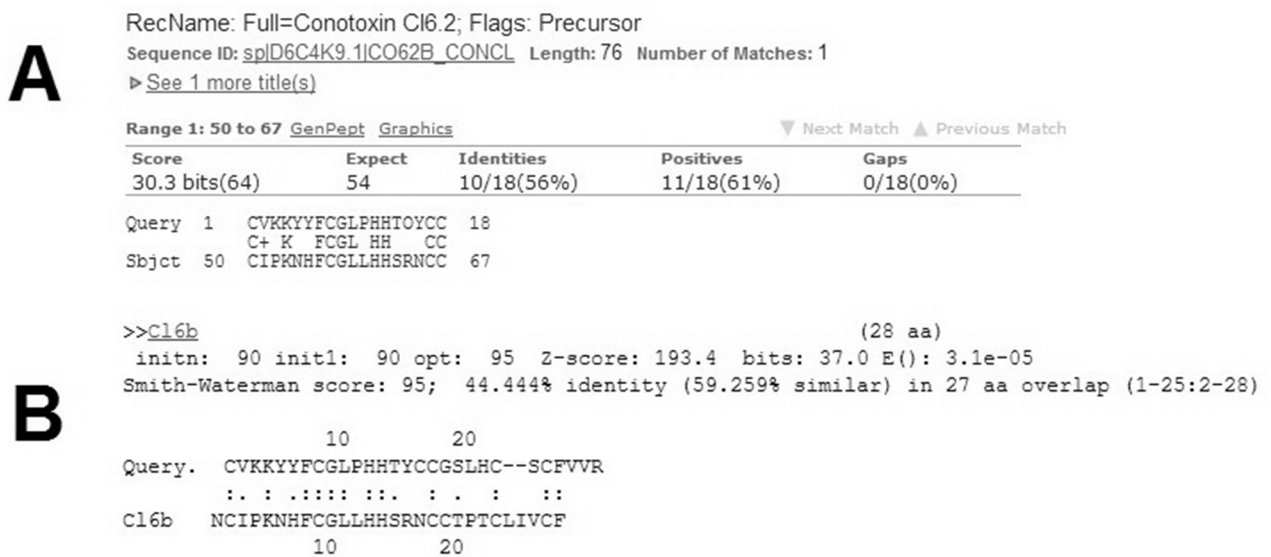


Figura 28. Análisis de **T4CN19**. A) BLAST y B) ConoServer.

12. DISCUSIÓN

El análisis de los péptidos y las proteínas complejas (proteómica) presentes en los venenos de los animales proporciona gran cantidad de datos toxicológicos de interés fisiológico, molecular, biotecnológico y biomédico; dependiendo del contexto en el que se maneje dicha información, también puede servir para realizar investigación básica y aplicada debido a su potencial uso terapéutico. Cuando se realiza un análisis total de los datos proteómicos obtenidos por la secuenciación y/o purificación de venenos presentes en los organismos se denomina **Venómica** (*Venomics*, en inglés) (Davis *et al.*, 2009; McIntosh y Jones, 2001; Dutertre *et al.*, 2010; Biass *et al.*, 2009); en esta área resalta la investigación que se realiza sobre conotoxinas, por su reciente conocimiento y porque presentan una diversidad de péptidos componentes del veneno. Por estas razones, se investigaron los componentes principales del veneno del caracol *C. nux* para caracterizarlos y contribuir en el conocimiento en los análisis venómicos futuros.

Como aportación principal de este proyecto se reporta el descubrimiento de tres péptidos parcialmente caracterizados de la especie *C. nux*. El primero de ellos es el péptido obtenido de la fracción **T13CN16** con una identidad del 45.5% con la conotoxina **Co6.7** del caracol vermívoro *C. coronatus* (Kaufenstein *et al.*, 2011), conotoxina clasificada en la superfamilia O1, con un arreglo de cisteínas VI/VII (C-C-CC-C-C; con enlaces en las posiciones de cisteína I-IV, II-V, III-VI) (Olivera *et al.*, 1984). Asimismo, **T13CN16** presentó una identidad mayor del 47.059% con **M11.2**, obtenida de *C. magus* de alimentación piscívora (Buczek *et al.*, 2008) y clasificada en la superfamilia 1 con un arreglo de cisteínas XI (C-C-CC-CC-C-C con enlaces en las posiciones de cisteína I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII) (Jiménez, 2003; Buczek *et al.*, 2008). A pesar, que presenta una homología casi del 50% con ambos péptidos, la similitud es solamente hacia la región carboxilo terminal de **T13CN16**. Además, la disposición de los residuos cisteína no coincide con ninguno de los dos péptidos debido a que la tercera y cuarta cisteína están adyacentes para Co6.7 y M11.2, mientras que para T13CN16 se presenta para el cuarto y quinto residuo de cisteína descartando así que sean homólogos.

No obstante y prediciendo el posible patrón de cisteína para **T13CN16** este podría ser similar en dado caso al patrón XIII el cual es C-C-C-CC-C-C-C (Aguilar *et al.*, 2013). Esta conjetura es plausible debido a que la masa promedio obtenida por ESI para **T13CN16** es de 6307.53 Da, y la masa promedio calculada considerando tres puentes disulfuro es de 4343.94 Da, lo cual nos hace pensar que el péptido es aún más grande y que no hemos secuenciado todo el conopéptido.

Si esta predicción es correcta y considerando como promedio de masa para los aminoácidos es en 110 Da aproximadamente, entonces nos hacen falta conocer alrededor de 16 aminoácidos; esperando así que dentro de esta secuencia faltante se encuentren las otras dos cisteínas restantes. Bajo este esquema **T13CN16** pudiera considerarse como un tercer péptido dentro de la superfamilia G descrita por Aguilar et al. (2013).

Al comparar **T13CN16** con las toxinas identificadas por biología molecular de *C. nux* por Flores-Martínez (2011), no se encuentra ninguna homología con las secuencias reportadas por el autor. Asumiendo que esta es una nueva conotoxina para *C. nux*, la cual siguiendo la nomenclatura propuesta por Walker, sería nombrada **Cnu6.1** (Walker et al., 1999), sustituyendo las nomenclaturas reportadas en los trabajos de Duda et al. (2008) y Flores-Martínez (2011) ya que estos trabajos son análisis basados en el transcriptoma y no se han caracterizado bioquímicamente.

La fracción **T6CN11** presenta un 80% de identidad con la conotoxina **RgXIA**, obtenida del caracol vermívoro *C. regius* (Franco et al., 2012; Braga et al., 2005; Braga et al., 2013), la cual se clasifica en la superfamilia I1 y cuyo arreglo de cisteínas es C-C-CC-CC-C-C (con enlaces en las posiciones de cisteína I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII). De los 40 aminoácidos que se obtuvieron por degradación de Edman, solo difieren siete residuos intercisteínas, lo cual hace suponer que presente el mismo patrón de puentes disulfuro, tal como se muestra en la Figura 29. Sin embargo, el resultado obtenido por espectrometría de masas **ESI** muestra tres valores en el espectro que van de mayor a menor en cuanto a abundancia relativa de $m/z = <10496 < 5458.29 < 1983.43$. Una posible explicación a esta incongruencia sería una posible degradación del péptido.

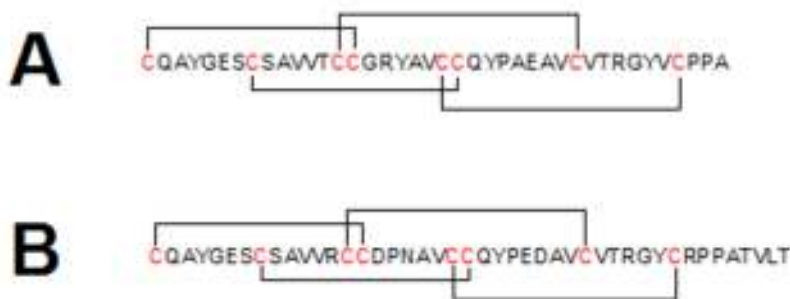


Figura 29. A) Posible conectividad de las cisteínas para **T6CN11**, basado en B) la estructura de cisteínas de **Rg11A**.

Por último, la fracción **T4CN19** se presume que es un péptido maduro según la predicción de ConoPrec (Kass *et al.*, 2008, Kass *et al.*, 2012). Presenta una identidad promedio del 50.02% con **C16.2**, también conocida como **C16b**, obtenida de *C. californicus* (Biggs *et al.*, 2010), y clasificada en la superfamilia O1 con un arreglo C-C-CC-C-C (con enlaces en las posiciones de cisteína I-IV, II-V, III-VI) (Olivera *et al.*, 1984). Debido a que presenta el mismo patrón de cisteína que C16.2 la conectividad sería la que se muestra en la Figura 30.

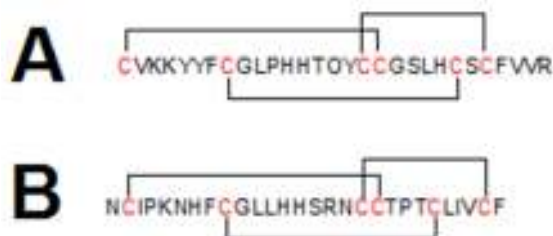


Figura 30. A) Posible conectividad cisteínas para **T4CN19**, basado en B) la estructura de cisteínas de **C16.2**.

La masa calculada considerando las cisteínas oxidadas más la hidroxilación de prolina para **T4CN19** es de 3361.97 Da, mientras que la masa experimental obtenida por ESI es de 3526.34 Da, teniendo como resultado una diferencia de 164.37 Da. Esta diferencia en la masa pudiera corresponder a una glicosilación por un monosacárido ya sea una galactosa o manosa, dado que la diferencia de alguna de estas sería de 162.1 Da. De considerar esta modificación plausible, la fracción **T4CN19** estaría completamente caracterizada, por consiguiente el conopeptido se nombraría como **Cnu6.2**.

Dentro de la superfamilia O1 se clasifican diversas familias farmacológicas por lo cual dependiendo de la familia farmacológica en la que se encuentre **T4CN19**, será su acción biológica. Pudiendo ser estas ω -conotoxinas como bloqueadoras de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, κ -conotoxinas bloqueadoras de los canales de K^+ voltaje-dependientes; o bien δ y μ O-conotoxinas que afectan canales de Na^+ voltaje-dependientes (McIntosh *et al.*, 1995; Heinemann y Leipold, 2007).

Los datos obtenidos en este trabajo y comparados con los resultados del trabajo de Flores-Martínez (2011), demuestran que la única superfamilia obtenida de los picos mayoritarios encontrados en el veneno de *C. nux* es la superfamilia O, sin embargo, aún falta por explorar los picos minoritarios y probablemente se encuentren las superfamilias A y T, en menor proporción.

13. CONCLUSIONES

- Se caracterizaron parcialmente 3 nuevos péptidos del veneno de *C. nux*.
 - **T13CN16**
 - **T6CN11**
 - **T4CN19**
- El péptido **T13CN16** por presentar posiblemente un patrón de cisteínas XIII dentro de la clasificación de conotoxinas pudiera pertenecer a la superfamilia G.
- El péptido **T6CN11** por homología pertenece a la superfamilia I1 cuyo blanco molecular pudieran ser los canales de Na⁺ activados por voltaje (VGSC), principalmente al subtipo Nav1.6.
- El péptido **T4CN19** por similitud pertenecen a la superfamilia O1. Es probable que se encuentre en alguna de las siguientes familias farmacológica: ω-conotoxinas como bloqueadoras de canales de Ca²⁺ activados por voltaje, κ-conotoxinas bloqueadoras de los canales de K⁺ activados por voltaje; o bien δ y μO-conotoxinas que afectan canales de Na⁺ activados por voltaje.

14. PERSPECTIVAS

- Muestrear más caracoles, disecar el conducto venenoso de cada caracol y caracterizar las mismas fracciones, con el fin de obtener las secuencias completas.
- Reducir y alquilar a los conopéptidos, para confirmar la presencia de residuos de cisteínas presentes en las secuencias.
- Cortar con enzimas específicas a las secuencias grandes (**T13CN16** y **T6CN11**) para obtener la secuencia completa.
- Determinar la posición de glicosilación para **T4CN19**.
- Identificar los blancos moleculares de estas toxinas, proponiendo a los ovocitos de *Xenopus leavis* como modelo de expresión heteróloga para los posibles blancos moleculares (canales específicos) y usar la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos para ver la interacción de nuestros péptidos sobre éstas proteínas de membrana.

15. REFERENCIAS

Aguilar M, Luna-Ramírez K, Echeverría D, Falcón A, Olivera B, Heimer de la Cotera E, Maillo M. 2008. Conorfamide-Sr2 a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides*, 29 (2): 186-95.

Aguilar M, Ortiz E, Kaas Q, López-Vera E, Becerril B, Possani LD, de la Cotera EP. 2013. Precursor de13 1 from *Conus delessertii* defines the novel g gene superfamily. *Peptides*, 41: 17-20.

Alex AB, Saunders GW, Dalpé-Charron A, Reilly CA, Wilcox KS. 2011. CGX-1007 prevents excitotoxic cell death via actions at multiple types of NMDA receptors. *Neurotoxicology*, 32 (4): 392-399.

Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ. 1987. Calcium action in synaptic transmitter release. *Annual Review of Neuroscience*, 10: 633-693.

Bandyopadhyay PK, Garrett JE, Shetty RP, Keate T, Walker CS, Olivera BM. 2002. Gamma-Glutamyl carboxylation: An extracellular posttranslational modification that antedates the divergence of mollusc's arthropods and chordates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (3): 1264-1269.

Barbier J, Lamthanh H, Le Gall F, Favreau P, Benoit E, Chen H, Molgó J. 2004. A delta-conotoxin from *Conus ermineus* venom inhibits inactivation in vertebrate neuronal Na⁺ channels but not in skeletal and cardiac muscles. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (6): 4680-4685.

Biaass D, Dutertre S, Gerbault A, Menou JL, Offord R, Favreau P, Stöcklin R. 2009. Comparative proteomic study of the venom of the piscivorous cone snail *Conus consors*. *Journal of Proteomics*, 72 (2): 210-218.

Biggs JS, Watkins M, Puillandre N, Ownby JP, Lopez-Vera E, Christensen S, Moreno KJ, Bernaldez J, Licea-Navarro A, Corneli PS, Olivera BM. 2010. Evolution of conus peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* reeve, 1844. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56 (1): 1-12.

Bowersox S, Luther R. 1998. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an n-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon*, 36 (11): 1651-1658.

Braga MCV, Konno K, Portaro F, Carlos de Freitas J, Yamane T, Olivera B, Pimenta D. 2005. Mass spectrometric and high performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusk *Conus regius*: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. *Toxicon*, 45 (1): 113–122.

Braga MCV, Nery AAA, Ulrich H, Konno K, Sciani JMM, Pimenta DCC. 2013. α -RglB: A novel antagonist peptide of neuronal acetylcholine receptor isolated from *Conus regius* venom. *International Journal of Peptides*, 2013.

Brusca R, Brusca G. 2003. *Invertebrates* (2th Ed.) E U A: McGraw-Hill Interamericana.

Buczek O, Bulaj G, Olivera BM. 2005a. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 62 (24): 3067-3079.

Buczek O, Yoshikami D, Watkins M, Bulaj G, Jimenez EC, Olivera BM. 2005b. Characterization of D-amino-acid-containing excitatory conotoxins and redefinition of the I-conotoxin superfamily. *FEBS Journal*, 272 (16): 4178-4188.

Buczek O, Yoshikami D, Bulaj G, Jimenez EC, Olivera BM. 2005c. Post-traslational amino acid isomerization: a functionally important D-amino acid in an excitatory peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (6): 4247-4253.

Buczek O, Wei D, Babon JJ, Yang X, Fiedler B, Chen P, Norton RS. 2007. Structure and sodium channel activity of an excitatory I1-superfamily conotoxin. *Biochemistry*, 46 (35): 9929-99340.

Buczek O, Jimenez EC, Yoshikami D, Imperial JS, Watkins M, Morrison A, Olivera BM. 2008. I (1)-superfamily conotoxins and prediction of single D-amino acid occurrence. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 51 (2): 218–29.

Carstens BB, Clark RJ, Daly NL, Harvey PJ, Kaas Q, Craik DJ. 2011. Engineering of conotoxins for the treatment of pain. *Current Pharmaceutical Design*, 17 (38): 4242-4253.

Craig AG, Zafaralla G, Cruz LJ, Santos AD, Hillyard DR, Dykert J, Rivier JE, Gray WR, Imperial J, De la Cruz RG, Sporning A, Terlau H, West PJ, Yoshikami D, Olivera BM. 1998. An O-Glycosylated neuroexcitatory *Conus* peptide. *Biochemistry*, 37 (46): 16019-16025.

Craig AG, Bandyopadhyay P, Olivera BM. 1999. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 264 (2): 271-275.

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM. 1978. Purification and properties of a myotoxin from *Conus geographus* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 90 (2): 539-548.

Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D, Moczydlowski E. 1985. *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 260 (16): 9280-9288.

Daly NL, Craik DJ. 2009. Structural studies of Conotoxins. *IUBMB Life*, 61 (2): 144-150.

Dance SP, Cosel V. 1977. Das grosse Buch der Meeresmuscheln: Schnecken und Muscheln der Weltmeere In VEUlmer (Ed.) Schenecken und Muscheln der Weltmeere Stuttgart Germany: Verlag EUlmer.

Davis J, Jones A, Lewis RJ. 2009. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. *Peptides*, 30 (7): 1222-1227.

Duda TF, Kohn AJ. 2005. Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34 (2): 257-272.

Duda TF, Bolin MB, Meyer CP, Kohn AJ. 2008. Hidden diversity in a hyperdiverse gastropod genus: discovery of previously unidentified members of a *Conus* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49 (3): 867-876.

Dutertre S, Daniel C, Daly NL, Andersson MM, Craik DJ, Lewis RJ. 2008. Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (11): 7100-7108.

Dutertre S, Biass D, Stöcklin R, Favreau P. 2010. Dramatic intraspecimen variations within the injected venom of conus consors: An unsuspected contribution to venom diversity. *Toxicon*, 55 (8): 1453-1462.

Eisenberg L. 2013. Lapidarium Notes Evolution chart by Leonard Eisenberg.

Endean R, Gyr P, Parish G. 1974. Pharmacology of the venom of the gastropod *Conus magus*. *Toxicon*, 12 (2): 117-129.

England LJ, Imperial J, Jacobsen R, Craig AG, Gulyas J, Akhtar M, Rivier J, Julius D, Olivera BM. 1998. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from Marine Snails. *Science*, 281 (5376): 575-578.

Espiritu DJ, Watkins M, Dia-Monje V, Cartier GE, Cruz LJ, Olivera BM. 2001. Venomous cone snails: molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39 (12): 1899-1916.

Essack M, Bajic VB, Archer JC. 2012. Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine Drugs*, 10 (6): 1244-1265.

Fainzilber M, Gordon D, Hasson A, Spira ME, Zlotkin E. 1991. Mollusc-specific toxins from the venom of conus textile neovicarius. *European journal of biochemistry / FEBS*, 202 (2):589-595.

- Fainzilber M, Nakamura T, Lodder JC, Zlotkin E, Kits KS, Burlingame AL. 1998. Gamma-Conotoxin-PnVIIA, a gamma-carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. *Biochemistry*, 37 (6):1470-1477.
- Fan CX, Chen XK, Zhang C, Wang LX, Duan KL, He LL, Cao Y, Liu SY, Zhong MN, Ulens C, Tytgat J, Chen JS, Chi CW, Zhou Z. 2003. A novel conotoxin from *Conus betulinus*, κ -BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (15): 12624-12633.
- Fedosov AE, Moshkovskii SA, Kuznetsova KG, Olivera BM. 2012. Conotoxins: From the biodiversity of gastropods to new drugs. *Biochemistry Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 6 (2): 107–122.
- Felder DL, Camp DK. 2009. Gulf of Mexico origin waters and biota (TAMU Press Ed.) Estados Unidos de América: Texas AM. University Press.
- Feldman DH, Olivera BM, Yoshikami D. 1987. Omega *Conus geographus* toxin: a peptide that blocks calcium channels. *FEBS Letters*, 214 (2): 295-300.
- Flores-Martínez E. 2011. Identificación mediante RT-PCR de toxinas del caracol marino *Conus nux*. Tesis profesional de maestría. Instituto de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México. 63 pp.
- Franco A, Kompella SN, Akondi KB, Melaun C, Daly NL, Luetje CW, Alewood PF, Craik DJ, Adams DJ, Marí F. 2012. RegIIA: An α 4/7-conotoxin from the venom of *Conus regius* that potently blocks α 3 β 4 nAChRs. *Biochemical Pharmacology*, 83 (3): 419-426.
- Franklin JB, Fernando SA, Chalke BA, Krishnan KS. 2007. Radular morphology of *Conus* (*Gastropoda: Caenogastropoda: Conidae*) from India. *Molluscan Research*, 27 (3): 111-122
- Giribet G, Okusu A, Lindgren AR, Huff SW, Schrödl M, Nishiguchi MK. 2006. Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: monoplacophorans are related to chitons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (20): 7723-7728.
- Gowd KH, Han S, Twede V, Gajewiak J, Smith MD, Watkins M, Olivera BM. 2012. Conantokins Derived from the *Asprella* Clade Impart con RI -B an N – Methyl d-aspartate receptor antagonist with a unique selectivity profile for NR2B subunits. *Biochemistry*, 51 (23): 4685-4692.
- Gray WR, Luque A, Olivera BM, Barrett J, Cruz LJ. 1981. Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (10): 4734-4740.
- Heinemann SH, Leipold E. 2007. Conotoxins of the o-superfamily affecting voltage-gated sodium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (11): 1329-1340.

Heller J. 1990. Longevity in Molluscs. *Malacología*, 31 (2): 259-295.

Inserra MC, Kompella SN, Vetter I, Brust A, Daly NL, Cuny H, Lewis RJ. 2013. Isolation and characterization of α -conotoxin LsIA with potent activity at nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 86 (6): 791-799.

Jackson DJ, Wörheide G, Degnan BM. 2007. Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evolutionary Biology*, 7 (1): 160-177.

Janzsó G, Rákhely G, Leitgeb B. 2009. Comprehensive structural characterization of the cyclic disulphide-bridged nonapeptides Arg- and Lys-conopressins. *Journal of Molecular Graphics Modelling*, 27 (8): 881-888.

Jayamanne A, Jeong HJ, Schroeder CI, Lewis RJ, Christie MJ, Vaughan CW. 2013. Spinal actions of ω -conotoxins, CVID, MVIIA and related peptides in a rat neuropathic pain model. *British Journal of Pharmacology*, 170 (2): 245-254.

Jimenez EC, Olivera BM, Gray WR, Cruz LJ. 1996. Contryphan is a D-Tryptophan-containing conus peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (45): 28002-28005.

Jones RM, Bulaj G. 2000. Conotoxins: new vistas for peptide therapeutics. *Current Pharmaceutical Design*, 6 (12): 1249-1285.

Kaas Q, Westermann JC, Halai R, Wang C, Craik D. 2008. ConoServer a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics (Oxford England)*, 24 (3): 445-446.

Kaas Q, Westermann JC, Craik DJ. 2010. Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 55 (8): 1491-1509.

Kaas Q, Yu R, Jin AH, Dutertre S, Craik DJ. 2012. ConoServer: updated content knowledge and discovery tools in the conopeptide Database. *Nucleic Acids Research*, 40: 325-330.

Kantor Y. 2007. How much can conus swallow? Observations on molluscivorous species. *Journal of Molluscan Studies*, 73 (2): 123-127.

Katsuno S, Sasaki T. 2008. Comparative histology of radula-supporting structures in Gastropoda. *Malacologia*, 50 (1): 13-56.

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

Kaufenstein S, Porth C, Kendel Y, Wunder C, Nicke A, Kordis D, Favreau P, Koua D, Stöcklin R, Mebs D. 2011. Venomic study on *Cone snails* (*conus spp.*) from South Africa. *Toxicon*, 57 (1): 28-34.

Keen AM. 1971. Sea shells of tropical west America (2th Ed.) California: Stanford Univ.

Kern SE, Allen J, Wagstaff J, Shafer SL, Yaksh T. 2007. The pharmacokinetics of the conopeptide contulakin-G (CGX-1160) after intrathecal administration: an analysis of data from studies in beagles. *Anesthesia and Analgesia*, 104 (6): 1514-1520.

Kerr LM, Yoshikami D. 1984. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature*, 308 (5956): 282-284.

Kohn AJ. 1983. The Mollusca: Physiology. In *The Mollusca*. United States of America: Academic Press INC.

Kohn AJ. 1990. Tempo and mode of evolution in *Conidae*. *Malacologia*, 32: 55-67.

Kohn AJ, Perron FE. 1994. Life history and biogeography: patterns in *Conus*. In *Oxford Biogeography Series* (pp1-106) Clarendon Press.

Laht S, Koua D, Kaplinski L, Lisacek F, Stöcklin R, Remm M. 2012. Identification and classification of conopeptides using profile Hidden Markov Models. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824 (3): 488-492.

Langer SZ, Shepperson NB. 1982. Postjunctional alpha 1-adrenoceptors: preferential innervation of alpha 1-adrenoceptors and the role of neuronal uptake. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 4 (Suppl 1): S8-13.

Lewis RJ, Garcia ML. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (10): 790-802.

Lewis RJ. 2012. Discovery and development of the χ -conopeptide class of analgesic peptides. *Toxicon*, 59 (4): 524-528.

Lluisma AO, López-Vera E, Bulaj G, Watkins M, Olivera BM. 2008. Characterization of a novel psi-conotoxin from *Conus parius* Reeve. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 51 (2): 174-180.

López J. 2001. Conotoxinas. *Spira*, 1 (1): 7-11.

Loughnan M, Bond T, Atkins A, Cuevas J, Adams DJ, Broxton NM, Livett BG, Down JG, Jones A, Alewood PF, Lewis RJ. 1998. Alpha - conotoxin Epl a novel sulfated peptide from *Conus*

episcopatus that selectively targets neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (25): 15667-15674.

Maillo M, Aguilar MB, López-Vera E, Craig AG, Bulaj G, Olivera BM, Heimer de la Cotera EP. 2002. Conorfamide a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 40 (4): 401-407.

Marshall AJ. 1980. *Zoología de Invertebrados* (4th Ed.) Barcelona España. Pp. 683-685 Reverté.

McIntosh JM, Hasson A, Spira ME, Gray WR, Li W, Marsh M, Hillyard DR, Olivera BM. 1995. A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (28): 16796-16802.

McIntosh JM, Jones RM. 2001. Cone venom—from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon*, 39 (10): 1447-1451.

Moczydlowski E, Olivera BM, Gray WR, Strichartz GR. 1986. Discrimination of muscle and neuronal Na-channel subtypes by binding competition between [3H] saxitoxin and mu-conotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (14): 5321-5325.

Nielsen DB, Dykert J, Rivier JE, McIntosh JM. 1994. Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail, *Conus imperialis*. *Toxicon*, 32 (7): 845-848.

Norton RS, Pallaghy PK. 1998. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*, 36: 1573–1583.

Norton RS, Olivera BM. 2006. Conotoxins down under. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 48 (7): 780-798.

Nybakken JW. 1990. CORE - Ontogenetic change in the *Conus radula* its form distribution among the radula types and significance in systematics and ecology (Iof Malacology Ed.) Institute of Malacology. Ann Arbor.

Olivera BM, McIntosh JM, Cruz LJ, Luque FA, Gray WR. 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry*, 23 (22): 5087-5090.

Olivera BM, Cruz LJ. 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*, 39 (1): 7-14.

Paredes C, Cardoso F, Altamirano K, Baltazar P, Romero L. 2010. La familia Conidae en el mar peruano. The family Conidae from Peruvian Sea. *Revista Peruana de Biología*, 17 (1): 65-73.

Peng C, Wu X, Han Y, Yuan D, Chi C, Wang C. 2007. Identification of six novel T-1 conotoxins from *Conus pulicarius* by molecular cloning. *Peptides*, 28 (11): 2116-2124.

Pereañez JA, Vargas LJ. 2009. Neurotoxins from invertebrates as alternative therapeutic agents and tools in basic research. *Vitae: Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16 (1): 155-163.

Petrel C, Hocking HG, Reynaud M, Upert G, Favreau P, Biass D, Servent D. 2013. Identification structural and pharmacological characterization of t-CnVA a conopeptide that selectively interacts with somatostatin sst3 receptor. *Biochemical Pharmacology*, 85 (11): 1663-1671.

Platt RJ, Han TS, Green BR, Smith MD, Skalicky J, Gruszczynski P, Gajewiak J. 2012. Stapling mimics noncovalent interactions of gamma-carboxyglutamates in conantokins peptidic antagonists of N-methyl-D-aspartic acid receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (24): 20727-20736.

Ponder WF, Lindberg DR. 2008. *Phylogeny and evolution of the Molluska* (p. 469) Berkeley University California Press.

Puillandre N, Watkins M, Olivera BM. 2010. Evolution of *Conus* peptide genes: duplication and positive selection in the A-superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 70 (2): 190-202.

Raybaudi G, Eliseo T, Grolleau F, Lapied B, Barbier J, Bournaud R, Polticelli F. 2003. Contryphan-Vn: a modulator of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303 (1): 238-246.

Rigby AC, Lucas-Meunier E, Kalume DE, Czerwiec E, Hambe B, Dahlqvist I, Stenflo J. 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (10): 5758-5763.

Ruppert EE, Barnes RD. 1995. *Zoología de Invertebrados* (6th Ed.) México D F. McGraw-Hill International.

Sanford M. 2013. Intrathecal ziconotide: A review of its use in patients with chronic pain refractory to other systemic or intrathecal analgesics. *CNS drugs*, 27 (11): 989-1002.

Sharpe IA, Gehrmann J, Loughnan ML, Thomas L, Adams DA, Atkins A, Lewis RJ. 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the alpha1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neuroscience*, 4 (9): 902-907.

Sharpe IA, Thomas L, Loughnan M, Motin L, Palant E, Croker DE, Alewood D, Chen S, Graham RM, Alewood PF, Adams DJ, Lewis RJ. 2003. Allosteric alpha 1-adrenoreceptor antagonism by the conopeptide rho-TIA. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (36): 34451-34457.

- Sheng Z, Dai Q, Prorok M, Castellino FJ. 2007. Subtype-selective antagonism of N-methyl-D-aspartate receptor ion channels by synthetic conantokin peptides. *Neuropharmacology*, 53 (1): 145-156.
- Shon KJ, Stocker M, Terlau H, Stühmer W, Jacobsen R, Walker C, Grilley M, Watkins M, Hillyard DR, Gray WR, et al. 1998b. Kappa-conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker k⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 33-38.
- Simone LRL. 2011. Phylogeny of the *Caenogastropoda* (*Mollusca*) based on comparative morphology. *Arquivos de Zoologia*, 42 (4): 161-323.
- Terlau H, Shon KJ, Grilley M, Stocker M, Stuhmer W, Olivera BM. 1996. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*, 381 (6578): 148-151.
- Terlau H, Olivera BM. 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84 (1): 41-68.
- Véliz D, Winkler FM, Guisado C. 2003. Developmental and genetic evidence for the existence of three morphologically cryptic species of *Crepidula* in Northern Chile. *Marine Biology*, 143 (1): 131-142.
- Volpon L, Lamthanh H, Barbier J, Gilles N, Molgó J, Ménez A, Lancelin JM. 2004. NMR solution structures of delta-conotoxin EVIA from *Conus ermineus* that selectively acts on vertebrate neuronal Na⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (20): 21356–21366.
- Walker CS, Steel D, Jacobsen RB, Lirazan MB, Cruz LJ, Hooper D, Shetty R, DelaCruz RC, Nielsen JS, Zhou LM, Bandyopadhyay P, Craig AG, Olivera BM. 1999. The T-superfamily of Conotoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (43): 30664-30671.
- Whyte JM, Ender R. 1962. Pharmacological investigation of the venoms of the marine snails *Conus textile* and *Conus geographus*. *Toxicon*, 1 (1): 25-31.
- Yan S, Wu G. 2012. Detailed folding structures of kappa-conotoxin RIIIJ and its mutageneses obtained from 2-dimensional HP model. *Protein and Peptide Letters*, 19 (5): 567-572.
- Zhang ZQ. 2011. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148: 1-237.
- Zugasti-Cruz A, Maillo M, López-Vera E, Falcón A, Heimer de la Cotera EP, Olivera BM, Aguilar MB. 2006. Amino acid sequence and biological activity of a gamma-conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*. *Peptides*, 27 (3): 506-511.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

Agrouniversidad, 2014. http://agrouniversidad.blogspot.mx/2011_10_01_archive.html

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine, 2014. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ConeShell, 2014. *Giancarlo Paganelli Collection*. <http://www.coneshell.net/>

ConoServer, 2014. <http://www.conoserver.org/>

Ion Source, 2014. <http://www.ionsource.com/>

16. ANEXO 1.

Conopéptidos desarrollados para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Nombre	Conopéptido	Especie de Conus	Blanco	Fase Clínica	Compañía	Referencia
ACV1	α -conotoxina Vc1.1	<i>Conus victoriae</i>	Bloqueador competitivo de receptores de ACh nicotínicos tipo-neuronal	Preclínica	Metabolic Pharmaceuticals Ltd, Melbourne, Vic, Australia	Carstens <i>et al.</i> (2011)
	ρ -conotoxina TIA	<i>C. tulipa</i>	Inhibidor reversible no competitivo de receptores adrenérgicos tipo 1	Preclínica	Xenome, Ltd., Brisbane, Qld., Australia	Sharpe <i>et al.</i> (2003)
AM336	ω -conotoxina CVID	<i>C. catus</i>	Bloqueador de canales de calcio tipo-N (Ca(v)2.2)	Fase II	AMRAD Corp. Bajo la licencia de la Universidad de Queensland	Jayama <i>et al.</i> (2013)
SNX-III, C1002, Ziconotide, Prialt	ω -conotoxina MVIIA	<i>C. magus</i>	Canales de calcio tipo-N	Fase III	Elan Corp, (Elan Pharmaceuticals), CA, USA	Sanford (2013)
Xen2174	χ -conopéptido (χ -CTXMriA/B)	<i>C. marmoreus</i>	Inhibidor reversible no competitivo del transportador neuronal de noradrenalina	Fase I	Xenome, Ltd., Brisbane, Qld., Australia	Lewis (2012)
CGX-1160	Contulakina-G	<i>C. geographus</i>	Se une a receptor de neurotensina	Fase II	Cognetix Inc., Salt Lake City, USA	Kern <i>et al.</i> (2007)
CGX-1007	Conantokina-G	<i>C. geographus</i>	Inhibidor selectivo del receptor NMDA	Fase II	Cognetix Inc., Salt Lake City, USA	Alex <i>et al.</i> (2011)
CGX-?	Conantokina-T	<i>C. tulipa</i>	Inhibidor selectivo del receptor NMDA	Fase II	Cognetix Inc., Salt Lake City, USA	Sheng <i>et al.</i> (2007)

17. ANEXO 2.

Clasificación de familias de conotoxinas referente al blanco molecular.

Familia	Definición	Toxina(s) representativa(s)	Referencias
α (alfa) Conotoxina	Receptores Nicotínicos de Acetilcolina (rACh-N)	GI	Gray <i>et al.</i> (1981)
γ (gamma) Conotoxina	Corrientes neuronales de cationes (hacia el interior)	PnVIA, TxVIA	Fainzilber <i>et al.</i> (1998)
δ (delta) Conotoxina	Canales de Na ⁺ Voltaje-Dependientes (Agonistas, retraso de inactivación)	TxVIA	Fainzilber <i>et al.</i> (1991)
ϵ (epsilon) Conotoxina	Canales presinápticos de Ca ²⁺ o receptores presinápticos acoplados a proteínas G	TxVA	Rigby <i>et al.</i> (1999)
ι (iota) Conotoxina	Canales de Na ⁺ Voltaje-dependientes (Agonistas, sin retraso de inactivación)	RXIA	Buczek <i>et al.</i> (2007)
κ (kappa) Conotoxina	Canales de K ⁺ Voltaje-dependientes (bloqueador)	PVIA	Terlau <i>et al.</i> (1996)
μ (mu) Conotoxina	Canales de Na ⁺ Voltaje-dependientes (Antagonistas, bloqueador)	GIIIA	Cruz <i>et al.</i> (1985)
ρ (rho) Conotoxina	Adrenoreceptores α -1 (GPCR)	TIA	Sharpe <i>et al.</i> (2001)
σ (sigma) Conotoxina	Canales iónicos activados por serotonina	GVIIIA	England <i>et al.</i> (1998)
τ (tau) Conotoxina	Receptor de somatostatina	CnVA	Petrel <i>et al.</i> (2013)
χ (chi) Conotoxina	Transportador neuronal de noradrenalina	MrIA, CMrVIA	Sharpe <i>et al.</i> (2001)
ω (omega) Conotoxina	Canales de Ca ⁺ Voltaje-dependientes (bloqueador)	GVIA	Kerr y Yoshikami (1984)

18 ANEXO 3.

Programas de RP-HPLC utilizados para el análisis de péptidos de *C. nux*.

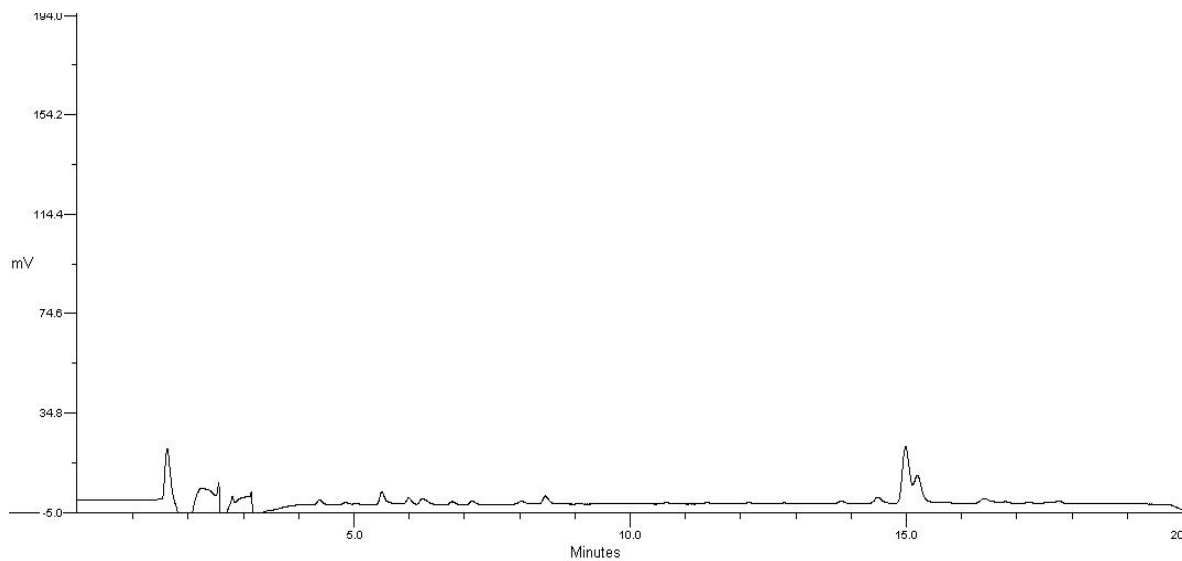
Programa	Columna	Gradiente	Incremento de B	Flujo	Muestra
1	Analítica C18	5% - 95% de solución B en 95 minutos	1.0%/min	1.5 ml/min	Extracto Crudo
2	Analítica C18	30% - 50% de solución B en 70 minutos	0.28%/min	1.5 ml/min	Purificación (T13CN16)
3	Analítica C18	10% - 30% de solución B en 70 minutos	0.28%/min	1.5 ml/min	Primera re-purificación (T6CN11)
4	Analítica C18	30% - 50% de solución B en 70 minutos	0.28%/min	1.5 ml/min	Segunda re-purificación (T4CN19)

Nota: Por el desgaste del equipo el flujo de 1.5 ml/min es equivalente a 1 ml/min.

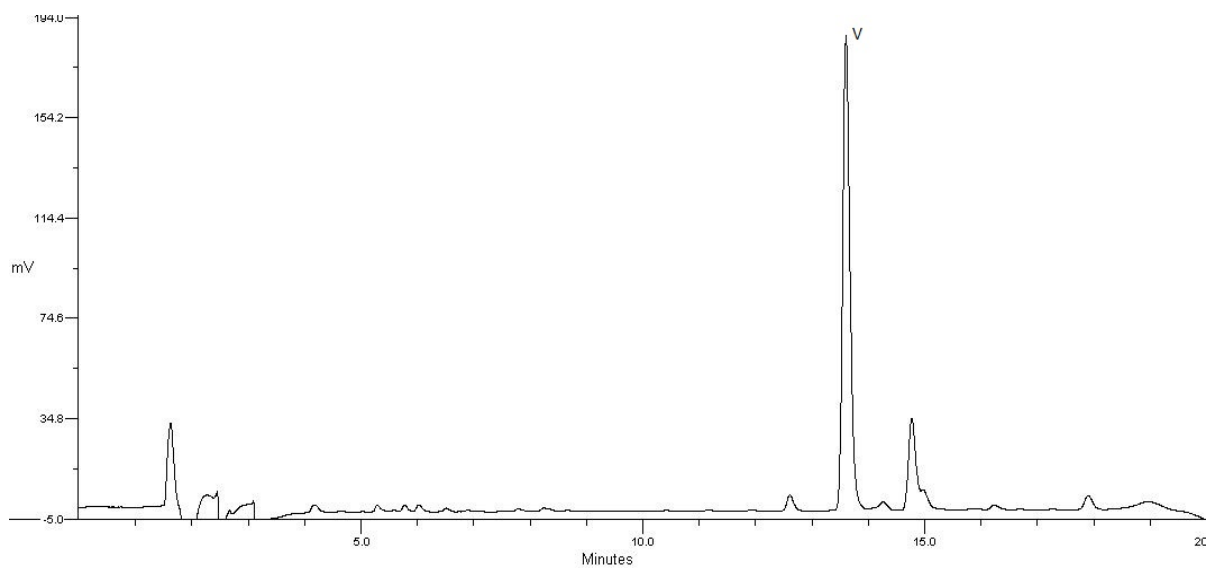
19. ANEXO 4.

Cromatogramas de la secuenciación de la fracción **T4CN19** por el método de degradación de Edman.

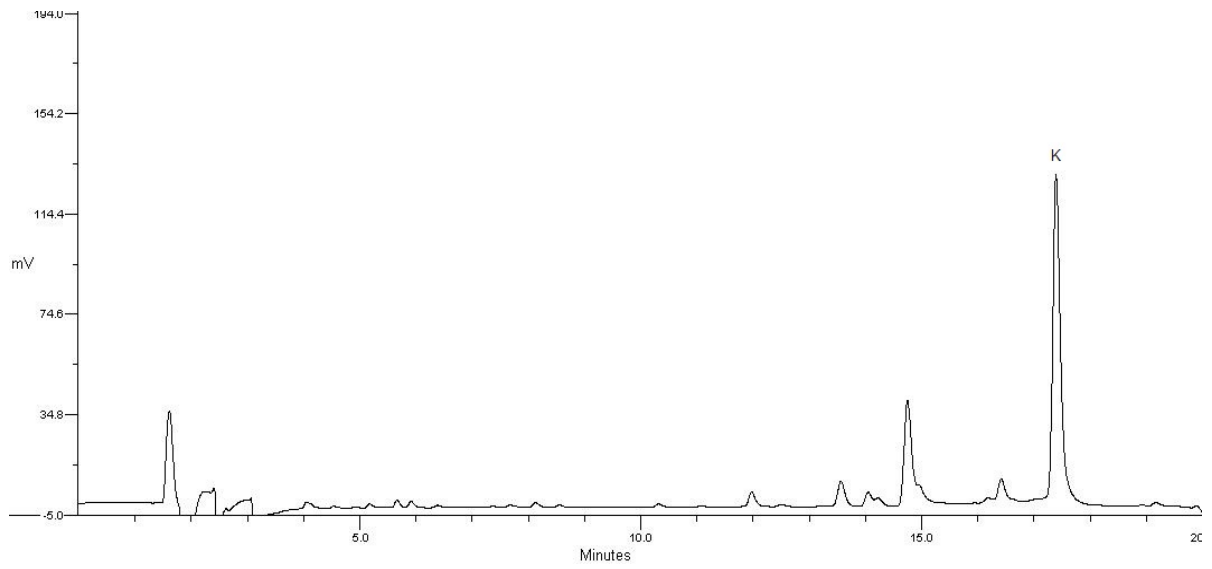
Residuo 1



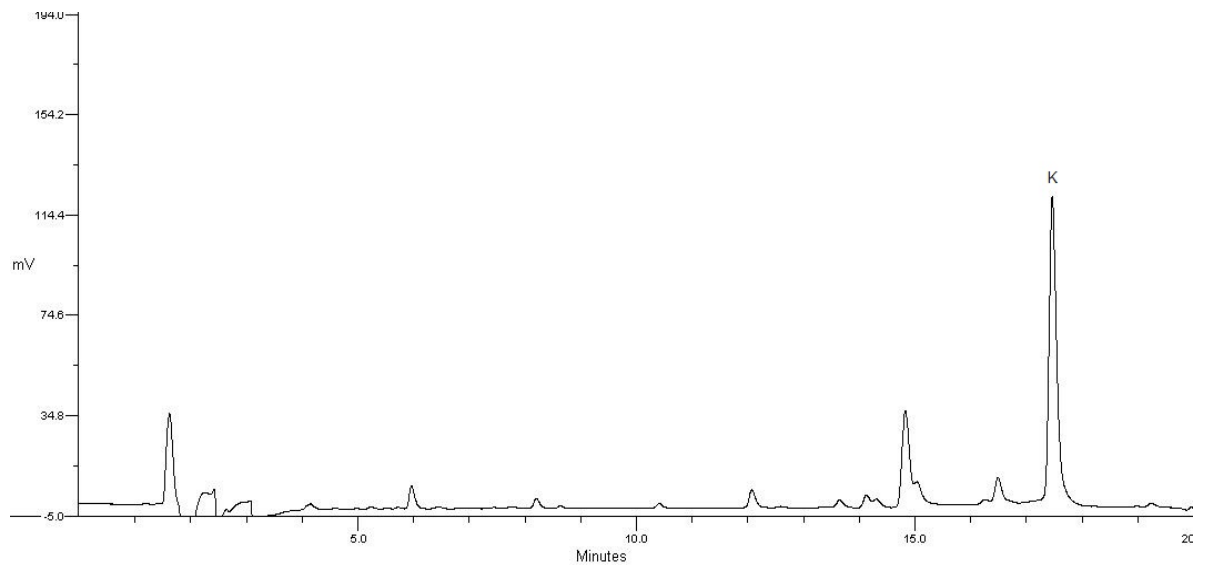
Residuo 2



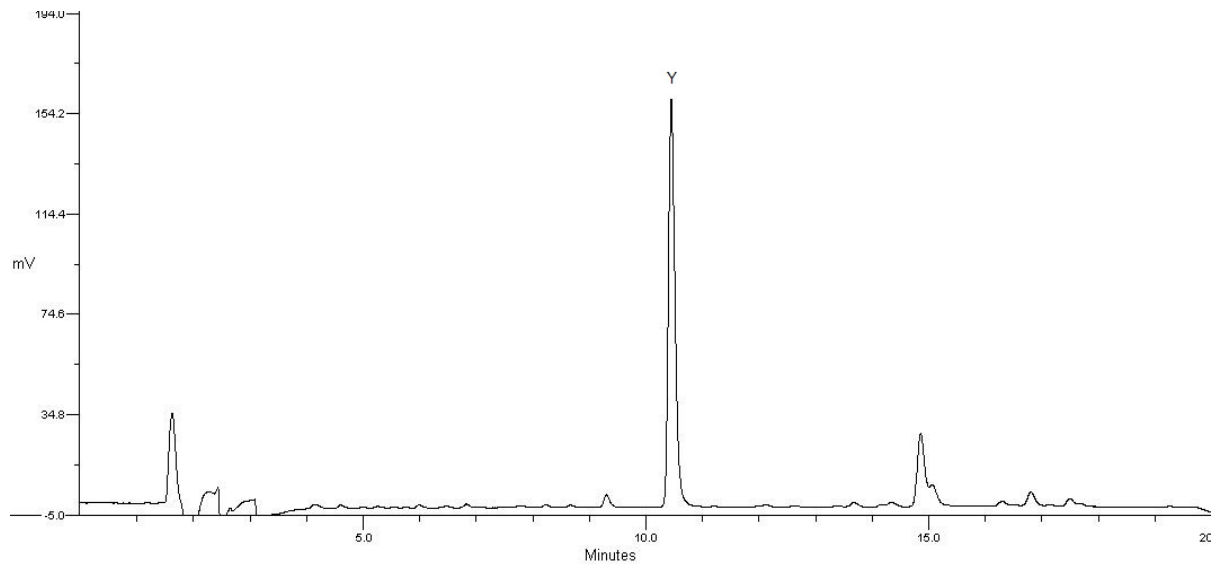
Residuo 3



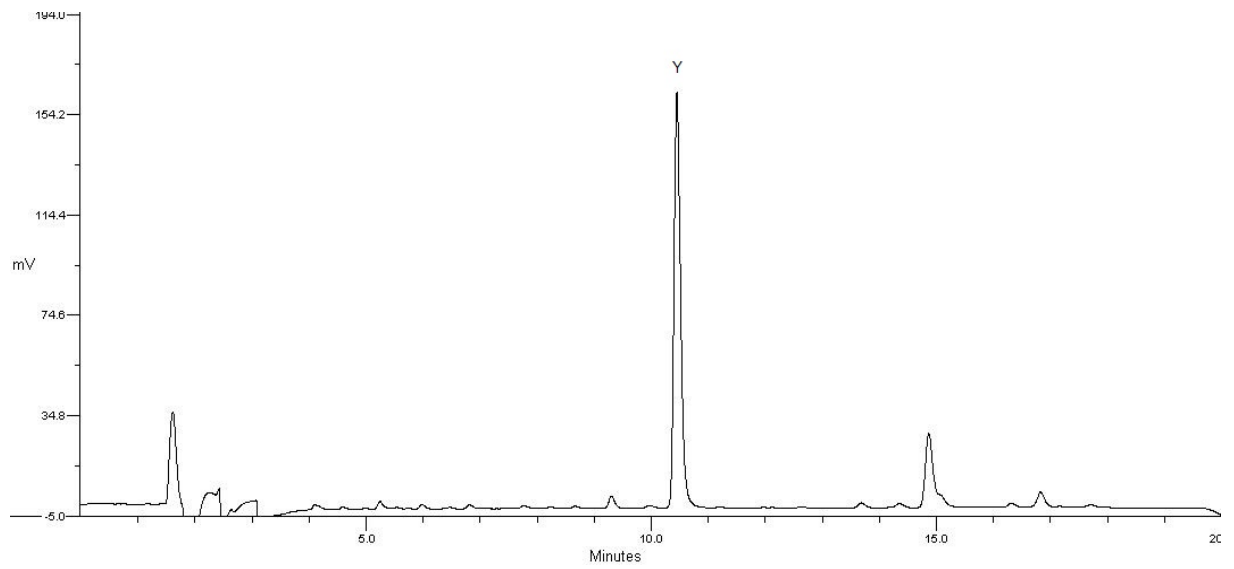
Residuo 4



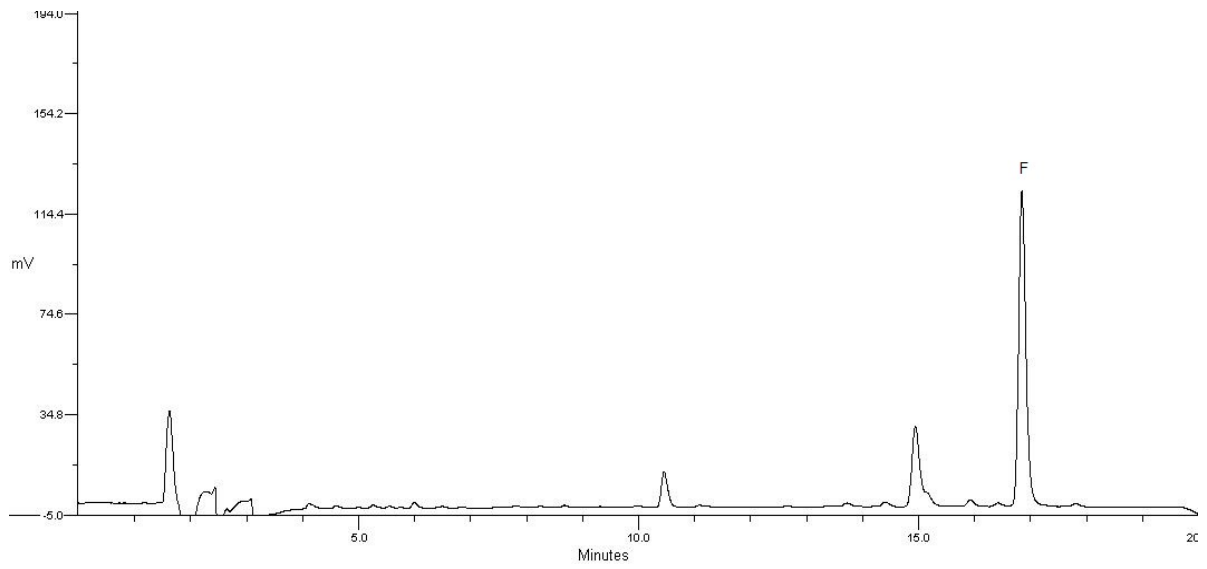
Residuo 5



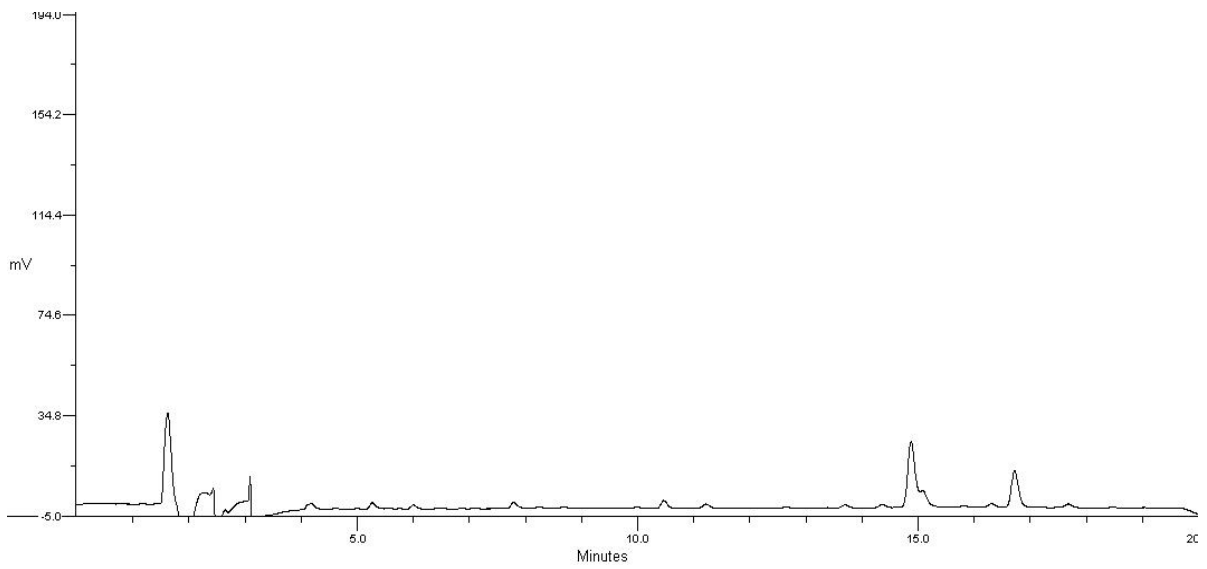
Residuo 6



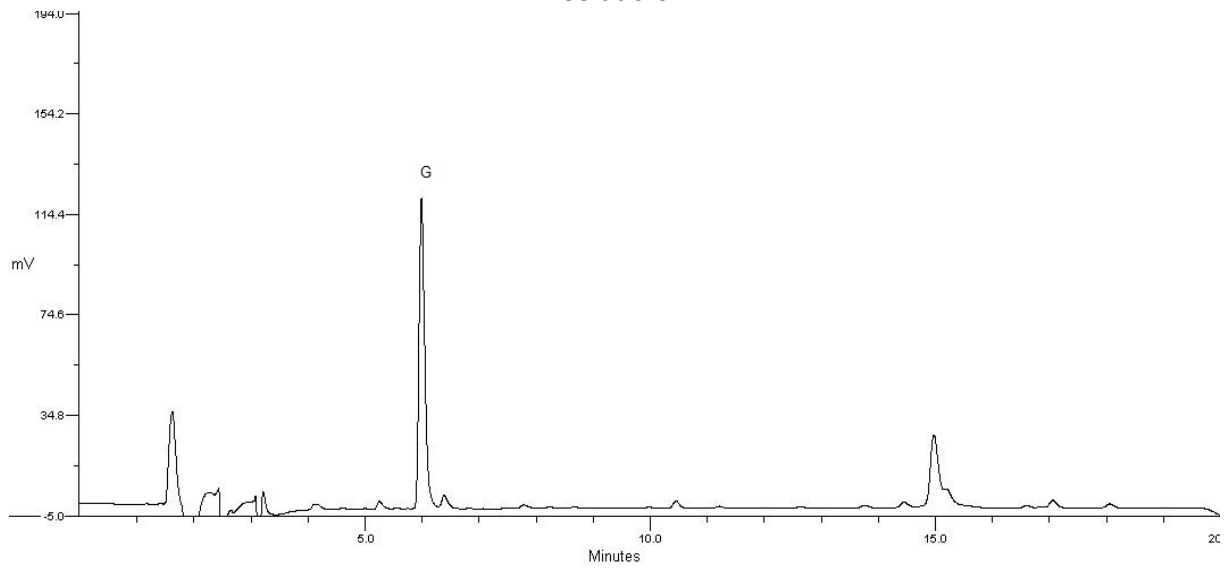
Residuo 7



Residuo 8



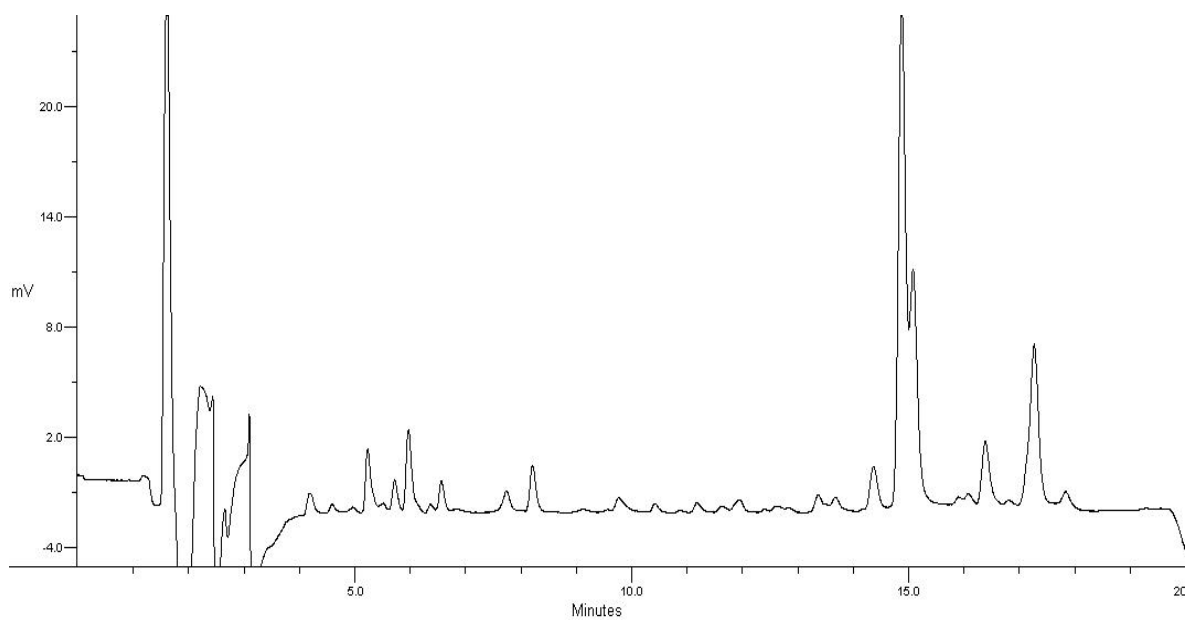
Residuo 9



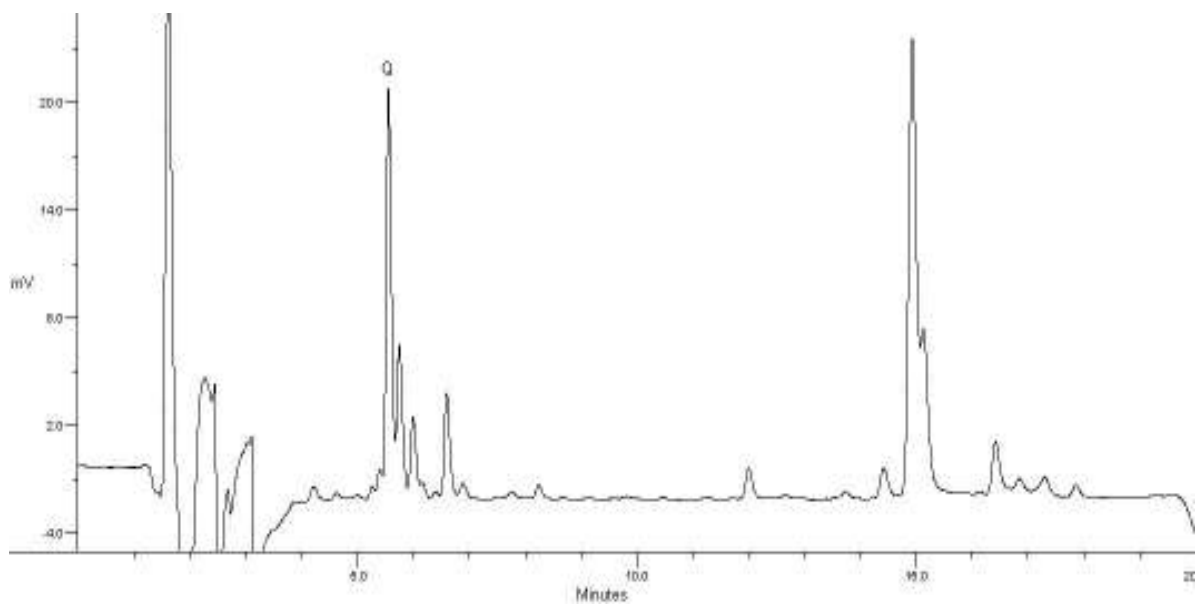
20. ANEXO 5.

Cromatogramas de la secuenciación de la fracción **T6CN11** por el método de degradación de Edman.

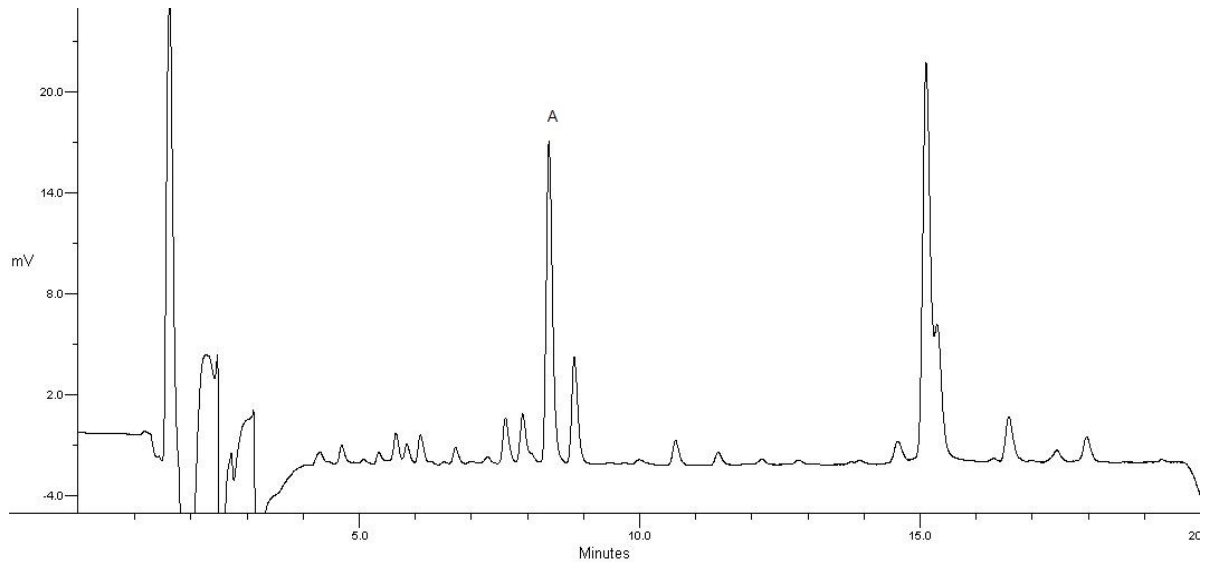
Residuo 1



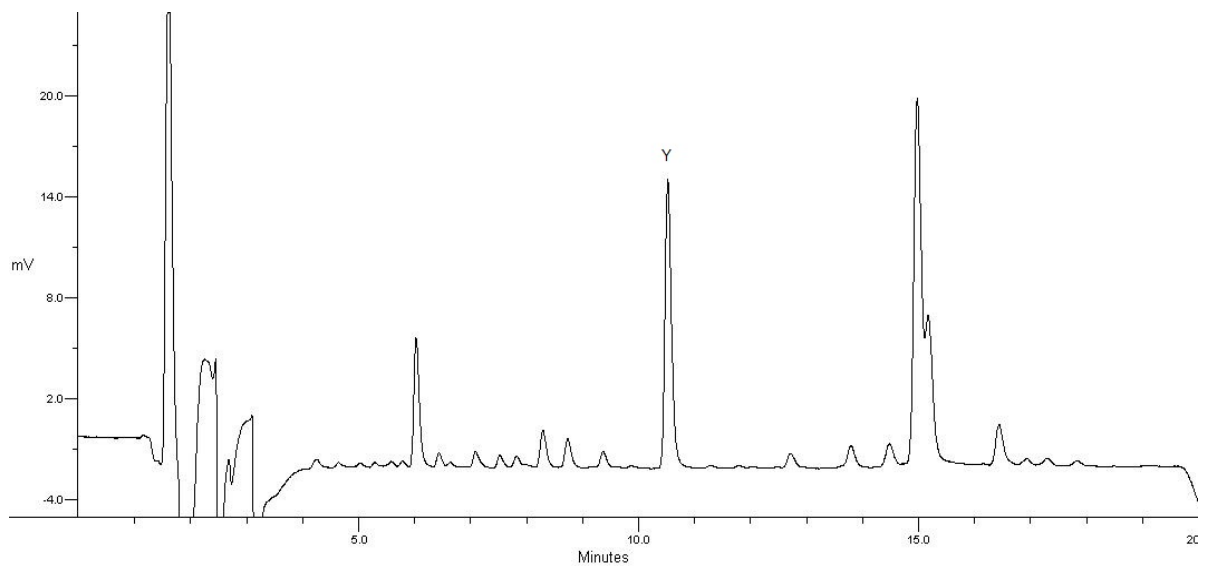
Residuo 2



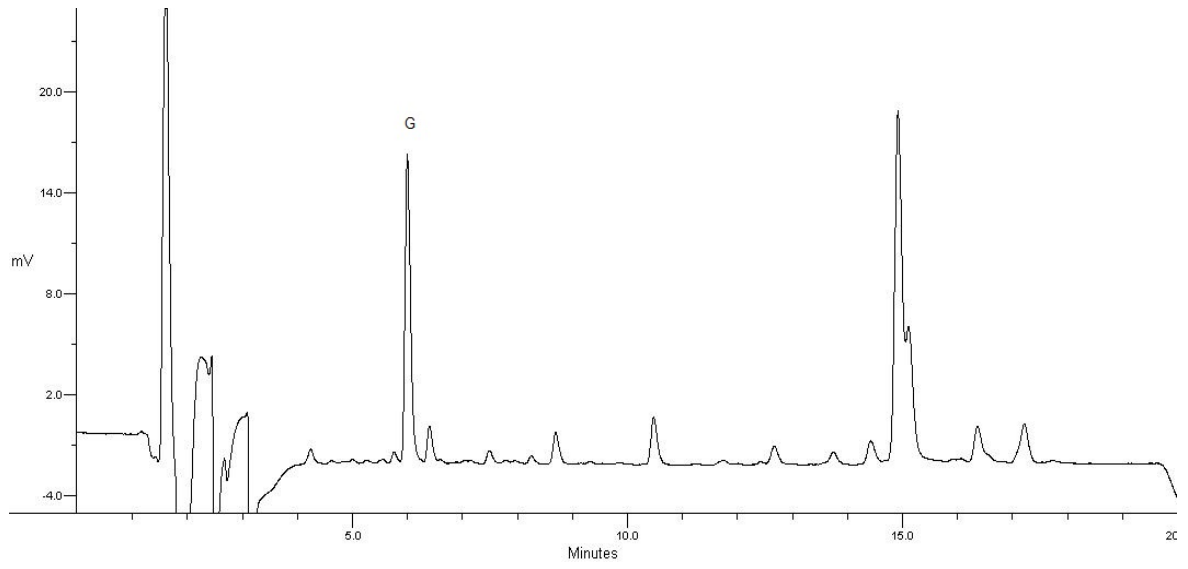
Residuo 3



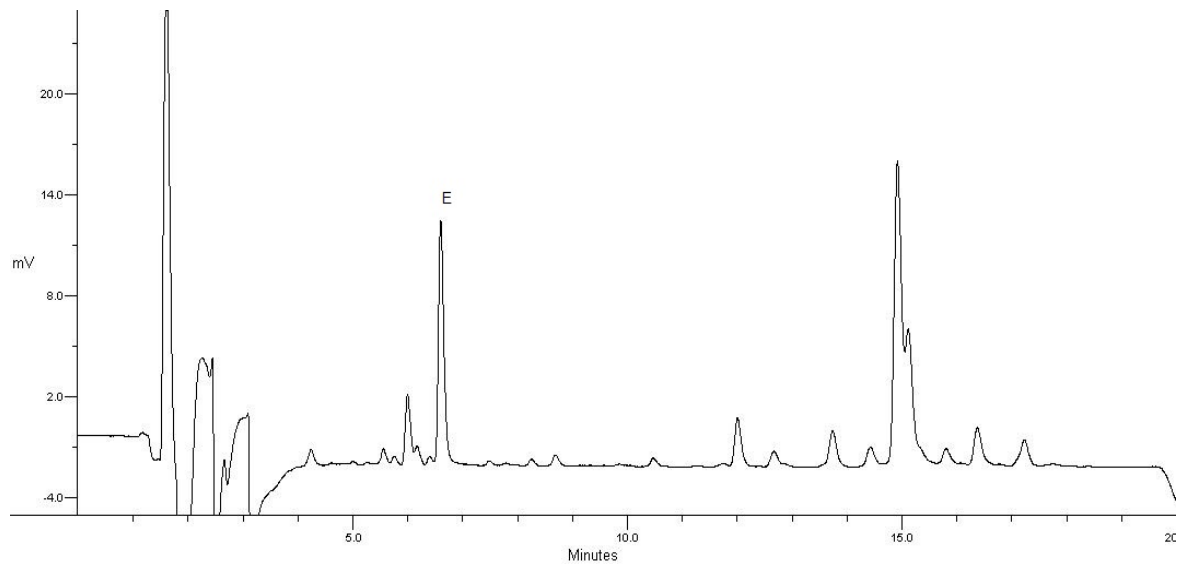
Residuo 4



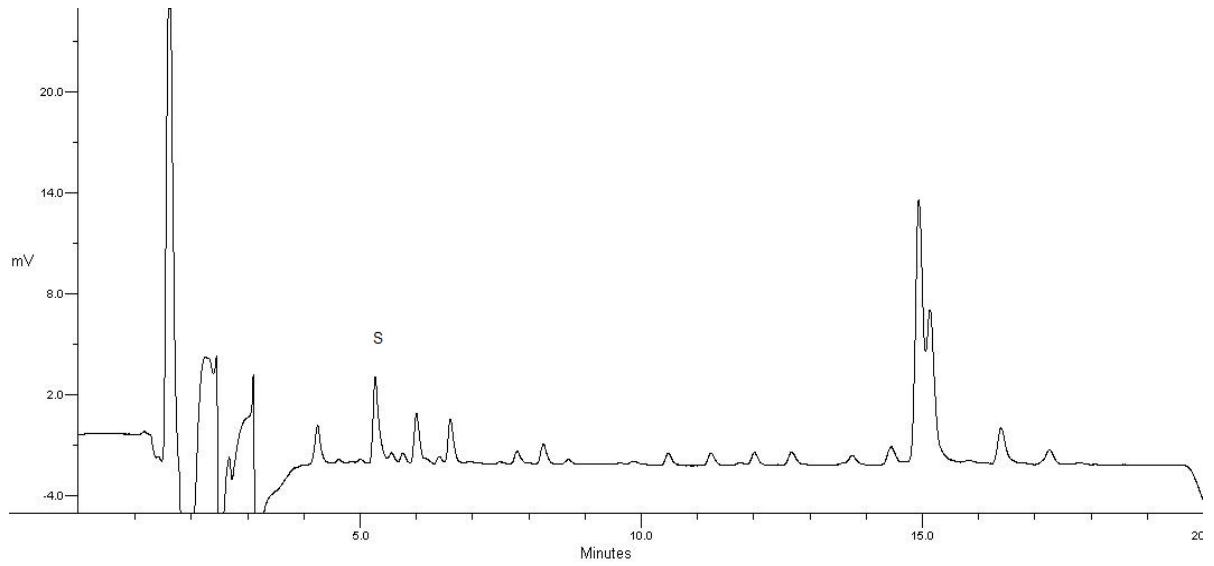
Residuo 5



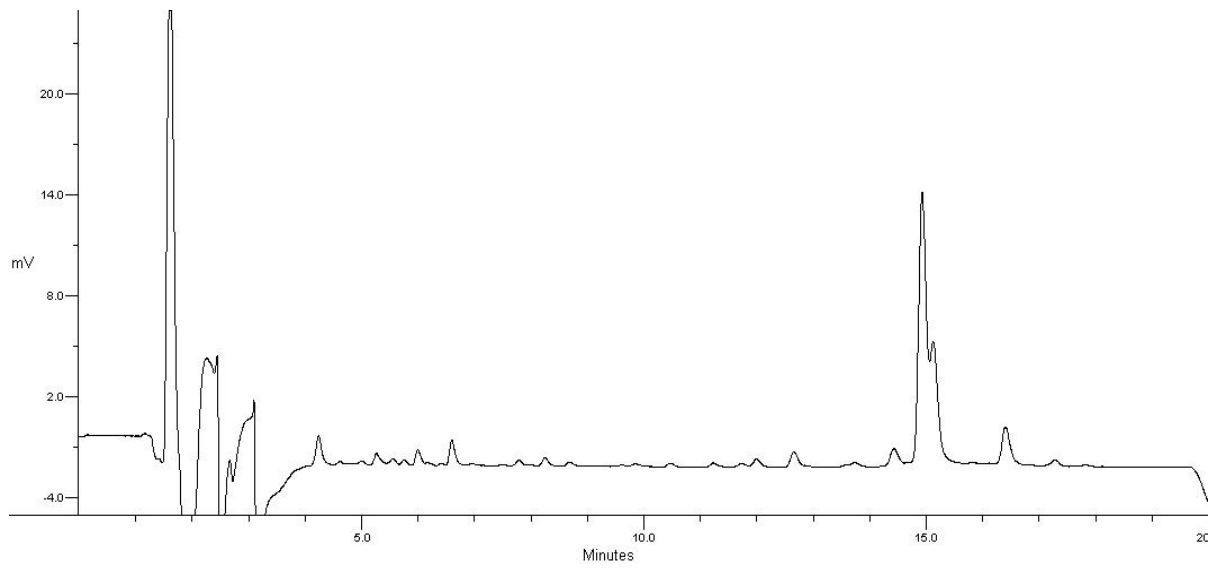
Residuo 6



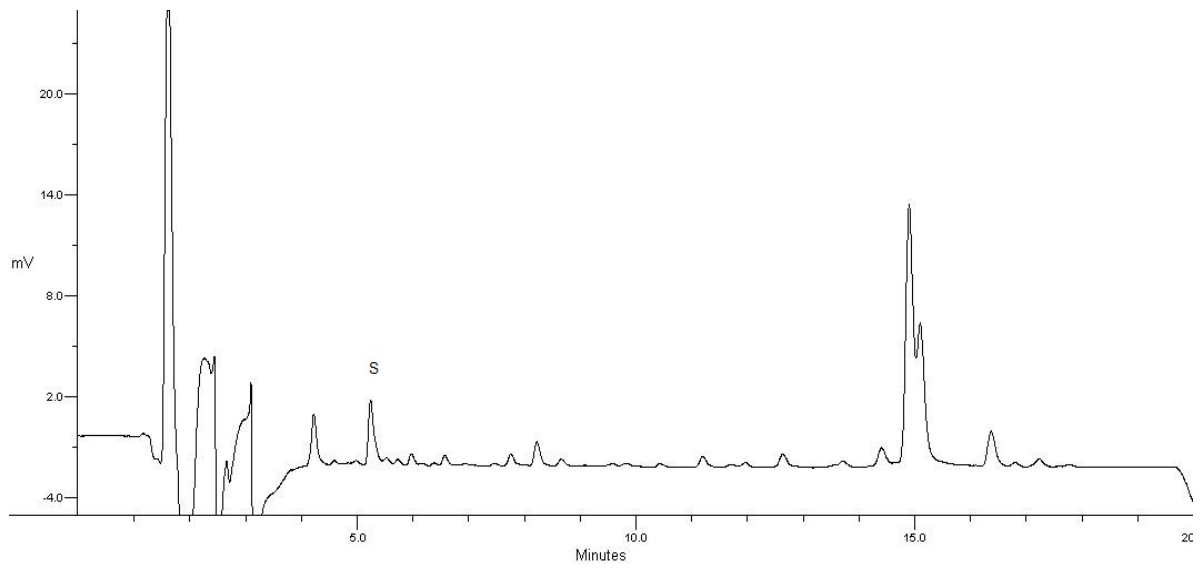
Residuo 7



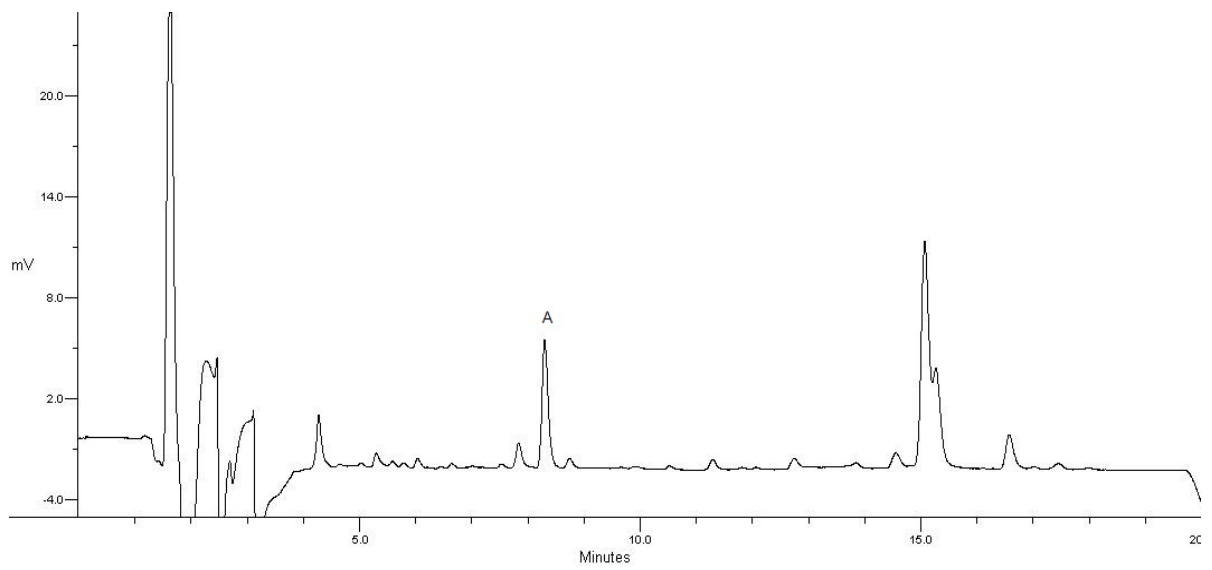
Residuo 8



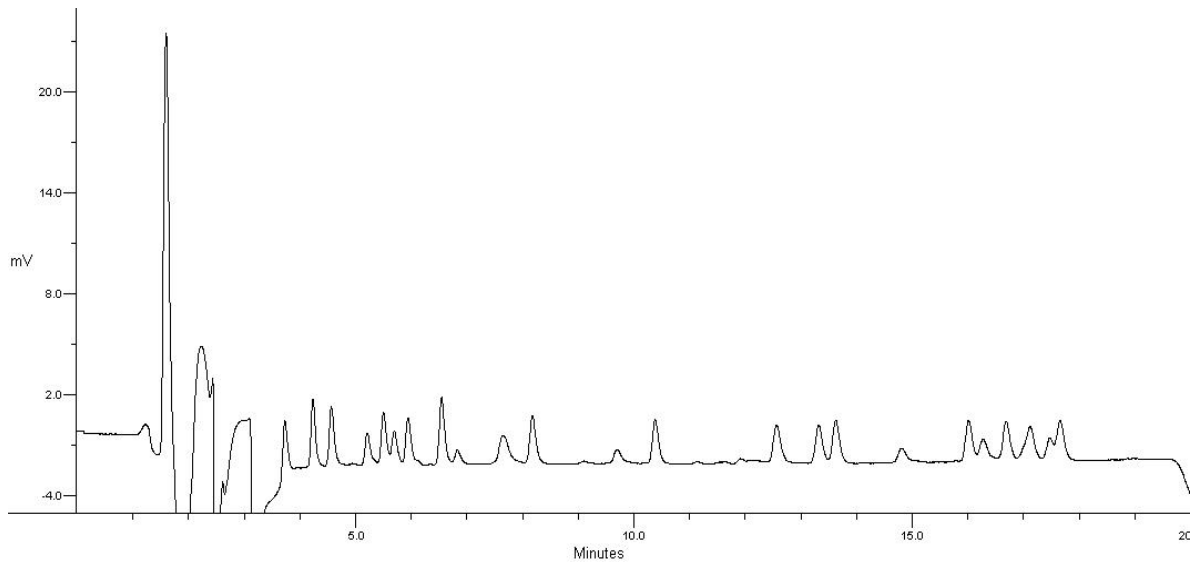
Residuo 9



Residuo 10



Estándar de aminoácidos



21. ANEXO 6

Características de las homologías indexadas en **BLAST** y **ConoServer**.

Co6.7 (P03391)⁴

Proteína silvestre de *C. coronatus*, especie habitante en la región del Indo-Pacífico, cuya dieta es vermívora. Esta conotoxina se ha clasificado en la superfamilia O1 con un arreglo de cisteínas VI/VII.

Secuencia: WIVGV**C**R**L**P**G**D**L**C**A**G**D**A**S****C**C**E**H**S****C**N**I**V**H**T**C**D

Pruebas de secuencia	Nivel: Ácido nucleico
Masa promedio	3271.68
Masa monoisotópica	3269.33
Punto isoeléctrico	4.96
Coefficiente de extinción [280 nm]	5500.00

M11.2 (P02803)⁵

Proteína silvestre de *C. magus*, especie habitante en la región del Indo-Pacífico, cuya dieta es piscívora. La asignación a superfamilia no está respaldada por los datos disponibles, pero el método de extracción de cDNA se basa en la conservación de los 5' y 3' UTR. Dada esta nota, fue clasificada en la superfamilia I1, con un arreglo de cisteínas XI.

Secuencia: T**C**S**N**K**G**Q**Q****C**G**D**D**S**D**C**C**W**H**L****C**C**V**N**N**K**C**A**H**L**I**L**L****C**N**L**

Pruebas de secuencia	Nivel: Ácido nucleico
Masa promedio	3848.37
Masa monoisotópica	3845.54
Punto isoeléctrico	6.81
Coefficiente de extinción [280 nm]	5500.00

⁴ Número de acceso en ConoServer (Protein Card) como referencia al lector.

⁵ Número de acceso en *BLAST* de NCBI como referencia al lector.

Rg11A (P01508)⁴ (P84197.1)⁵

También llamada **RgXIA**. Proteína silvestre de *C. regius*, especie habitante en la región del Pacífico Oriental, cuya dieta es vermívora. Esta conotoxina se encuentra clasificada en la superfamilia I1 con un arreglo de cisteínas XI.

Secuencia: CQAYGESCSAVVRCDDPNAVCCQYPEDAVCVTRGYCRPPATVLT

Pruebas de secuencia	Nivel: Proteína
Masa promedio	4695.30
Masa monoisotópica	4691.95
Punto isoeléctrico	4.98
Coficiente de extinción [280 nm]	4470.00

CI6.2 (P04174)⁴(D6C4K9)⁵

También llamada **CI6b**. Proteína silvestre de *C. californicus*, especie habitante del Pacífico Oriental, cuya dieta es piscívora. Esta conotoxina está clasificada en la superfamilia O1, reportada con arreglo de cisteínas VI/VII.

Secuencia: NCIPKNHFCGLLHHSRNCCTPTCLIVCF

Pruebas de secuencia	Nivel: Ácido nucleico
Masa promedio	3168.75
Masa monoisotópica	3166.40
Punto isoeléctrico	11.81
Coficiente de extinción [280 nm]	-1.00

⁴ Número de acceso en ConoServer (Protein Card) como referencia al lector.

⁵ Número de acceso en BLAST de NCBI como referencia al lector.