



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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE CONOTOXINAS CON
EFECTO SOBRE RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA**

Tesis

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

BIÓL. XIMENA CECILIA RODRIGUEZ RUIZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMIREZ, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. LEOVIGILDO QUIJANO, INSTITUTO DE QUIMICA
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, ICMYL, PUERTO MORELOS
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES, UNAM CAMPUS SISAL

.....

MARZO 2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE
CONOTOXINAS CON EFECTO SOBRE RECEPTORES
NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

Biología Marina

P r e s e n t a

Biol. XIMENA CECILIA RODRIGUEZ RUIZ

Director de Tesis: Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

Comité Tutorial: Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ

Dr. LEOVIGILDO QUIJANO

Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

México, Ciudad de México, marzo de 2017.

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

El presente trabajo fue financiado gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN213808-3, al Proyecto Institucional 615 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con los proyectos 153915 y 15809.

De igual forma, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo con la beca de manutención al becario 666534.

Después de todo, ¿qué es un científico?

Es un hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede

Jacques Yves Cousteau

Dedicatoria

A Leo,

por siempre tener una sonrisa, un beso y un abrazo para mí

A mis hermanas,

por animarme, escucharme y no dejar que pierda la fé

A mis padres y tía,

por su apoyo en todo momento y ayudarme a hacer todo esto posible

Agradecimientos

Académicos

Al **Dr. Estuardo López** por aceptarme dentro de su laboratorio, por su guía, todas las enseñanzas, su apoyo, su confianza y su amistad durante todo este tiempo.

Al **Dr. Manuel Aguilar**, por amablemente dirigirme a este laboratorio; por la paciencia que presentó conmigo y todos los comentarios que hizo y ayudaron a terminar este trabajo.

Al **Dr. Leovigildo Quijano**, por aceptar formar parte del comité, sus observaciones y consejos durante los exámenes tutorales.

A la **Dra. Judith Sánchez**, por sus palabras, comentarios y consejos durante los exámenes tutorales.

Al **Dr. Sergio Rodríguez**, por sus comentarios, continuas revisiones y su interés por que este trabajo fuera aún mejor.

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

Al **Dr. Adolfo Gracia** y la **Dra. Ana Rosa Vázquez** por permitirme participar en el COBERPES 7, una de las mejores experiencias en mi vida.

A los maestros que tuve durante el Posgrado, en especial al **Dr. Carranza**, el **Dr. Soto** y a la **Dra. Robles** por todas sus enseñanzas.

Al personal de la Coordinación de Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología: **Diana, Lupita, Chantal** y **Gaby**, por las facilidades y el apoyo en la entrega de documentos y solicitud de fechas.

Finalmente, a la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** y al **Instituto de Ciencias del Mar** por permitirme realizar los estudios del posgrado en sus instalaciones.

Agradecimientos

Personales

A mi mamá **Carmen**, por todo el apoyo y confianza que me demuestras día con día; por insistir en que sea una mejor persona en todo momento, por alentarme a luchar por aquello que quiero y no dejarme vencer por nada.

A mi papá **Gonzalo**, por el apoyo incondicional que me das y siempre confiar en que estoy tomando las decisiones correctas.

A mi tía **Ceci**, por seguir siendo una madre para mí, que me ayuda, cuida y alienta en todo momento, a pesar de la distancia.

A mi tía **Lu** y mi tío **Oscar**, por todo su cariño y sus ánimos para realizar este estudio. Igualmente gracias por siempre aceptarme en su casa.

A **Zaira**, mi hermana de toda la vida, por siempre apoyarme en cada una de mis decisiones y por todas esas tardes de café que permitieron seguir con cordura.

A **Karime**, mi hermanita, mil gracias por toda, toda tu ayuda durante la realización de este estudio. También por los ánimos en todo momento y apoyo incondicional.

Nuevamente, al jefe, **Estuardo**, muchísimas gracias por todo; en especial, la paciencia que siempre has mostrado conmigo además de todas las bromas. Espero, algún día, poder responder tus preguntas con la misma facilidad con que lo hago respecto a Marvel.

A mis Reinas del Lab; **Elba**, por todas tus enseñanzas, tu cariño y sobre todo tu amistad; **Angie**, por tu paciencia y ayuda; **Haydee**, por siempre escucharme y acompañarme en mis regresos; **Mine**, por todos esos Disney moments que alegraron las tardes, además de tu compañía en el barco; **Lissa**, por tu apoyo, tus pláticas y tus enseñanzas; **Brenda**, por las risas y las ricas gelatinas.

A las demás personitas que conocí en el laboratorio: **Lalo, Luis, Bea** y en especial a **David**, por ser el primer amigo que tuve dentro del lab.

A **Fabiola** y **Xóchitl**, mis queridas amigas que conocí en este posgrado y con quienes disfruté, sufrí y, a la vez, hicieron más sencillas cada una de las clases. Igualmente a **Sergio, Sonia, Adán, Mayla** y **Roberto** por todo su apoyo.

A mis otros hermanos que esta vida me ha dado: **Roberto, Villo, Uribe, David, Gerardo, Leslie** y **Gary** de los cuales me distancio por temporadas, pero que siempre han están ahí, sin importar el tiempo o las circunstancias.

Índice general.

Contenido

1	Introducción.....	1
1.1	Phylum Mollusca.....	1
1.1.1	Morfología.....	1
1.1.2	Clase Gastropoda.....	5
1.1.3	Clasificación.....	9
1.1.4	Familia Conidae.....	11
1.1.5	Género <i>Conus</i>	12
1.1.6	<i>Conus fergusonii</i>	16
1.2	Toxinas de conos (Conotoxinas).....	18
1.2.1	Estructura bioquímica.....	19
1.2.2	Clasificación de conotoxinas.....	20
1.2.3	Efectos de conotoxinas.....	22
1.3	Acetilcolina y sus receptores.....	27
1.3.1	Neurotransmisores.....	27
1.3.2	Acetilcolina.....	27
1.3.3	Receptor de Acetilcolina (RACH).....	29
2	Justificación.....	33
3	Hipótesis.....	34
4	Objetivos.....	35
4.1	Objetivo General.....	35
4.2	Objetivos Particulares.....	35
5	Material y métodos.....	36
5.1	Material biológico.....	36
5.2	Disección del caracol.....	36
5.3	Obtención del extracto crudo de veneno.....	37
5.4	Cuantificación de proteínas.....	37
5.5	Fraccionamiento del veneno por RP-HPLC.....	37

5.6	Propagación de subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina.	38
5.7	Transcripción in vitro.	39
5.8	Obtención de ovocitos.	39
5.9	Expresión heteróloga.	41
5.10	Ensayos electrofisiológicos.	42
5.11	Determinación de masa molecular.	42
5.12	Determinación de la secuencia.	43
6	Resultados.	45
6.1	Cuantificación de extracto crudo del veneno.	45
6.2	Fraccionamiento del veneno.	45
6.3	Propagación y transcripción de las subunidades de los RnACh.	46
6.4	Evaluación electrofisiológica de las fracciones.	47
6.5	Subfraccionamiento del veneno.	51
6.6	Evaluación electrofisiológica de las subfracciones.	54
6.6.1	Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de F4.	55
6.6.2	Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de F5.	58
6.6.3	Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de F6.	63
6.7	Determinación de masa molecular.	64
6.8	Secuenciación.	66
6.9	Curva Dosis-Respuesta.	68
7	Discusión.	69
8	Conclusión.	78
9	Perspectivas.	79
10	Bibliografía.	80

Índice de Figuras

Figura	Título	Página
1	Clases del Phylum Mollusca.	4
2	Diagrama de la morfología interna de un gasterópodo.	5
3	Ejemplos de prosobranquios.	9
4	Ejemplos de opistobranquios.	10
5	Ejemplos de gasterópodos pulmonados.	10
6	Representes de la familia Conidae.	11
7	Diversidad del género <i>Conus</i> en el mundo.	13
8	Aparato venenoso de <i>Conus</i> .	14
9	Alimentación piscívora.	15
10	<i>Conus fergusonii</i> .	16
11	Mapa de distribución de <i>C. fergusonii</i> .	17
12	Organización del precursor de conopéptidos.	20
13	Clasificación de las conotoxinas.	21
14	Transmisión eléctrica entre las células.	27
15	Molécula de acetilcolina.	28
16	Pez Torpedo y diagrama del órgano eléctrico.	29
17	Subunidades y combinación del RnACh.	31
18	Concha del caracol <i>Conus fergusonii</i> .	36
19	Disección de <i>C. fergusonii</i> .	37
20	Microcirugía de <i>X. laevis</i> .	40
21	Selección de ovocitos de <i>X. laevis</i> .	41
22	Inyección de material genético.	41
23	Técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.	42
24	Perfil cromatográfico del veneno <i>Conus fergusonii</i> monitoreado a una longitud de onda de 220 nm.	46
25	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4.	48

26	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5.	48
27	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F4.	49
28	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F5.	49
29	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F6.	50
30	Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F4 del veneno de <i>C. fergusonii</i> monitoreado a una longitud de onda de 220 nm.	52
31	Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F5 del veneno de <i>C. fergusonii</i> monitoreado a una longitud de onda de 220 nm.	53
32	Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F6 del veneno de <i>C. fergusonii</i> monitoreado a una longitud de onda de 220 nm.	54
33	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4. Sub3.	56
34	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4. Sub5.	56
35	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4. Sub10.	57
36	Evaluación de la respuesta del RnACh $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ ante la incubación con F4. Sub5.	58
37	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub7.	59
38	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub8.	60

39	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub11.	60
40	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub12.	61
41	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F5. Sub7.	62
42	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F5. Sub11.	62
43	Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F6. Sub21.	64
44	Espectrometría de masas (ESI) de la muestra del péptido F5. Sub8 en una ventana masa/ carga que va de 800 a 1,500.	65
45	Espectrometría de masas (ESI) de la muestra del péptido F5. Sub8 en una ventana masa/carga que va de 11,000 a 11,700.	66
46	Secuencia de aminoácidos de la fracción F5. Sub8, obtenida por principio de degradación de Edman.	67
47	Masa calculada de F5. Sub8 obtenida con Ion Source.	68
48	Curva dosis respuesta para F5. Sub7 en el RnACh $\alpha 7$.	68

Índice de Tablas

Tablas	Título	Página
1	Cantidad de veneno obtenida de <i>Conus fergusonii</i> .	45
2	Cantidad (ng/ μ L) de cDNA y RNAm obtenido a partir de la propagación y transcripción de subunidades de RnACh.	47
3	Porcentaje de inhibición de las fracciones de <i>C. fergusonii</i> para los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ de RnACh.	51
4	Porcentajes de inhibición registrados para los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ de RnACh, de acuerdo a la subfracción de F4 probada.	55
5	Porcentajes de inhibición registrados para los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ de RnACh, de acuerdo a la subfracción de F5 probada.	58
6	Porcentajes de inhibición registrados para el RnACh $\alpha 4\beta 2$, de acuerdo a la subfracción de F6 probada.	63
7	Resultados de la masa molecular correspondiente a las fracciones F5. Sub7, F5. Sub8 y F5. Sub12 de <i>C. fergusonii</i> .	65
8	α -conotoxinas de la Superfamilia A con actividad sobre RnACh $\alpha 7$.	73
9	Conotoxinas pertenecientes a diferentes familias, con actividad sobre RnACh.	74

Siglas y abreviaturas

Sigla	Definición
ACh	Acetilcolina.
ACN	Acetonitrilo.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
TFA	Ácido trifluoroacético.
Ala	Alanina.
N-terminal	Amino terminal.
A	Amperios.
ATZ	Anilinoiazolinona.
Arg	Arginina.
Cav	Canales de calcio dependientes de voltaje.
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje.
Nav	Canales de sodio dependientes de voltaje.
C-terminal	Carboxilo terminal.
Cys	Cisteína.
MgCl ₂ 6H ₂ O	Cloruro de Magnesio Hexahidratado.
KCl	Cloruro de potasio.
NaCl	Cloruro de sodio.
CAT	Colina acetiltransferasa.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media.
μM	Concentración micromolar.
mM	Concentración milimolar.
M	Concentración molar.
N	Concentración normal.
<i>C. fergusonii</i>	<i>Conus fergusonii</i> .
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución / High performance liquid chromatography.
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa / Reverse phase- High performance liquid chromatography.

Da	Daltones.
cDNA	DNA complementario.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
PITC	Fenilisotiocianato
PTH	Feniltiohidantoína
Gly	Glicina.
Gln	Glutamina.
°C	Grados centígrados.
NaOH	Hidróxido de sodio.
IBt	Instituto de biotecnología.
K ⁺	Ion potasio.
Na ⁺	Ion sodio.
ESI	Ionización tipo nano-electrospray.
Ile	Isoleucina.
Leu	Leucina.
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas.
μm	Micrómetros.
mL	Mililitros.
Mm	Milímetros.
mV	Milivolts.
Min	Minutos.
nA	Nanoamperios.
Nm	Nanómetros.
Nmoles	Nanomoles.
NMDA	N-metil-D-aspartato.
Ppm	Partes por millón.
Pmoles	Picomoles.
pH	Potencial de hidrogeno.
Pro	Prolina.
PCR	Reacción en cadena de polimerasa.
RACH	Receptor de acetilcolina.

RnACh	Receptor nicotínico de acetilcolina.
RNA _m	RNA mensajero.
Ser	Serina.
SNC	Sistema nervioso central.
Sub	Subfracción.
FT	Transformada de Fourier.
Thr	Treonina.
MS-222	Tricaina metansulfonato.
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
V	Volts.
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i> .

Resumen

Muchos organismos marinos han desarrollado adaptaciones especiales para facilitar su alimentación o defensa. Entre ellos, se encuentran los caracoles del género *Conus*, cuya característica principal es contar con un aparato venenoso para la síntesis de toxinas. Estas reciben el nombre de conotoxinas; se han clasificado en superfamilias genéticas, de acuerdo a la secuencia del péptido señal del precursor, y en familias farmacológicas dependiendo del blanco molecular sobre el que actúan. Entre éstos, están los receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh). El presente trabajo, se enfocó en determinar conotoxinas moduladoras de varios subtipos de RnACh del veneno de *Conus fergusonii*.

Del veneno total de *C. fergusonii*, se encontró actividad en la modulación de corrientes de los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ de RnACh por 3 fracciones obtenidas por cromatografía líquida. De estas fracciones, se obtuvo el peso molecular de tres péptidos (F5. Sub7, F5. Sub8, F5. Sub12), y la secuencia parcial de uno de ellos (F5. Sub8); que, por el arreglo de cisteínas, pudiera pertenecer a la familia T de conotoxinas.

Palabras clave:

Conus fergusonii, conotoxinas, RnACh, RP-HPLC, estructura primaria, electrofisiología

Abstract

Many marine organisms have developed special adaptations in order to facilitate their feeding and/or defense. Among them, the snails of the genus *Conus* are an example; they have a venomous apparatus for toxins synthesis and injection. These toxins are peptides known as conotoxins; they have been classified into genetic superfamilies, according to the signal peptide sequence of the precursor, and into pharmacological families according to the molecular target they bind to. The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is one of them. The present work has been focused on identifying and characterizing the modulator conotoxins for nicotinic acetylcholine receptors from the *Conus fergusonii* venom.

From the total venom of *C. fergusonii*, 3 venom fractions obtained by liquid chromatography presented modulation activity of currents on the $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChR. From this fractions, the molecular masses of three peptides (F5. Sub7, F5. Sub8 and F5. Sub12) were determined; also, the partial sequence of one of them (F5. Sub8) was determined; which, by the cystein framework could belong to the T superfamily of conotoxins.

Keywords:

Conus fergusonii, conotoxins, nAChR, RP-HPLC, primary structure, electrophysiology

1 Introducción.

1.1 Phylum Mollusca.

Después de los artrópodos, es el Phylum de invertebrados más conocido y numeroso, descrito por Linnaeus. Cuenta con 50,000 a 120,000 especies vivas y 70,000 especies fósiles descritas (Brusca y Brusca, 2003; Chapman, 2009).

Es uno de los grupos con mayor diversidad morfológica. El rango de tamaño va desde organismos microscópicos hasta los que miden más de 20 metros.

Entre los organismos más conocidos se encuentran las almejas, ostras, calamares, pulpos y los caracoles, tanto marinos como terrestres. De ellos, sus conchas han sido muy populares desde tiempos antiguos, utilizándose por diversas culturas como herramientas, contenedores, decoración, etc. (Meiglitsch, 1972; Ruppert, 1995; Brusca y Brusca, 2003).

El registro fósil indica que los moluscos son organismos muy antiguos; aparecieron en el precámbrico tardío hace 541 millones de años (Hickman *et al.*, 2008; Ponder y Lindberg, 2008). Habitan desde la zona abisal del océano hasta por encima de la línea de la marea; son comunes en aguas dulces y algunas especies se han adaptado bien a la vida terrestre (Meiglitsch, 1972).

1.1.1 Morfología.

Son organismos protostomados celomados con simetría bilateral. El plano corporal general de un molusco se divide en tres partes principales:

1) Pie largo definido; para la locomoción y adherencia al sustrato. En esta estructura se concentran una gran cantidad de glándulas mucosas, para secretar suficiente moco o baba que se utiliza para la adhesión; este se endurece al contacto con el aire o agua. En formas pelágicas, el pie puede ser modificado para la natación libre (Meiglitsch, 1972; Brusca y Brusca, 2003; Hickman *et al.*, 2008).

2) Masa visceral; localizada dorsalmente. Contiene los órganos internos: el corazón dentro de la cámara pericárdica, un celoma limitado alrededor del

corazón, nefridios, y sistema circulatorio abierto. Rodeando a la masa visceral, se forma una cámara denominada cavidad paleal, donde se alojan las branquias, el aparato digestivo y reproductor, y algunas partes del epitelio sensorial (Brusca y Brusca, 2003).

3) Manto; tejido plegado que cubre toda la masa visceral, formado de una epidermis cuticular (piel) que contiene glándulas que secretan espículas calcáreas, formando así el esqueleto calcáreo; es decir, las placas de la concha (en las especies con concha externa) (Brusca y Brusca, 2003).

El sistema nervioso de los moluscos, parte del plan básico de los organismos protostomados, de un arreglo anterior circunventérico de ganglios y cordones nervios pareados ventralmente. Los pares nervioso ventrales y mediales, son los llamados cordones ventrales e inervan los músculos del pie. Los nervios laterales, son los cordones viscerales que controlan el manto y las vísceras (Brusca y Brusca, 2003).

La mayoría de los moluscos son dióicos, con la presencia de hermafroditas. La fecundación es externa, pero existen organismos que presentan fecundación interna. Todos producen huevos del que emergen larvas trocóforas, cuya metamorfosis es directa a un pequeño juvenil. Sin embargo, en otros grupos de moluscos, principalmente gasterópodos y bivalvos, la larva trocófora es seguida de una larva tipo veliger de natación libre (es exclusiva de moluscos). En algunos casos la larva trocófora ocurre dentro del huevo, lo que permite que emerja del huevo una larva tipo veliger. En organismos de aguas dulces, los juveniles emergen directamente del huevo (Brusca y Brusca, 2003; Hickman *et al.*, 2008).

El Phylum Mollusca se divide en 8 Clases (Figura 1):

1. Clase Caudofoveata Sin concha externa, manto formado por una cutícula quitinosa con espículas calcáreas que forman escamas.
2. Clase Solenogastrea Sin concha externa; el manto se forma por una cutícula quitinosa con espículas calcáreas y aragoníticas.
3. Clase Monoplacophora Univalvos, la concha es redondeada.

4. Clase Polyplacophora Concha formada con 7 u 8 placas.
5. Clase Scaphopoda Concha con forma de colmillo, abierta en los extremos.
6. Clase Gastropoda Concha univalva enrollada
7. Clase Bivalvia = Pelecypoda = Lamellibranchiata Dos conchas (valvas) laterales, generalmente simétricas unidas por una charnela.
8. Clase Cephalopoda Puede presentar concha septada, concha interna reducida o sin concha, según la especie.

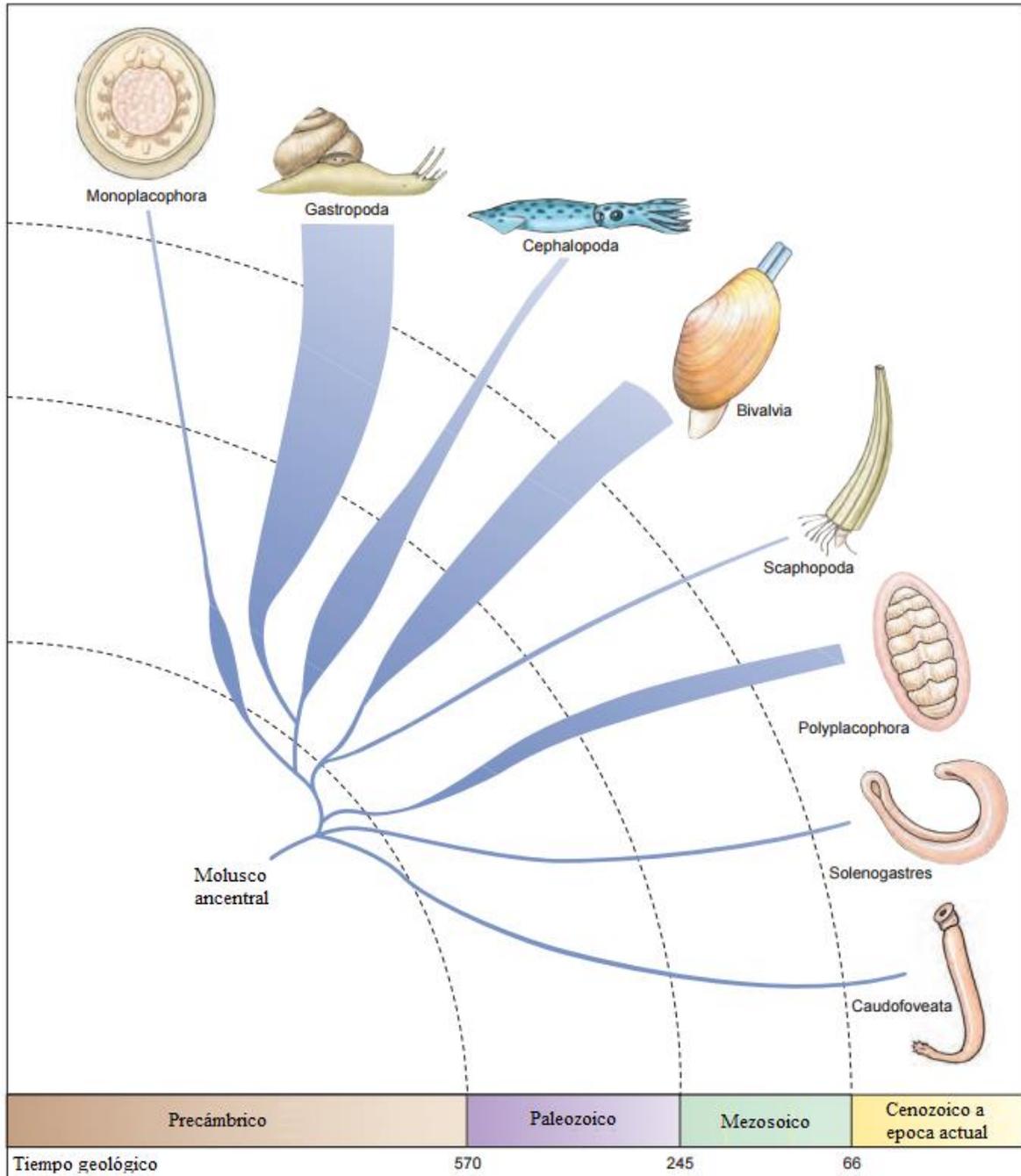


Figura 1. Clases del Phylum Mollusca. Muestra su derivación y abundancia relativa (Imagen modificada de: Hickman *et al.*, 2008).

1.1.2 Clase Gastropoda.

La clase Gastropoda (gastero = estómago; podo = pie), comprende el grupo más diverso dentro del Phylum Mollusca. El número de especies podría superar las 150,000 considerando tanto las especies fósiles como las vivas; alrededor de la mitad (70,000) son reportadas para especies vivas en los ambientes terrestres, dulceacuícolas y marinas (Brusca y Brusca, 2003). En el caso de los organismos marinos, habitan una gran variedad de nichos ecológicos, desde la línea de costa hasta el mar profundo (Ponder y Lindberg, 2008; Felder y Camp, 2009).

La evolución de los gasterópodos está marcada por dos características:

La primera, es la transformación de la concha, de una placa a una estructura espiral.

La segunda, es la torsión de 180° hacia la izquierda sobre el plano horizontal de la masa visceral; siendo así los únicos que presentan torsión de su cuerpo como resultado de una acción muscular y crecimiento diferencial. Esto generalmente ocurre durante la fase tardía de larva veliger (Brusca y Brusca, 2003; Gabbi, 2006; Jackson *et al.*, 2007).

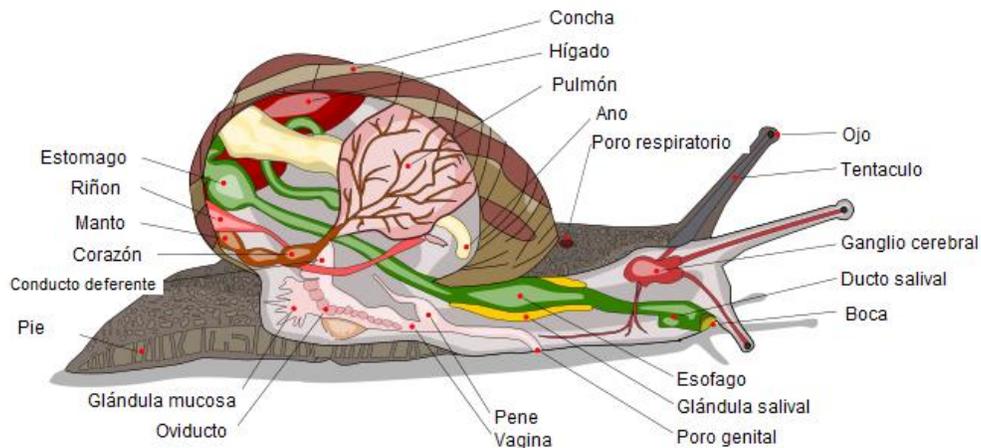


Figura 2. Diagrama de la morfología interna de un gasterópodo (Imagen modificada de: Dahl, 2016).

1.1.2.1 Morfología.

Siguiendo el plano corporal de los moluscos, se dividen en pie, masa visceral y manto. En el manto, se encuentran células sensitivas y, en algunos gasterópodos, las glándulas productoras de la concha, que se compone de una proteína llamada conquiolina (Meiglitsch, 1972).

1.1.2.2 Sistema Nervioso.

Está compuesto por tres pares de ganglios: los ganglios cerebrales, están por encima del esófago; los ganglios pedales, se encuentran anteriores a la línea media de los pies; y los ganglios pleurales, están localizados más lateralmente. Todos están conectados formando un triángulo neural de cada lado (Meiglitsch, 1972).

La mayoría de los gasterópodos tienen un par de tentáculos cefálicos, y ojos pequeños en la base de cada uno de los tentáculos (Brusca y Brusca, 2003).

1.1.2.3 Sistema Circulatorio.

Los gasterópodos, con algunas excepciones, presentan dorsalmente, en el interior de una cavidad denominada pericardio, un sistema circulatorio que suele estar compuesto por un corazón, con un ventrículo y una aurícula (denominada monotocardias). Del ventrículo parte una aorta posterior y otra anterior, que irrigan a la masa visceral y la región cabeza-pie-manto respectivamente (Brusca y Brusca, 2003).

La cavidad principal del cuerpo, es un sistema circulatorio abierto o hemocele, ya que la hemolinfa (la sangre de los moluscos) no está siempre contenida en una red de vasos sanguíneos, esto funciona como esqueleto hidrostático. Entre los vasos que presenta, están los de las branquias. La hemolinfa contiene varios tipos de células, entre ellas los amebocitos (Brusca y Brusca, 2003).

El intercambio ocurre en los tejidos, de tal modo que las células recogen el oxígeno y los nutrientes, y ceden los productos de desecho y el CO₂. Después, la hemolinfa es recogida por vasos que la llevan al nefridio, donde una parte es

absorbida, en un proceso de filtración para eliminar los productos de desecho. Finalmente, la hemolinfa se incorpora a la circulación branquial, donde se oxigena para retornar al corazón. Una parte de la hemolinfa filtrada pasa directamente del nefridio al corazón, sin entrar en la circulación branquial (Brusca y Brusca, 2003; Gabbi, 2006).

1.1.2.4 Sistema Respiratorio.

Los gasterópodos marinos, respiran por ctenidios (nombre que reciben las branquias de los moluscos); estos son estructuras plumosas que presentan un epitelio muy fino y están ricamente vascularizadas, lo que favorece el intercambio de gases entre la hemolinfa y el agua. Debido a la torsión de algunos gasterópodos, el proceso respiratorio se produce en el interior de la cavidad paleal donde se alojan los ctenidios delante del corazón (Brusca y Brusca, 2003; Gabbi, 2006).

1.1.2.5 Aparato Digestivo.

Los moluscos poseen un aparato digestivo completo: boca, cavidad bucal (en donde se encuentra el aparato radular), esófago, estómago, intestino y ano. Algunas glándulas salivales están asociadas a la parte anterior del aparato digestivo; unas producen enzimas ricas en celulasas y quitinasas, y otras secretan lubricante sobre la rádula (Brusca y Brusca, 2003).

La rádula es el principal aparato de alimentación. Contiene los dientes radulares, y consiste en una vaina bilobulada, con un brazo dorsal largo y un brazo ventral corto (Brusca y Brusca, 2003). Ha desarrollado diferentes estrategias de uso; la modificación de estos dientes radulares ha sido explotada en la clasificación de los organismos (Katsuno y Sasaki, 2008).

La gran mayoría son micrófagos, algunos raspan o cepillan la superficie de las rocas, algas o animales sésiles y objetos similares; otros gasterópodos se alimentan del detritus o son carroñeros. Los herbívoros utilizan la rádula para cortar piezas de comida, mientras que los carnívoros han convertido su aparato radular en una arma (Meiglitsch, 1972).

En términos de alimentación, los gasterópodos más especializados son los caracoles del género *Conus*, en los cuales, la rádula se ha reducido a una estructura aislada, hueca y con forma de arpón, el cual utilizan para la inyección de veneno (Meiglitsch, 1972; Brusca y Brusca, 2003).

Las estructuras básicas de excreción son un par de metanefridios (algunas veces llamados riñones); el nefrostoma se abre al celoma pericardial vía ducto renopericardio, y el nefridioporo descarga en la cavidad del manto, que usualmente se encuentra cerca del ano (Brusca y Brusca, 2003).

1.1.2.6 Aparato Reproductivo.

El aparato reproductor de los gasterópodos, se compone de una sola gónada que está fusionada con la masa visceral, la cual generalmente se localiza en el interior de las vueltas iniciales de la concha. A partir de la gónada, se extiende el gonoducto, que puede variar desde un simple conducto, hasta alcanzar altos niveles de complejidad (Brusca y Brusca, 2003; Gabbi, 2006).

Los gasteropodos pueden ser organismos dioicos (prosobranquios) o hermafroditas (opistobranquios y pulmonados) con reproducción cruzada, siendo primero machos y después hembras.

1.1.2.7 Concha.

Una de las características externas más obvias de los gasterópodos es su concha; usualmente enrollada y extremadamente variable en tamaño y forma, además de poseer colores llamativos. Su formación comienza en el estadio larval. Primero es una capa simple, que posteriormente se vuelve una espiral plana, que gradualmente cambia a una espiral cónica. La concha provee protección al organismo, pero al mismo tiempo le agrega peso; es por eso que, en algunos casos, la tendencia es la pérdida o reducción de la concha, que a su vez se relaciona con la pérdida de torsión del organismo (Meiglitsch, 1972; Brusca y Brusca, 2003).

1.1.3 Clasificación.

Los gasterópodos se subdividen en tres subclases (Marshall, 1980):

- Prosobranquios.
- Opistobranquios.
- Pulmonados.

No obstante, algunos autores consideran una clase más, llamada Protogastropoda, la cual es para algunos organismos extintos. Los organismos no muestran evidencia de torsión, y las conchas son de forma cónica (espirales planas o espirales cónicas).

1.1.3.1 Prosobranquios.

Significa branquias frontales. Está constituida por la mayoría de los caracoles marinos, y algunos de los gasterópodos terrestres y de agua dulce (Figura 3). Son todos aquellos con torsión en el cuerpo, generalmente debido a una concha enrollada en espiral. Son organismos de cuerpo blando, no segmentado, con pie muscular y manto. En la parte anterior (cerca de la cabeza) tienen los ctenidios, en el borde a los osfradios (que son quimiorreceptores), las glándulas hipobranquiales, el ano y los nefridioporos (Brusca y Brusca, 2003).

La mayoría de los gasterópodos pertenecen a esta subclase. Incluyendo a la familia Conidae, entre muchas otras (Ruppert y Barnes, 1995).



Figura 3. Ejemplos de prosobranquios. *Calliostoma annulatum* (izquierda) (Cole, 2016); *Conus mediterraneus* (derecha) (Passano, 2010).

1.1.3.2 Opisthobranquios.

Significa branquias posteriores. Está constituida por las babosas, liebres, y mariposas marinas (Figura 4). Son gasterópodos marinos, altamente desarrollados. Tienen una alta tendencia a la reducción de la concha; el sistema nervioso no está torcido, y es relativamente centralizado. Tienen simetría bilateral.



Figura 4. Ejemplos de opisthobranquios. *Hypselodoris obscura* (izquierda); *Dendrodoris denisoni* (centro); *Flabellina iodinea* (derecha) (Ling, 2016).

1.1.3.3 Pulmonados.

Predominantemente terrestres, y de agua dulce: son los caracoles y babosas terrestres (Figura 5). La cavidad del manto se ha modificado como un saco respiratorio, utilizado para el aire o para la respiración subacuática; en algunos casos carecen de concha. Son hermafroditas. No pasan por estadios larvarios (Marshall, 1980).



Figura 5. Ejemplos de gasterópodos pulmonados. Caracol de jardín, *Helix aspersa* (izquierda) (flipper.diff.org); Babosa banana, *Ariolimax californicus* (derecha) (piximus.net).

1.1.4 Familia Conidae.

Dentro del grupo de los gasterópodos prosobranquios marinos, se ubica la familia Conidae que es, sin duda, uno de los grupos inconfundibles entre los moluscos. Son llamados “conos” o “caracoles cono”, por la característica forma cónica de la concha. Presentan una abertura típicamente larga y estrecha, con una concha en una gran variedad de colores (Kohn y Perron, 1994; Olivera, 1997).

Son 3 los géneros pertenecientes a la familia Conidae (Figura 6) (López-Vera, 2001):

- *Hemiconus* (ya extinto).
- *Conorbis*.
- *Conus*.



Figura 6. Representes de la familia Conidae: Del género *Hemiconus*, *H. stromboides* (izquierda) (fossilshells.nl) y del género *Conus*, *C. textile* (derecha) (Fotografía: Elaboración propia).

Sin embargo, basándose en estudios de filogenética molecular y/o la morfología de la radula y/o la concha, se han propuesto nuevas clasificaciones para la familia Conidae, una de ellas es la de Puillandre *et al.* (2015) en la cual señala que existen 4 géneros y 71 subgéneros.

Además, la familia Conidae, junto con otras dos familias, la Turridae y la Terebridae, constituyen el suborden Toxoglossa o Superfamilia Conoidea, y se caracterizan por tener un aparato de veneno bien definido (Meyer, 2001).

1.1.5 Género *Conus*.

El género *Conus* comprende caracoles marinos carnívoros, que surgieron aproximadamente hace 50 millones de años. El primer fósil encontrado de *Conus* aparece justo después de la extinción de los dinosaurios y los amonites (Olivera *et al.*, 1990; Olivera 1997), lo cual nos permite decir, hablando en términos geológicos y evolutivos, que es un grupo relativamente reciente (López-Vera *et al.*, 2006).

Existen alrededor de 500 a 700 especies (al menos el 10% de la diversidad Conoidea total), distribuidas principalmente en mares tropicales y subtropicales, aunque algunas especies se han adaptado a aguas frías; la mayoría de ellas se encuentra en la región del océano Indo-Pacífico (60%) y Pacífico Oriental (Figura 7) (Keen, 1971; Kohn *et al.*, 2001; Daly y Craik, 2009; Paredes *et al.*, 2010; Fedosow *et al.*, 2012).

Generalmente habitan en arrecifes coralinos, suelos arenosos, rocosos, praderas de pastos marinos y zonas intermareales; algunos, como *C. pacificus*, se han encontrado a profundidades que van más allá de los 400 m (Terlau y Olivera, 2004; López-Vera *et al.*, 2006; Bouchet, 2013).

Diversidad de Caracol *Conus*

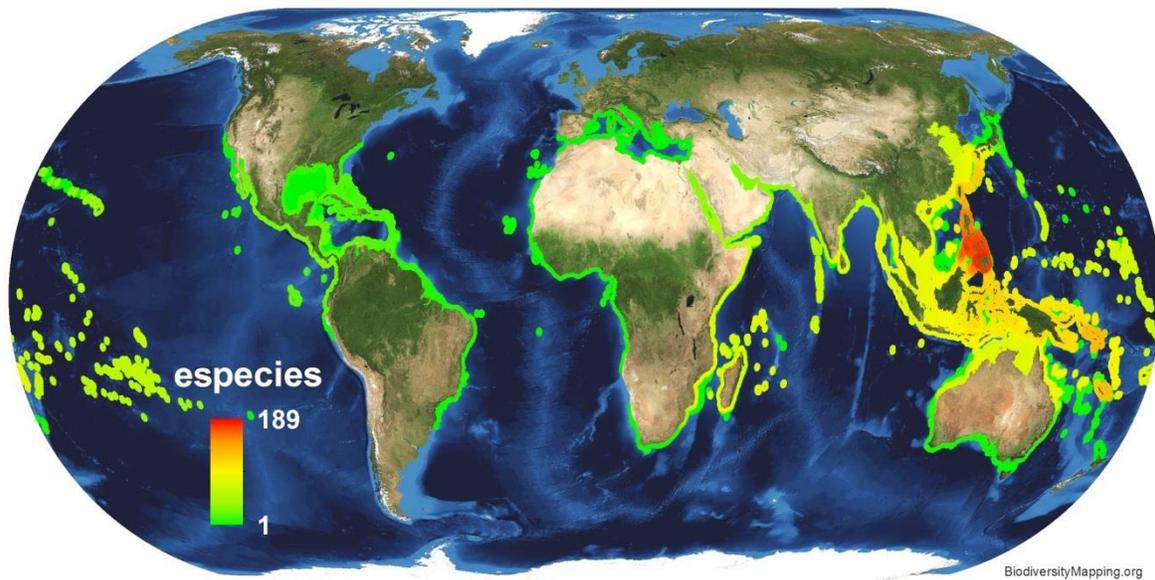


Figura 7. Diversidad del género *Conus* en el mundo. Se señala con color rojo, aquellos lugares donde hay una mayor diversidad (Imagen modificada de: biodiversitymapping.org).

Los conos, como se le conoce comúnmente al género *Conus*, son el grupo de depredadores marinos carnívoros más exitoso y numeroso que existe. Dado que son organismos de visión pobre y hábitos nocturnos, han desarrollado como estrategia evolutiva el uso de veneno como arma principal para la captura de sus presas, y como mecanismo de defensa en contra de sus depredadores o, posiblemente, para disuadir a sus competidores (Olivera, 1997; Meyer, 2001; Terlau y Olivera, 2004; Wang y Chi, 2004; Aguilar *et al.*, 2005; Buczek *et al.*, 2005).

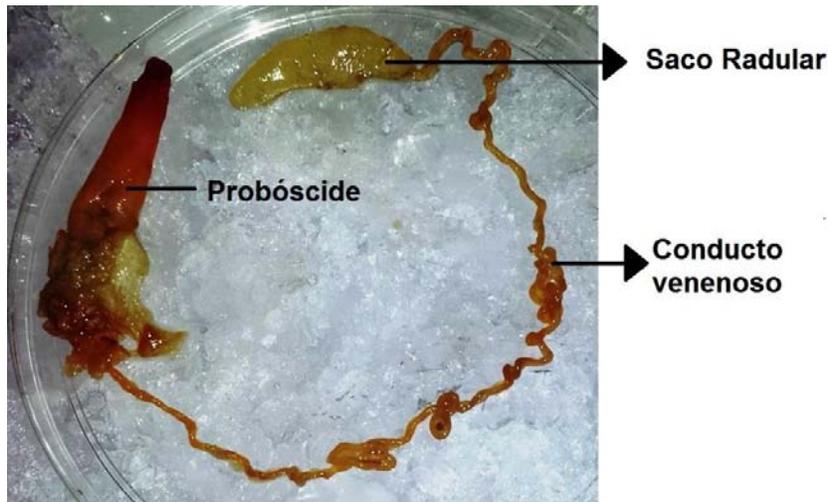
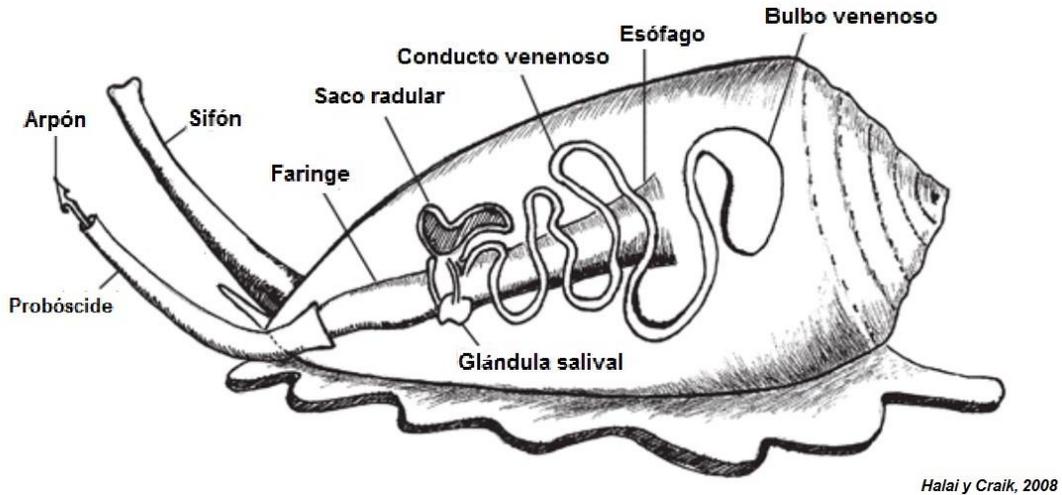


Figura 8. Aparato venenoso de *Conus*. Esquema de la distribución del aparato venenoso dentro del organismo (arriba). Fotografía del aparato venenoso de *C. fergusonii* aislado del caracol (abajo) (Imagen modificada de: Halai y Craik, 2008; Fotografía: Elaboración propia).

Poseen un aparato venenoso altamente sofisticado (Figura 8), que está constituido por: la probóscide, un conducto venenoso (donde las células epiteliales sintetizan el veneno y este se almacena), un bulbo venenoso, y un saco radular donde resguardan las rádulas toxoglossas en forma de arpón (son huecas,

acanaladas y barbadadas), que funcionan como agujas hipodérmicas para inyectar el veneno en la presa (Terlau y Olivera, 2004).

La detección de la presa, se logra a través de señales químicas y cambios de presión. Una vez detectada, el arpón se mueve hacia la faringe, desde el saco radular hasta la probóscide, donde es acomodado y cargado de veneno Y queda listo para inyectar a la presa (Marshall *et al.*, 2002; Campos-Lira, 2014).

Generalmente, los *Conus* se alimentan durante la noche de diferentes tipos de presas; basados en este criterio, se clasifican en tres grupos (aunque el número de animales que pueden ser envenenados, va más allá de estos tres) (Kohn, 1983; Olivera *et al.*, 1990; Terlau y Olivera, 2004; Buczek *et al.* 2005):

- Vermívoros; se alimentan de gusanos, principalmente poliquetos, también hemicordados y equiuroideos. Son el grupo más abundante.
- Molusquívoros; se alimentan de moluscos.
- Piscívoros; se alimentan de peces por dos técnicas diferentes: arpón y sedal y pesca con red.



Figura 9. Alimentación piscívora. *Conus geographus* extendiendo la boca para engullir completo al pez (s3.vidimg.popscreen.com).

Una de las características inusuales del género es el tamaño de la presa que pueden ingerir, siendo esta de igual o mayor tamaño que el caracol. Debido a

que los dientes radulares no pueden desgarrar a la presa, estos caracoles suelen tragar presas enteras (Kantor, 2007)

1.1.5.1 *Conus en México.*

Pese a que son pocos los estudios relacionados con los aspectos ecológicos de los caracoles conos que habitan aguas territoriales, se sabe que la especiación de estos, ha sido rápida y, de las especies vivientes a nivel mundial, 70 habitan las costas mexicanas (Abbott y Dnace 1998; López-Vera *et al.*, 2006).

Se encuentran distribuidas en las llamadas provincias Panámica (costa del Océano Pacífico) y Costa Caribeña (costas del Golfo de México y del Mar Caribe).

1.1.6 *Conus fergusonii.*

La especie fue descrita por Sowerby III en 1873. La concha tiene una longitud máxima de 153 mm, con 12 a 13 espirales. La línea de la espiral es cóncava en especímenes jóvenes y recta en los organismos adultos. La superficie es lisa con excepción de 10 a 15 estrías, que se encuentran en el tercio inferior de la espiral.



Figura 10. *Conus fergusonii.* Concha sin periostraco de un organismo adulto (izquierda) (coneshell.net); concha cubierta por periostraco (derecha) (idscaro.net).

Su color es amarillo-naranja brillante. Es más pálido en organismos de tamaño pequeño, y se desvanece a blanco en especímenes grandes. El

periostraco es delgado, y presenta un color brillante en los especímenes pequeños, mientras que en los adultos, es grueso y de color marrón oscuro (Figura 10). El opérculo es aproximadamente cuatro veces más largo que ancho (McLean y Nybakken, 1979).

Su distribución abarca desde Bahía Magdalena en México (Baja California Sur), hasta la Isla Lobos de Tierra e Isla Lobos de Afuera en Perú (Figura 11).

McLean observó *C. fergusonii* en fondos rocosos submareales a profundidades someras (0 a 200 metros). En localidades de la parte central de la zona de distribución anteriormente mencionada, sólo se conoce su presencia a partir de registros de dragado. La especie no está restringida a un sustrato rocoso; se ha observado en fondos blandos, en la zona de pesca de camarón en el Golfo de Guayaquil, Perú (McLean y Nybakken, 1979).



Figura 11. Mapa de distribución de *C. fergusonii* (Tenorio, 2013).

1.2 Toxinas de conos (Conotoxinas).

Para un depredador venenoso, como son los conos, una alta especificidad de las toxinas puede ser una ventaja; particularmente si la velocidad del proceso de parálisis de la presa es un factor importante. Por ello, han desarrollado distintos venenos como una estrategia de supervivencia para la alimentación y la defensa (McIntosh *et al.*, 1999).

Una especificidad limitada a uno o pocos blancos moleculares permite un uso más rápido y eficiente de un menor número de moléculas de toxinas. Del mismo modo, evita el desperdicio del ligando. No se excluye la posibilidad de que dos o más toxinas actúen sobre diferentes blancos moleculares y ejerzan su efecto de manera paralela, con el fin de inmovilizar a la presa de manera más eficiente (Becerra, 2012).

La producción de una gran cantidad de péptidos pequeños biológicamente activos es una adaptación evolutiva de depredadores con movimientos lentos y carentes de aditamentos mecánicos para capturar a sus presas, o defenderse de los depredadores (Becerra, 2012).

El veneno de los conos comprende más de 50,000 componentes activos. Muchos de ellos actúan sobre el sistema nervioso y la mayoría son péptidos pequeños (10-40 residuos de aminoácidos), ricos en puentes disulfuro y con 0 a 6 aminoácidos entre los residuos de cisteína, los cuales se presentan en arreglos diferentes (Woodward *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1990; Olivera, 2006).

Aquellos con múltiples puentes disulfuro son conocidos como conotoxinas, o si solo tienen un puente disulfuro o ninguno, son llamados conopéptidos (Lluisma *et al.*, 2008; Kaas *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2012). Actúan, entre otros sitios, en la unión neuromuscular, dirigidos específicamente a canales iónicos activados por voltaje, y a receptores, causando una rápida inmovilización de la presa.

Aunque las conotoxinas son pequeñas, asumen conformaciones específicas (como si fueran polipéptidos más grandes). La estabilidad

conformacional está dada por los puentes disulfuro y, la riqueza en su diversidad química, se deriva la variedad de secuencias y alta frecuencia de modificaciones post-traduccionales, presentes en la mayoría de ellas (Kaas *et al.*, 2010).

1.2.1 Estructura bioquímica.

La biosíntesis de los conopéptidos, se da en las células epiteliales del conducto venenoso; todos se sintetizan, inicialmente, como precursores o prepropéptidos a través del mecanismo ribosomal convencional. Los precursores cuentan con 70 a 120 aminoácidos en su estructura, y se caracterizan por presentar tres zonas peculiares, dos de ellas muy conservadas (Figura 12) (Jones y Bulaj, 2000; Olivera y Cruz, 2001; Olivera, 2006; Kaas *et al.*, 2010; Laht *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2013):

- Secuencia señal típica en el extremo amino (región “pre”); con 20 a 25 aminoácidos en su estructura. Su función es dirigir al conopéptido en su camino hacia la secreción y está ampliamente conservada entre diversas toxinas.
- Región central o intermedia (región “pro”); con entre 20 y 60 aminoácidos en su estructura. Está asociada a las modificaciones post-traduccionales presentes en las toxinas, ya que tiene señales de reconocimiento para las enzimas que realizan las modificaciones.
- La región de la toxina madura en el extremo carboxilo; siempre presente en una sola copia (con 10 a 40 aminoácidos en su estructura). Es el componente biológicamente activo del veneno de *Conus* y presenta un arreglo de residuos de cisteínas que es ampliamente conservado, mientras que los aminoácidos intercisteínas presentan una variabilidad de hasta un 70%.

Una vez terminada la traducción, un corte proteolítico del prepropéptido es un paso obligatorio para obtener la toxina funcionalmente madura (Woodward *et al.*, 1990)



Figura 12. Organización del precursor de conopéptidos. La organización ejemplificada, corresponde a la secuencia del precursor de la conotoxina SmlVA (Imagen modificada de: Conoserver.org).

1.2.2 Clasificación de conotoxinas.

Debido a las secuencias señal y a los blancos moleculares y su efecto sobre ellos, se ha podido clasificar a las conotoxinas en (Figura 13) (Terlau y Olivera, 2004; Halai y Craik, 2009):

- Superfamilias genéticas; se definen de acuerdo a la secuencia del péptido señal de los precursores. Cada superfamilia está asociada a uno o más arreglos de cisteínas (Cys) (Terlau y Olivera, 2004; Kaas *et al.*, 2012).
- Familias farmacológicas; se definen de acuerdo al tipo de blanco molecular de las toxinas, y al efecto de éstas sobre el blanco (Olivera y Cruz, 2001).

Una característica importante, que también contribuye de manera significativa a la diversidad química de las conotoxinas, es que presentan diversas modificaciones post-traduccionales. Estas son llevadas a cabo en las células del conducto de veneno, en donde se encuentran las enzimas que las realizan –(Bandyopadhyay *et al.*, 1998; Hooper *et al.*, 2000; Campos-Lira, 2014).

La función de la mayoría de estas modificaciones aún es desconocida; sin embargo, se cree que tiene efecto en la interacción específica con el blanco molecular, y que intervienen en la estabilidad del plegamiento de algunos péptidos, sobre todo aquellos que carecen de residuos de cisteínas (López-Vera *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2009).

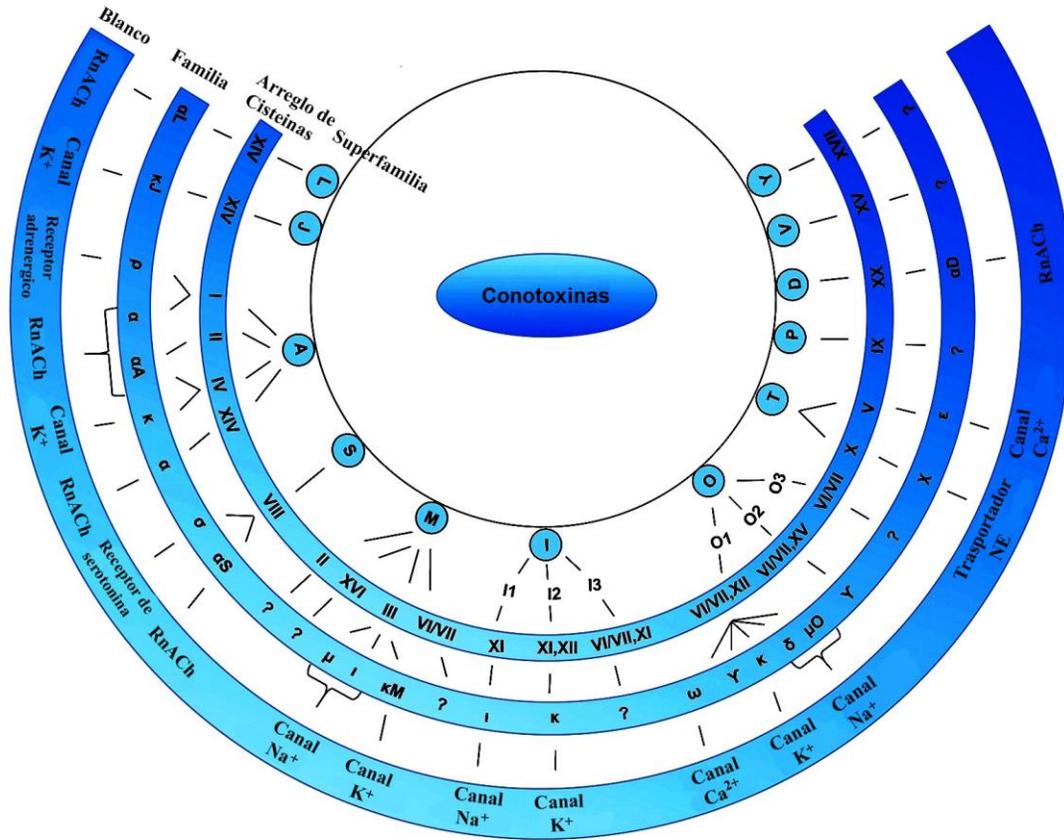


Figura 13. Clasificación de las conotoxinas. Clasificación basada en su superfamilia y blanco molecular (Imagen modificada de Akondi *et al.*, 2014).

1.2.2.1 Superfamilia A.

Está compuesta por cuatro diferentes familias (Flores-Torres, 2009):

- Familia “α”; es antagonista del receptor nicotínico de acetilcolina (RnACh); con un arreglo de cisteínas CC-C-C.
- Familia “ρ”; es antagonista del receptor adrenérgico α1B, con un arreglo de cisteínas CC-C-C.
- Familias “αA”; es antagonista del nAChR; con el arreglo de cisteínas CC-C-C-C-C.
- Familia “κA”; es antagonista de canales de potasio activados por voltaje, con el arreglo de cisteínas CC-C-C-C-C.

Dentro de esta superfamilia, se encuentran las α -conotoxinas, que son las primeras toxinas aisladas del veneno de cono y, los primeros conopéptidos caracterizados bioquímicamente. Inhiben canales iónicos dependientes de ligando, bloqueando los receptores nicotínicos de acetilcolina de músculo esquelético y de tipo neuronal, que son los principales en la transmisión sináptica a lo largo del sistema nervioso central.

1.2.3 Efectos de conotoxinas.

A lo largo de los estudios con conotoxinas, han sido impresionantes los hallazgos de los diversos blancos moleculares que modulan. Esto se debe a la capacidad para discriminar las isoformas de los canales iónicos, estrechamente relacionadas, en términos de homología (Terlau y Olivera, 2004).

Las conotoxinas hasta ahora estudiadas, tienen como blanco molecular cuatro tipos de proteínas de membrana: (Lewis *et al.*, 2012; Campos-Lira, 2014; Robinson y Norton, 2014):

- Canales iónicos activados por voltaje; ω , μ , μO , δ , ι y k conotoxinas.
- Canales iónicos activados por ligando; α - y σ -conotoxinas. conantokinas y con-ikot-ikot.
- Receptores acoplados a proteínas G; ρ -conotoxinas, conopresinas y contulakinas.
- Transportadores de neurotransmisores (χ - conotoxinas).

1.2.3.1 Canales iónicos activados por voltaje.

1.2.3.1.1 Conotoxinas moduladoras de canales de sodio dependientes de voltaje (Nav).

Tienen efecto sobre canales de sodio, causando su inhibición o retrasando la inactivación. Presentan una elevada especificidad y selectividad por los diferentes subtipos de canales, llegando a discriminar entre las diferentes isoformas de los poros permeables al ion sodio ubicados en el músculo, neuronas o corazón (Becerra, 2012).

- μ -conotoxinas.

Contienen de 22 a 25 residuos de aminoácidos y seis residuos de Cys, que forman 3 puentes disulfuro que estabilizan su estructura tridimensional. Inhiben a los canales de Na^+ (Becerra, 2012).

- μO -conotoxinas.

Son péptidos extraordinariamente hidrofóbicos. Inhiben la conductancia del canal de Na^+ , evitando su apertura (Terlau *et al.*, 1996).

- δ -conotoxinas.

Presentan una superficie exterior de varios residuos hidrofóbicos, los cuales pueden estar relacionados con el sitio de unión al canal. Bloquean o provocan un retraso en la inactivación de las corrientes de Na^+ y cambian la activación voltaje dependiente a potenciales más negativos, resultando en una prolongación del potencial de acción (Shon *et al.*, 1994; Leipold *et al.*, 2005).

- I -conotoxinas

Aumentan la apertura del canal de sodio, recorriendo la dependencia de voltaje de la activación a potenciales más hiperpolarizados (Lewis *et al.*, 2012).

1.2.3.1.2 Conotoxinas moduladoras de canales de potasio dependientes de voltaje (*Kv*).

- k -conotoxinas

Bloquean los canales de K^+ activados por voltaje (Terlau *et al.*, 1996; Shon *et al.*, 1998).

1.2.3.1.3 Conotoxinas moduladoras de canales de calcio dependientes de voltaje (*Cav*).

- ω -conotoxinas

Son inhibitoras de canales de calcio, los cuales controlan la liberación de neurotransmisores y la contracción muscular (Randall, 1998; Lewis *et al.*, 2012). Existen múltiples isoformas de ω -conotoxinas, teniendo grandes diferencias en las

secuencias de aminoácidos; la afinidad con que se unen depende de las subunidades presentes en los canales (Mould *et al.*, 2004).

1.2.3.2 Conotoxinas moduladoras de canales iónicos ligando dependientes.

1.2.3.2.1 α -conotoxinas

Son antagonistas específicos de diversos receptores nicotínicos de la acetilcolina (RnACh) de tipo muscular y neuronal, los cuales juegan un papel muy importante en la transmisión sináptica a lo largo del sistema nervioso central (Nicke *et al.*, 2004).

Su alta especificidad se debe a que son antagonistas competitivos, ya que estas toxinas se unen al mismo sitio del ligando natural, actuando de la misma manera que la α -bungarotoxina y el curare (Terlau y Olivera, 2004; López-Vera, 2010).

Las α -conotoxinas se caracterizan por poseer dos pares de residuos de cisteína, con lo cual se han clasificado en tres grupos, basados en el número de residuos existentes entre la segunda y tercera cisteína, y entre la tercera y cuarta cisteína (ejemplo, --C¹C²----C³-----C⁴-, grupo 4/7) (McIntosh *et al.*, 1999; Inserra *et al.*, 2013; Lebbe *et al.*, 2014):

- Subfamilia 4/7; son antagonistas contra RnACh neuronales.
- Subfamilia 3/5; son antagonistas contra RnACh musculares; están asociadas a los caracoles piscívoros.
- Grupo heterogéneo; aquí se encuentran las subfamilias 4/3, 4/4, 4/5, 4/6 que tienen acción antagonista contra los RnACh neuronales.

1.2.3.2.2 σ -conotoxinas.

Inactivan el receptor de serotonina; solo el subtipo 5-HT3 puede ser inactivado a través de antagonismo competitivo (Kandel *et al.*, 2000).

La toxina σ -GVIIA es el único conopeptido, representante de este grupo; tiene 41 residuos de aminoácidos, cinco puentes disulfuro, el extremo carboxilo

terminal amidado y una modificación post-traducciona inusual: 6-bromoptriptofano (López-Vera, 2005; Lewis *et al.*, 2012).

1.2.3.2.3 ψ -conotoxinas.

Son las conotoxinas más grandes en cuanto el número de residuos de aminoácidos y son antagonistas no competitivas de RnACh (Shon *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1998; López-Vera *et al.*, 2004).

1.2.3.2.4 Conantokinas.

Son pequeños péptidos que carecen de cisteínas en su estructura primaria (Nielsen *et al.*, 1994). Cuentan con una potente y selectiva acción inhibitoria del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), un tipo de receptor de glutamato (Olivera y Cruz, 2001; Gowd *et al.*, 2012; Platt *et al.*, 2012).

1.2.3.3 Receptores acoplados a proteínas G.

1.2.3.3.1 ρ -conotoxinas.

Moléculas inhibitorias no competitivas de los receptores α 1-adrenérgicos. Están implicadas en mecanismos de liberación de noradrenalina en los nervios simpáticos (Sharpe *et al.*, 2001; López-Vera, 2005).

1.2.3.3.2 Conopresinas.

Su función biológica es muy similar a la vasopresina y oxitocina. Solo que estas dos presentan una carga positiva adicional (Nielsen *et al.*, 1994). Los receptores de vasopresina y oxitocina se unen a sus agonistas naturales, y a las conopresinas, en un sitio formado por el arreglo de siete dominios transmembranales (Dutertre *et al.*, 2008).

1.2.3.3.3 Contulakinas.

Son agonistas en un receptor de neurotensina (Craig *et al.*, 1999).

1.2.3.4 Transportadores de neurotransmisores.

1.2.3.4.1 χ -conotoxinas.

Inhibidoras del transportador de noradrenalina. Estructuralmente, son muy parecidas a las α -conotoxinas, pero la diferencia radica en la conectividad de puentes disulfuro 1-4 y 2-3 (McIntosh *et al.*, 2000; López-Vera, 2005).

1.3 Acetilcolina y sus receptores.

1.3.1 Neurotransmisores.

La información entre neuronas se transmite a través de una sustancia química denominada neurotransmisor, que se libera en la sinapsis como respuesta a un estímulo específico.

El neurotransmisor secretado actúa en receptores especializados y altamente selectivos para su ligando (Figura 14), que se localizan en la célula postsináptica, lo que provoca cambios en el metabolismo de ésta, modificando su actividad celular (Mc Mahan, 1992; Flores-Soto, 2005).

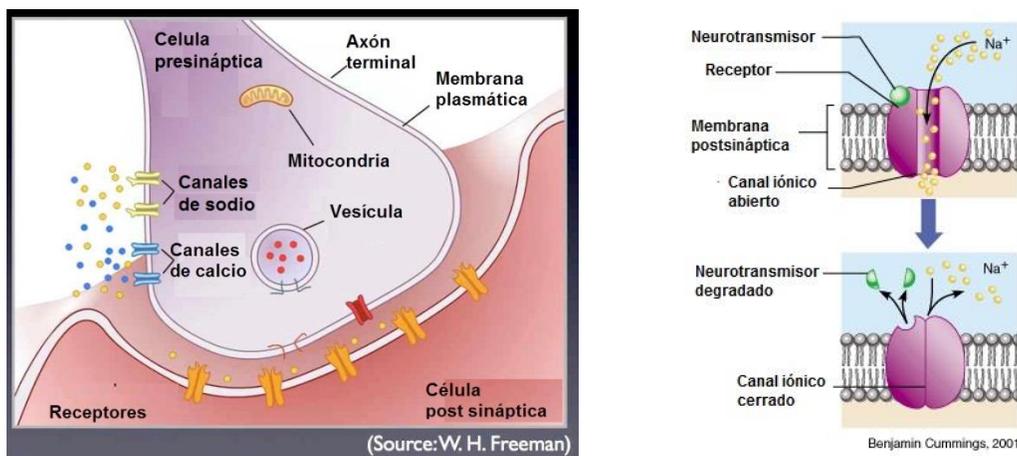


Figura 14. Transmisión eléctrica entre las células. Y apertura de un canal iónico (Imagen modificada de (izquierda) Freeman, 2016; (derecha) Cunnings, 2001).

1.3.2 Acetilcolina.

Langley y Dale habían postulado el concepto de neurotransmisor químico a principios del siglo XX, pero fue Otto Loewi quien, en 1921 demostró que el nervio vago liberaba una sustancia que disminuía los latidos del corazón de la rana, la

describió como "actividad humoral" y sus efectos se reflejaban en otros tejidos (Flores-Soto, 2005; Criado, 2011).

Esta sustancia fue caracterizada químicamente en 1929, y se le denominó acetilcolina, pues su estructura química resulta ser de gran simplicidad, un éster del ácido acético y la colina, como se puede apreciar en la Figura 15 (Flores-Soto, 2005; Díaz-Hernández *et al.* 2000).

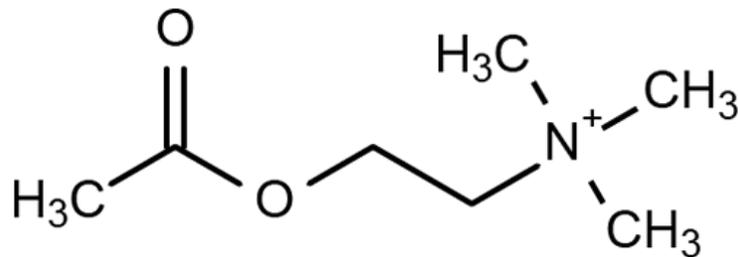


Figura 15. Molécula de acetilcolina (chemistry.about.com).

La acetilcolina se sintetiza a partir de la colina, que se acumula en las neuronas colinérgicas mediante una reacción con la acetil CoA y bajo la influencia enzimática de la colina acetiltransferasa (CAT) (Mc Mahan, 1992; Flores-Soto, 2005).

La CAT se localiza en el sistema nervioso central (SNC), específicamente donde tiene lugar la síntesis de acetilcolina. La mayor actividad se encuentra en el núcleo interpeduncular, el núcleo caudado, la retina, el epitelio corneal, el hipocampo, la corteza cerebral y las raíces ventrales de la médula espinal; se sintetiza en el soma neuronal y viaja a lo largo del axón, posiblemente unida a los neurotúbulos, que actúan como transportadores; sin embargo, también se ha señalado la síntesis de esta proteína en los axones preterminales y botones terminales (Massoulie, 1982; Loffelhotz, 1995).

Estudios de Claude Bernard, junto con Bernhard Katz, John Eccles y Stephen Kuffler, demostraron que la interacción de la acetilcolina con un receptor

de membrana post-sináptica provocaba un incremento en la conductancia de la membrana a cationes, lo que causaba la despolarización de la membrana de la célula muscular, dando como resultado la contracción muscular (Criado, 2011).

1.3.3 Receptor de Acetilcolina (RACH).

El incremento de este estudio, se dio con los peces eléctricos *Torpedo marmorata*, cuyo órgano eléctrico puede generar potenciales de 50 V y una intensidad de corriente de 50 A (Figura 16). Estos tienen una pila de células llamadas electrocitos, que son células musculares que perdieron su capacidad de producir contracciones, pero no su excitabilidad (Criado, 2011).

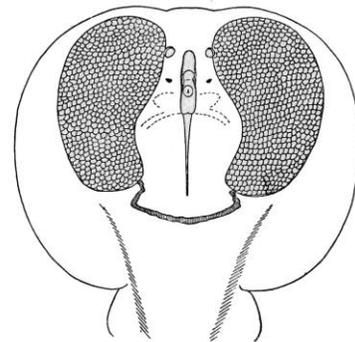


Figura 16. Pez Torpedo (izquierda) y diagrama del órgano eléctrico (derecha) (elasmodiver.com; Roule, 1935).

Así, el receptor de acetilcolina resultó ser muy abundante en las células del órgano eléctrico, aproximadamente 1,000 veces más que en el musculo estriado; esto facilitó su aislamiento y purificación, convirtiéndose en el primer receptor de neurotransmisores en ser identificado y purificado, mediante cromatografía de afinidad, usando α -bungarotoxina. También, el primero en ser caracterizado bioquímica y electrofisiológicamente.

Se descubrió que se expresa en varias regiones del sistema nervioso central y periférico, con un rol mayor en la transmisión neuromuscular. Se presenta también en varios tejidos no neuronales, como la glía, células sanguíneas, células del sistema digestivo, y células pulmonares (Flores-Soto, 2005; Criado, 2011).

En otros estudios realizados, Henry Dale clasificó a los receptores de acetilcolina en dos grupos, dependiendo de los efectos farmacológicos por los alcaloides muscarina y nicotina (Flores-Soto, 2005):

- Receptor muscarínico; respuestas prolongadas, resultado de la interacción con segundo mensajero a través de proteínas G. Está presente en diversos órganos y tejidos en la periferia (tejido cardíaco, músculo liso y glándulas exocrinas), y dentro del sistema nervioso central. En el cerebro, los receptores muscarínicos están presentes en terminales sinápticas, regulando la liberación de neurotransmisores.
- Receptor nicotínico; respuesta rápida y breve. Se une al receptor y provoca cambios en su estructura que conducen a la apertura de canales iónicos, poseen, al menos, dos sitios de unión para el neurotransmisor, y contienen el canal iónico, responsable de transmitir la señal hacia el interior de la célula.

1.3.3.1 Receptor nicotínico de acetilcolina (RnACh).

Existen dos tipos de RnACh en vertebrados: los de tipo muscular, que se encuentran en la parte post-sináptica en la placa neuromuscular; y los de tipo neuronal, presentes tanto pre- como postsinápticamente en el sistema nervioso periférico y central (Chargeux *et al.*, 1984; Nirthanan, 2004). Se sabe que ambos tipos están constituidos por cinco subunidades homólogas, formando un poro central, por el cual conducen cationes, cuando se une su ligando natural (ACh).

En el caso de los receptores musculares estas subunidades son $(\alpha 1)2\beta 1\gamma\delta$ en músculo fetal, con la sustitución de la subunidad γ por la subunidad ε en el

adulto (($\alpha 1$)₂ $\beta 1\varepsilon\delta$) (Figura 17 izquierda). A diferencia de éstos, los receptores neuronales sólo están constituidos por combinaciones de subunidades α y β , siendo en la subunidad α o en la interfase con las subunidades β , donde se encuentra el sitio de unión de ACh y con ello, el sitio de activación del canal. Sin embargo, nueve subunidades α ($\alpha 2$ – $\alpha 10$), y tres subunidades β ($\beta 2$ – $\beta 4$), han sido clonadas (Figura 17 derecha). Por lo que diferentes subunidades de RnACh, pueden combinarse de varias maneras, con propiedades farmacológicas y electrofisiológicas distintas (López-Vera, 2010).

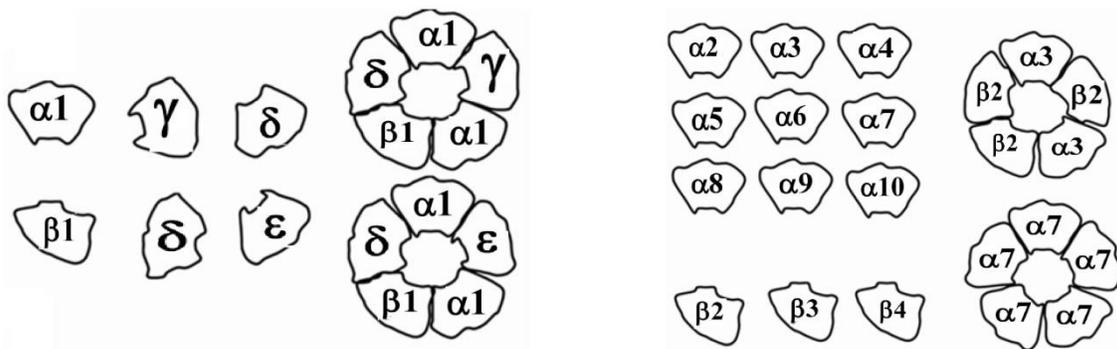


Figura 17. Subunidades y combinación del RnACh. Receptor nicotínico muscular (izquierda), Receptores nicotínicos neuronales (derecha) (Imagen modificada de López-Vera, 2010).

Todas las subunidades son homólogas y su organización estructural es similar, compuesta por:

- Un dominio N-terminal hidrofílico orientado hacia el exterior celular, constituido por unos 200 aminoácidos, que contienen los elementos importantes del sitio de unión al agonista.
- Cuatro segmentos hidrofóbicos (M1-M4), que atraviesan la membrana como estructuras alfa helicoidales.

- Dominios hidrofílicos uniendo los anteriores, que son poco extensos, a excepción del que une los fragmentos M3 y M4, que puede tener entre 50 y 250 aminoácidos; está orientado intracelularmente y es la única zona de las subunidades que no tiene identidad de secuencia considerable.
- Un segmento corto C-terminal extracelular.

2 Justificación.

Es un hecho que un grupo particular de conotoxinas, las llamadas α -conotoxinas, afectan de manera selectiva a diferentes subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina.

Este grupo de conotoxinas, se encuentran preferentemente en especies que se alimentan de peces. Sin embargo, empiezan a caracterizarse otras conotoxinas, con efecto sobre este tipo de receptores de especies que se alimentan de gusanos. Dado que la mayoría de las especies de caracoles que habitan nuestras costas son vermívoras, es posible encontrar otro grupo de conotoxinas, dada la gran variedad de toxinas (hasta 200) que puede producir un caracol.

3 Hipótesis.

Existirán toxinas que modulen los receptores nicotínicos de acetilcolina en todos los venenos de las especies de *Conus*, como ejemplo de ello, *C. fergusonii*.

4 Objetivos.

4.1 Objetivo General.

- Determinar qué conotoxinas del veneno de *C. fergusonii* modulan a los receptores de acetilcolina.

4.2 Objetivos Particulares.

- Identificar la presencia de conotoxinas con efecto sobre distintos subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina en los extractos del veneno de *C. fergusonii*.
- Caracterizar bioquímicamente (estructura primaria) la(s) toxina(s) con actividad sobre subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina.
- Determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de la(s) toxina(s) caracterizadas.

5 Material y métodos.

5.1 Material biológico.

Se utilizaron cuatro organismos de la especie *C. fergusonii* colectados en las costas de Mazatlán, Sinaloa (código GC/0399 del inventario del laboratorio) (Figura 18).



Figura 18. Concha del caracol *Conus fergusonii*. Organismo ocupado durante este proyecto (Fotografía: Elaboración propia).

5.2 Disección del caracol.

Para obtener el aparato venenoso del caracol fue necesario descongelarlo. Una vez así, se llevó a cabo su disección sobre una cama de hielo, para evitar la desnaturalización de los componentes del veneno (Figura 19).

Obtenidos los conductos venenosos, se colocaron en solución de extracción: acetonitrilo (ACN) al 40% y ácido trifluoroacético (TFA) al 2%. Se congelaron a -20°C , hasta su fraccionamiento.



Figura 19. Disección de *C. fergusonii*. Dentro del círculo (izquierda) se aprecia el conducto venenoso en el organismo; a la derecha se observa cómo fue aislado para su uso (Fotografías: Elaboración propia).

5.3 Obtención del extracto crudo de veneno.

Para la obtención del veneno, los conductos venenosos se colocaron en 10 mL de solución de extracción, y se maceraron con el homogenizador *Tissue Tearor* 985370 de BioSpec Products, en la velocidad seis, hasta que se observó que el tejido se había disgregado en su totalidad.

Posteriormente, el extracto se pasó a tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 12,000 g, durante 20 minutos. Se conservó el sobrenadante (como la fracción rica en péptidos), decantándolo en tubos Eppendorf de 2 mL.

5.4 Cuantificación de proteínas.

Se realizó la cuantificación de proteínas totales en un *Nanodrop 2000* de Thermo Scientific mediante lecturas a una longitud de onda de 280 nm.

5.5 Fraccionamiento del veneno por RP-HPLC.

Los componentes del veneno se fraccionaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, conocida como RP-HPLC por sus siglas en inglés (Reverse phase- High phase liquid chromatography), utilizando una columna analítica de sílica *Vydac C18* (4.6 mm x 250 mm, tamaño de partícula 5

μm , 300 Armstrong tamaño de poro), provista con una precolumna de silica (218TP54, 4.6 x 10 mm, 5 μm de tamaño de partícula). El gradiente de elusión fue de 5-100% de solución B en 95 min con un flujo de 1 mL/min. La solución A consistió en TFA al 0.1% y H₂O grado HPLC, mientras que la solución B estuvo compuesta por TFA al 0.085% y ACN al 90%. Los péptidos fueron monitoreados a través de un detector de UV a dos longitudes de onda: 220 y 280 nm.

5.6 Propagación de subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina.

La propagación de los plásmidos correspondientes a las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\beta 2$, se realizó mediante la transformación de 100 μL de células competentes de la cepa XL1 Blue de *E. coli* con 900 μL de medio SOC (Tryptona, Extracto de levadura, NaCl 8 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 2 M y glucosa 20 mM; pH 7 ajustado con 1 N NaOH).

La selección se hizo mediante la siembra de las bacterias en cajas de Petri con medio LB agar/ampicilina (Tryptona, Extracto de levadura, NaCl, Agar agar (pH 7.2 ajustado con 10 N NaOH)/ampicilina 80 mg/L), y se dejó incubar toda la noche a 37°C.

Posteriormente, se tomó una colonia de bacterias y se sembró en tubos Falcon de 15 mL con 3 mL de medio LB líquido/ampicilina (Tryptona, Extracto de levadura, NaCl/ampicilina 80 mg/L (pH 7.2 ajustado con 10 N NaOH), y se dejó incubar toda la noche a 37°C.

La obtención y purificación del DNA de los cultivos se realizó con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Su cuantificación fue mediante el sistema *Nanodrop 2000*.

El cual, para la cuantificación de ácidos nucleicos, utiliza la ecuación modificada de Beer-Lambert para utilizar un factor con unidades de ng-cm / μL . La ecuación modificada es la siguiente (Thermo Fisher, 2009):

$$C = (A \cdot e) / b$$

Donde:

C= La concentración de ácido nucleico en ng/ μ L.

A= La absorbancia en AU.

E= El coeficiente de extinción dependiente de la longitud de onda en ng-cm/ μ L.

b= La longitud del trayecto en cm.

Los coeficientes de extinción generalmente aceptados para los ácidos nucleicos son:

- DNA de doble hebra: 50 ng-cm/ μ L.
- ARN: 40 ng-cm/ μ L.

5.7 Transcripción in vitro.

Previo a la transcripción, se llevó a cabo la linearización del cDNA de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 2$, utilizando la enzima Not I (la subunidad $\alpha 7$ no se linearizó). La purificación se hizo con el kit EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (Bio Basic).

Para la transcripción de todas las subunidades se utilizaron 2 μ L de la enzima T7 Ambion mMessage mMachine, bajo el protocolo del mMessage mMachine Kit (Applied Biosystem). La purificación se realizó con el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN).

La cuantificación del RNA fue mediante un *Nanodrop 2000* bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

5.8 Obtención de ovocitos.

La obtención de los ovocitos se realizó mediante microcirugías a ranas *Xenopus laevis*. Estas fueron puestas en tricaina metanosulfonato (MS-222) al 2% durante aproximadamente 20 min, hasta que dejó de tener movimiento.

La incisión se realizó en la parte ventral de la rana y fue menor a un centímetro (Figura 20 izquierda y central). Al extraer los ovocitos (Figura 20 derecha), fueron puestos en medio OR-2 (NaCl 82.5 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂

6H₂O 1 mM, Hepes 5 mM; pH 7.5 ajustado con NaOH 10 N), donde se lavó numerosas veces para eliminar impurezas.

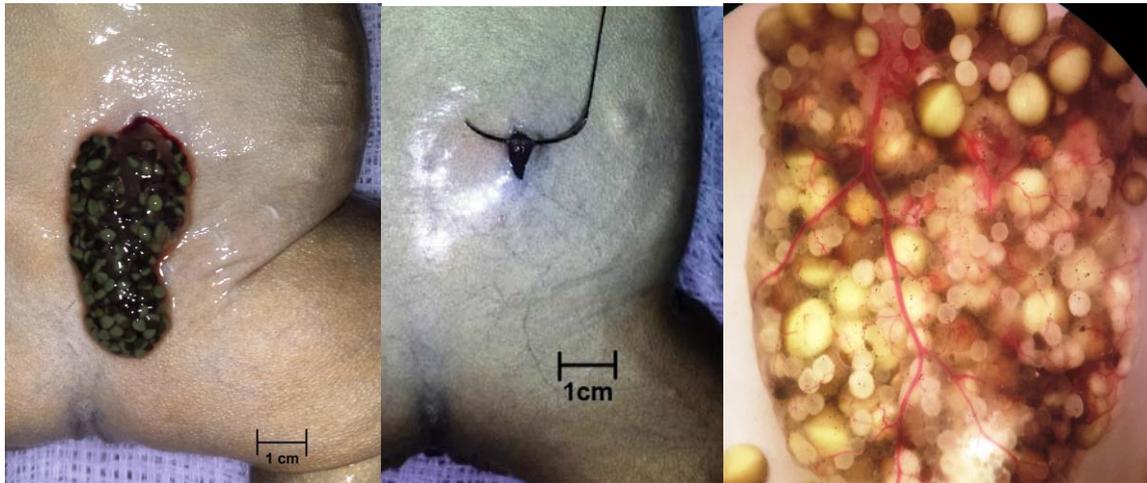


Figura 20. Microcirugía de *X. laevis*. Extracción de los ovocitos (izquierda) puede apreciarse que estos se obtienen como un pequeño saco; inicio de la sutura del musculo (centro); ovocitos recién extraídos vistos al microscopio (derecha) (Fotografías: Elaboración propia).

Posteriormente, se añadió colagenasa (1.15 mg/mL) al medio OR-2 y se dejó en agitación por aproximadamente 40 min, hasta que el saco se disgregó en su totalidad. Luego, los ovocitos se retiraron de la colagenasa y volvieron a lavarse con OR-2 hasta que el medio dejó de observarse turbio.

La selección de ovocitos se realizó de manera manual, escogiendo únicamente aquellos que se encontraban en los estadios de desarrollo V y VII (Figura 21). Estos se colocaron en solución extracelular cuya concentración milimolar es: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 5 HEPES (pH 7.1-7.5 ajustado con 10 N NaOH) añadido con Penicilina/Estreptomicina (100U/100µg)/mL (Sigma) y gentamicina 100 µg/mL.

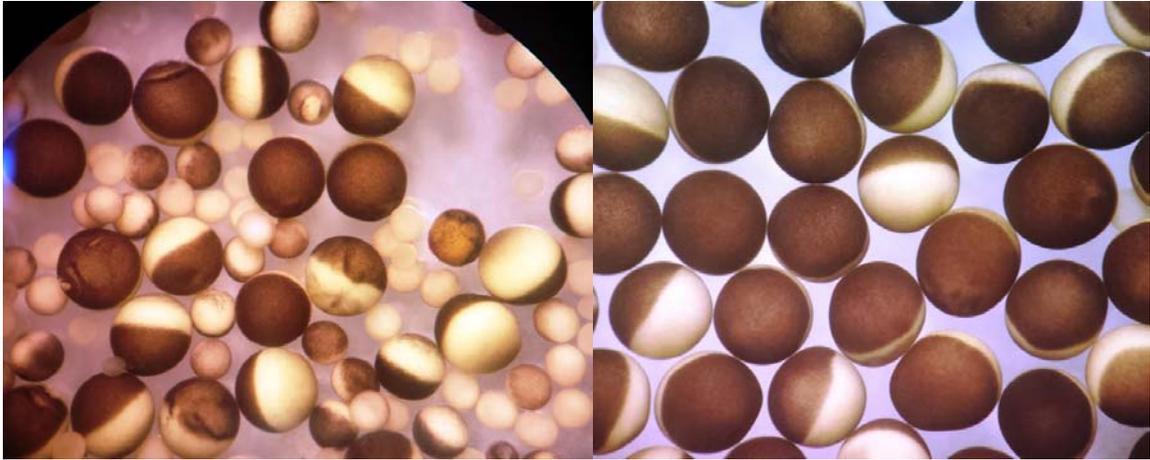


Figura 21. Selección de ovocitos de *X. laevis*. Ovocitos resultantes del lavado posterior a la colagenasa; se puede observar ovocitos en mal estado y en diferentes estadios de desarrollo (izquierda) y ovocitos en estadio V y VII después de la selección manual (derecha) (Fotografías: Elaboración propia).

5.9 Expresión heteróloga.

La expresión de receptores nicotínicos de acetilcolina se realizó en los ovocitos aislados en estadio de desarrollo V y VII, mediante la inyección al núcleo de 13 ng de cDNA del subtipo $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ (Figura 22) y la inyección en citoplasma de 30 y 50 ng de RNAm de los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ de RnACh respectivamente; con ayuda de un nanoinyector *Nanoliter 2000* (World Precision Instruments).

La expresión se evaluó de 3 a 4 días posteriores a la inyección.



Figura 22. Inyección de material genético. Se aprecia la inyección cDNA al núcleo del ovocito de *X. laevis* (Fotografía: Elaboración propia).

5.10 Ensayos electrofisiológicos.

Para confirmar la expresión de los RnACh se llevó a cabo la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje con dos electrodos en ovocitos de *X. laevis*, fijando el voltaje a -70 mV y perfundiendo éstos con una solución extracelular cuyo contenido en concentración milimolar es: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 5 HEPES (pH 7.1-7.5 ajustado con 10 N NaOH).

Las corrientes se generaron con una concentración de 200 µM de acetilcolina para α7; de 100 µM para α4β2 y de 1 µM para el subtipo (α1)₂β1εδ.



Figura 23. Técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. Cámara de registro con el ovocito (izquierda); ovocito visto al microscopio durante los registros electrofisiológicos (derecha) (Fotografías: Elaboración propia).

5.11 Determinación de masa molecular.

Para el análisis por espectrometría de masas, las muestras fueron enviadas al Laboratorio Universitario de Proteómica del IBt/UNAM.

Las muestras fueron procesadas en un sistema LC-MS (Cromatografía líquida/Espectrometría de masas) compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co), acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621. Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos, con trampa de iones, y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Transformada de Fourier), en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z. Este tipo de calibración, permite determinaciones de masas moleculares con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo “online” se utilizó un sistema isocrático de 50-50% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 10 min utilizando una aguja capilar hecha en casa (ID 0.75 μm y 10 cm largo). El flujo del sistema LC fue de 200 nL/min.

La masa molecular de cada muestra, se obtuvo mediante el procesamiento de datos a través del algoritmo de Desconvolución automática (Xtract rawfile) y manual.

5.12 Determinación de la secuencia.

Las muestras para la secuenciación bajo el principio de la degradación de Edman, fueron enviadas al laboratorio del Dr. Lourival Possani Postay del Instituto de Biotecnología (IBt), Cuernavaca.

La secuenciación automatizada utiliza, entre otros, el reactivo de Edman: fenilisotiocianato (PITC); la reacción libera, en cada ciclo, el aminoácido amino-terminal como un derivado de la feniltiohidantoína (PTH), el cual se identifica mediante RP-HPLC por su tiempo de retención y deja el péptido con un residuo menos en el extremo amino (Flores-Torres, 2009).

Los siguientes procesos, se repiten el número de veces deseado:

- Acomplamiento; reacción del PITC con el grupo amino del residuo N-terminal.
- Corte; ruptura del enlace peptídico entre el residuo N-terminal

modificado con PITC y el siguiente con formación de anilinothiazolinona (ATZ) del residuo N-terminal liberado.

- Identificación; extracción de la ATZ y su conversión a PTH e identificación cromatográfica.

La experiencia ha demostrado que, en general, es posible identificar 50 residuos partiendo de una muestra pura en buena cantidad. Normalmente se vigila el proceso de secuenciación y se detiene cuando varios PTHs aumentan en proporción similar en varios ciclos consecutivos, lo cual impide la interpretación de resultados (Flores-Torres, 2009).

6 Resultados.

6.1 Cuantificación de extracto crudo del veneno.

Una vez obtenido el sobrenadante de veneno crudo de *C. fergusonii*, se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL y realizó la cuantificación de proteínas. La concentración de proteína total del veneno obtenida a partir de los cuatro conductos venenos, se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de veneno obtenida de *Conus fergusonii*.

Muestra	Concentración de proteína (mg/mL)
Tubo 1	37.1
Tubo 2	38.1
Tubo 3	38.7
Tubo 4	35.6

6.2 Fraccionamiento del veneno.

Se realizaron 10 corridas en el RP-HPLC utilizando 10 mg de extracto de veneno en cada una de ellas.

Las fracciones del veneno se colectaron por tiempo de 5 min (salvo las primeras dos, que correspondieron a los minutos 0-7 y 7-10). Como resultado de este fraccionamiento, se obtuvieron un total de 12 fracciones, que fueron numeradas del 1 al 12, y que están representadas en la Figura 24.

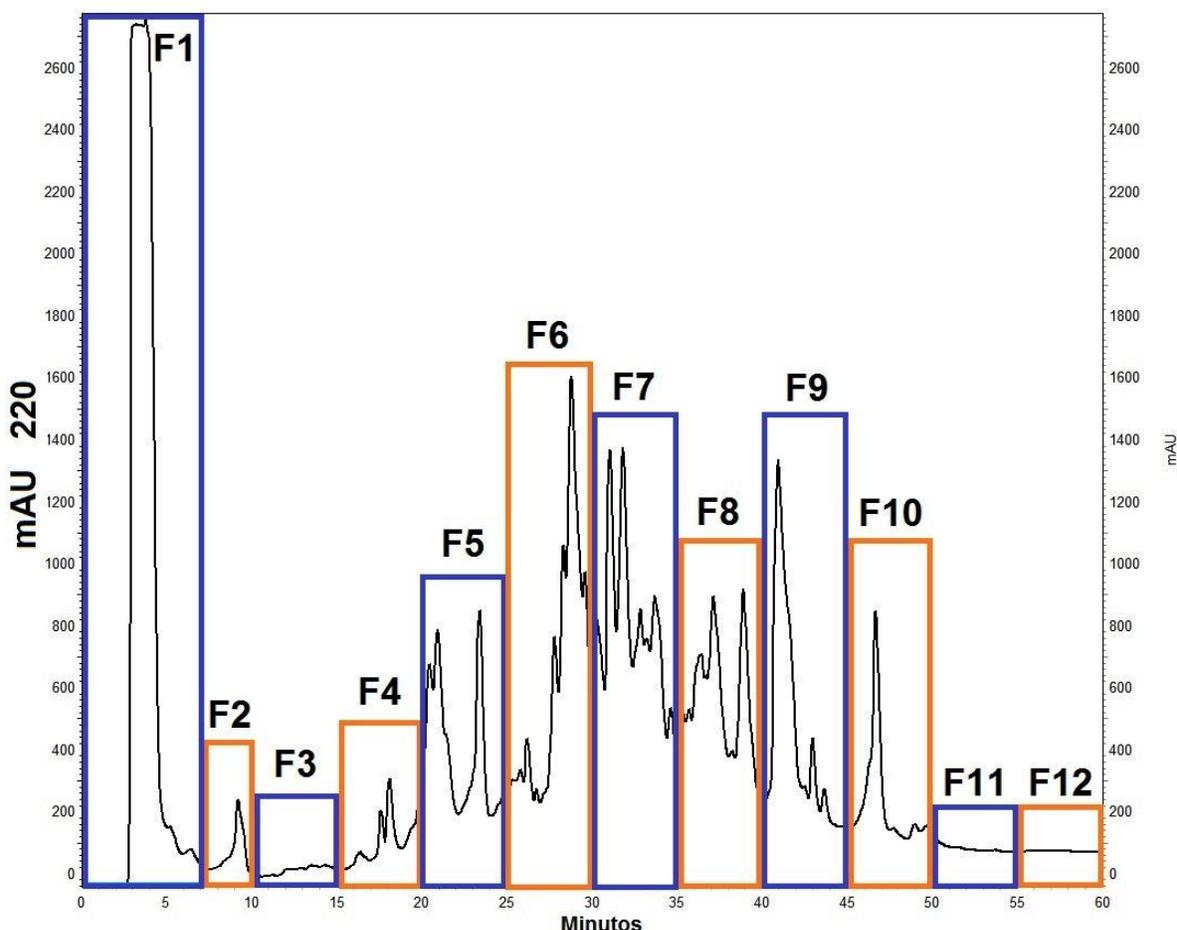


Figura 24. Perfil cromatográfico del veneno *Conus fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Se desarrolló un gradiente lineal que va de 5 a 100% de solución B en 95 min con un flujo de 1 mL/min. Los recuadros en color indican el tiempo al cual fueron colectadas cada una de las fracciones, enumeradas de F1 a F12.

6.3 Propagación y transcripción de las subunidades de los RnACh.

Se logró la propagación de diversas subunidades de RnACh. En la Tabla 2 se muestra la cantidad de cDNA obtenido de la propagación y, la cantidad de RNAm resultante de la transcripción.

En el caso de la subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 10$, no se llevó a cabo la propagación, pues se contaba con material suficiente en el laboratorio. Sin embargo, la transcripción sí fue realizada.

Tabla 2. Cantidad (ng/ μ L) de cDNA y RNAm obtenido a partir de la propagación y transcripción de subunidades de RnACh.

Receptor	Cantidad de cDNA (ng/ μ L)	Cantidad de RNAm (ng/ μ L)
$\alpha 3$	ND	1200
$\alpha 4$	1000	335
$\alpha 7$	988	1068
$\alpha 9$	665	243
$\alpha 10$	ND	920
$\beta 2$	699	924

ND= No determinado.

6.4 Evaluación electrofisiológica de las fracciones.

En un inicio, se realizó la expresión de los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ de RnACh en ovocitos de *X. laevis*. (En el caso del subtipo $\alpha 7$, la inhibición se calculó comparando la amplitud de las corrientes entre el primer pulso de ACh después de la aplicación de ND96 (corriente control), y el primer pulso con la fracción o subfracción correspondiente a evaluar).

Una vez confirmada la expresión de estos receptores, se probó 1 μ g del veneno de cada fracción en la cámara de registro, por un tiempo de 5 minutos (con excepción de la fracción 1 (F1), la cual corresponde a la fracción no retenida). Todas ellas se hicieron por triplicado.

De estos ensayos, para el subtipo $\alpha 7$, se obtuvo actividad inhibitoria e irreversible por parte de la fracción 4 (Figura 25) y fracción 5 (Figura 26). Del lado

izquierdo de las imágenes, se pueden observar las corrientes control, mientras que del lado derecho, se ve el resultado de aplicar por 5min, la fracción de veneno correspondiente.

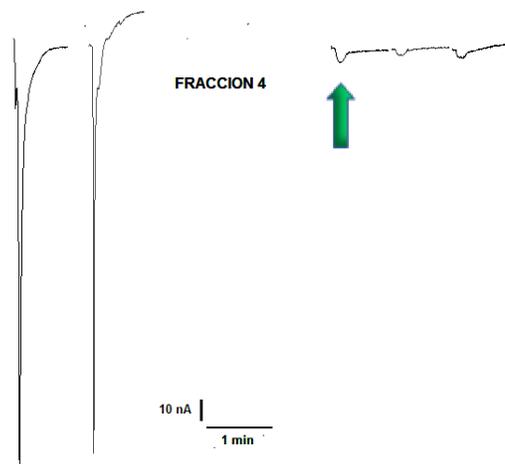


Figura 25. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la fracción 4.

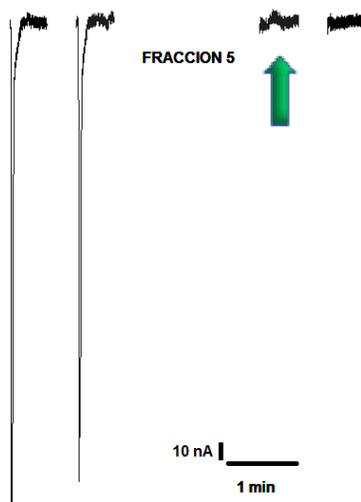


Figura 26. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la fracción 5.

Para el subtipo $\alpha 4\beta 2$, la fracción 4 (Figura 27), fracción 5 (Figura 28) y fracción 6 (Figura 29) mostraron actividad inhibitoria pero reversible, pues conforme pasaba el tiempo, las corrientes se iban incrementando hasta alcanzar los valores iniciales.

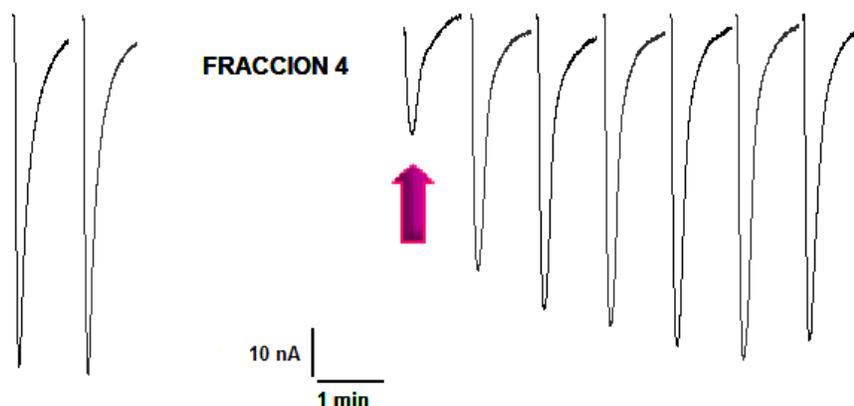


Figura 27. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F4. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la fracción 4.

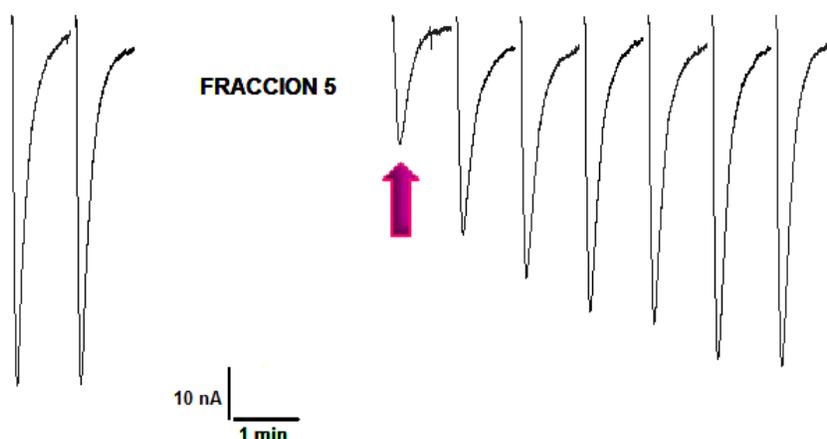


Figura 28. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F5. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la fracción 5.

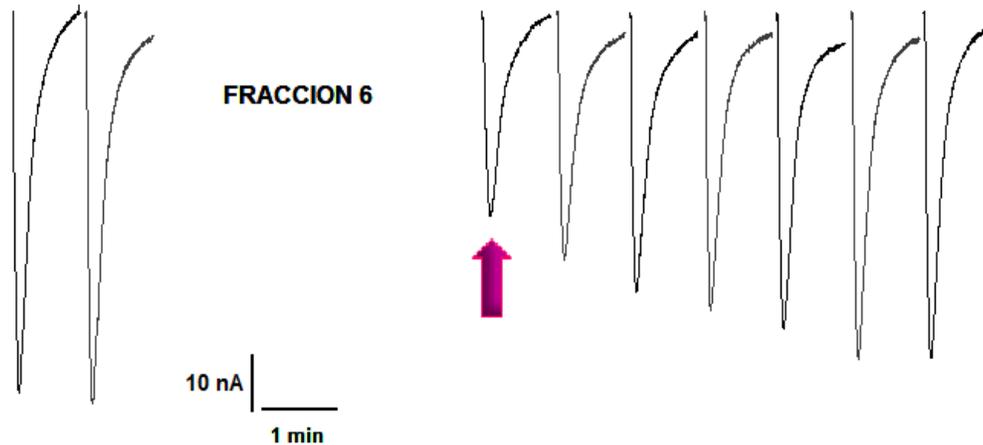


Figura 29. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F6. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la fracción 6.

Debido a que las pruebas se hicieron por triplicado, se obtuvo el promedio del porcentaje de inhibición resultante de los tres ensayos registrados para cada una de las 12 fracciones probadas en los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ de RnACh; éste se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las fracciones de *C. fergusonii* para los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ de RnACh.

Fracción	Porcentaje de inhibición en $\alpha 7$	Porcentaje de inhibición en $\alpha 4\beta 2$
F1	ND	ND
F2	X	X
F3	X	X
F4	100	46
F5	100	62
F6	X	40
F7	X	X
F8	X	X
F9	X	X
F10	X	X
F11	X	X
F12	X	X

X= no se registró modulación de las corrientes; ND = no determinado.

6.5 Subfraccionamiento del veneno.

Una vez encontradas las fracciones con actividad sobre los RnACh (F4, F5 y F6). Se realizó el subfraccionamiento de las tres fracciones para obtener componentes más puros, e identificar el componente inhibitorio. Para ello, el veneno fue colectado por picos.

Para la fracción F4, se realizó una corrida en el RP-HPLC cuyo gradiente de elusión fue 15 a 30% de solución B en 45 min con un flujo de 1 mL/min.

Como resultado del subfraccionamiento de F4, se obtuvo el siguiente cromatograma (Figura 30) donde se aprecian cuatro señales mayoritarias.

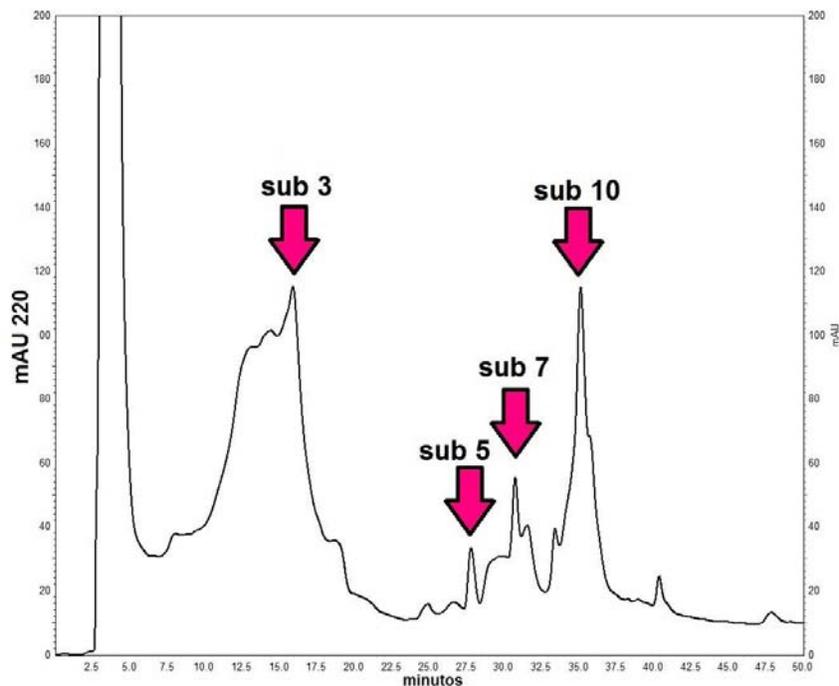


Figura 30. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F4 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Se utilizó un gradiente lineal que va de 15 a 30% de solución B en 45 min con un flujo de 1 mL/min. Las flechas indican las señales mayoritarias, numeradas según la colecta realizada.

Para la fracción F5, se realizó una corrida en el RP-HPLC cuyo gradiente de elusión fue 20% a 35% de solución B en 45 min con un flujo de 1 mL/min.

Como resultado del subfraccionamiento de F5, se obtuvo el siguiente cromatograma (Figura 31) donde se aprecian cinco señales mayoritarias.

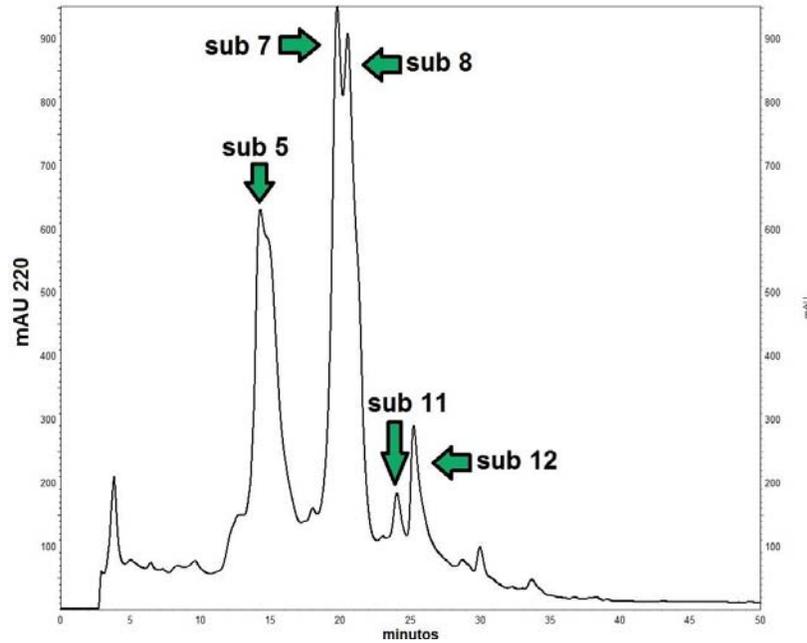


Figura 31. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F5 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Se utilizó un gradiente lineal que va de 20 a 35% de solución B en 45 min con un flujo de 1 mL/min. Las flechas indican las señales mayoritarias, numeradas según la colecta realizada.

Para la fracción F6, se realizaron dos corridas en el RP-HPLC cuyo gradiente de elusión fue 25% a 40% de solución B en 45 min con un flujo de 1 mL/min.

Como resultado del subfraccionamiento de F6, se obtuvo el siguiente cromatograma (Figura 32) donde se aprecian cinco señales mayoritarias.

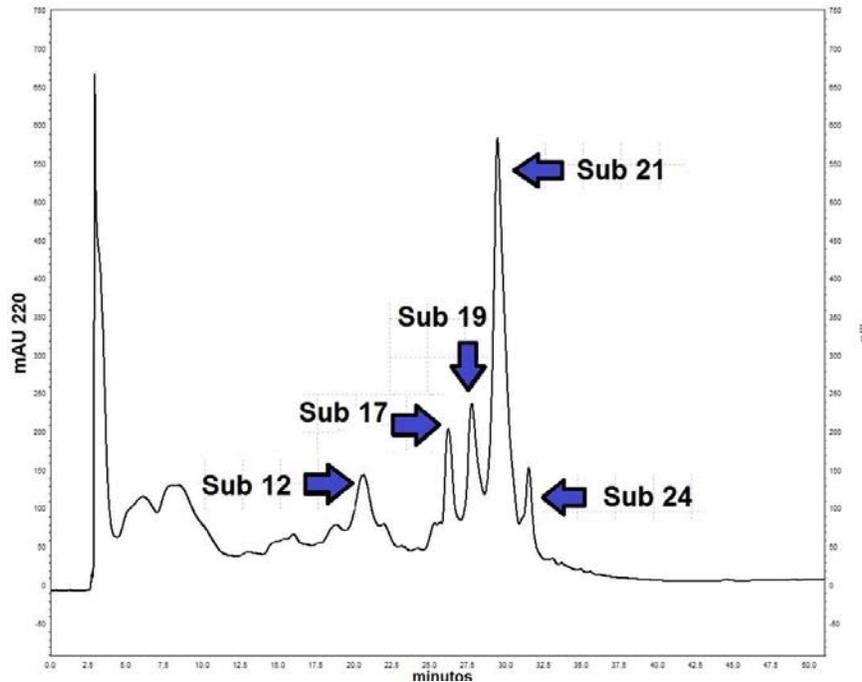


Figura 32. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F6 del veneno de *C. fergusonii* monitoreado a una longitud de onda de 220 nm. Se utilizó un gradiente lineal que va de 25 a 40% de solución B en 45 min con un flujo de 1mL/min. Las flechas indican las señales mayoritarias, numeradas según la colecta realizada.

6.6 Evaluación electrofisiológica de las subfracciones

Se realizó la expresión de los subtipos neuronales α_7 , $\alpha_4\beta_2$ y se incluyó el subtipo muscular adulto $(\alpha_1)_2\beta_1\epsilon\delta$ de RnACh (para observar la especificidad de la toxina), en ovocitos de *X. laevis*.

Confirmada la expresión de estos receptores se probó 1 μg del veneno de cada subfracción (las señales mayoritarias mencionadas anteriormente) en la cámara de registro por un tiempo de 5 min.

La evaluación de las subfracciones de F6, solo se realizó en el subtipo $\alpha_4\beta_2$ pues es el único en el que había mostrado actividad anteriormente.

6.6.1 Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de F4

El promedio del porcentaje de inhibición de tres ensayos para las subfracciones de F4 sobre los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ de RnACh se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentajes de inhibición registrados para los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ de RnACh, de acuerdo a la subfracción de F4 probada. Nota: en el caso del subtipo muscular solo se ensayó dos veces vez.

Subfracción F4	Porcentaje de inhibición en $\alpha 7$	Porcentaje de inhibición en $\alpha 4\beta 2$	Porcentaje de inhibición en $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$
Sub 3	19	0	0
Sub 5	23	0	33
Sub 7	0	0	0
Sub 10	96	0	0

Como se aprecia en la tabla anterior, tres de las subfracciones de F4 presentaron actividad inhibitoria para el subtipo $\alpha 7$ de RnACh. En los tres casos la inhibición fue irreversible como se ejemplifica para Sub3 en la Figura 33, Sub5 en la Figura 34 y Sub10 en la Figura 35, siendo ésta la que presentó el mayor porcentaje de inhibición. Del lado izquierdo de las imágenes, se pueden observar las corrientes control, mientras que del lado derecho, se ve el resultado de aplicar la subfracción de veneno.

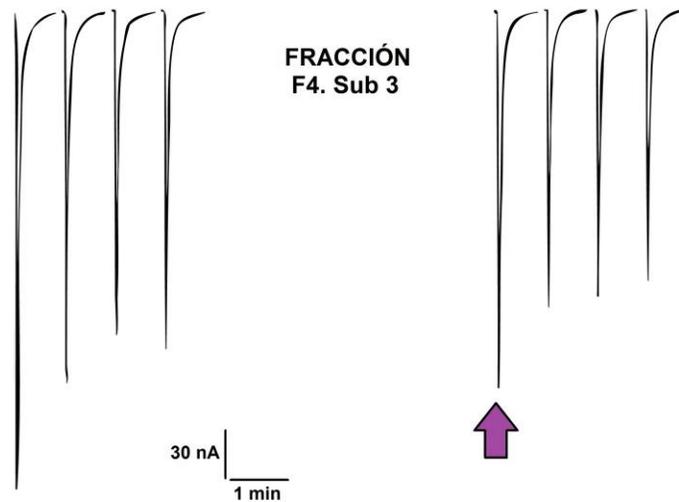


Figura 33. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4. Sub3. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F4. Sub3.

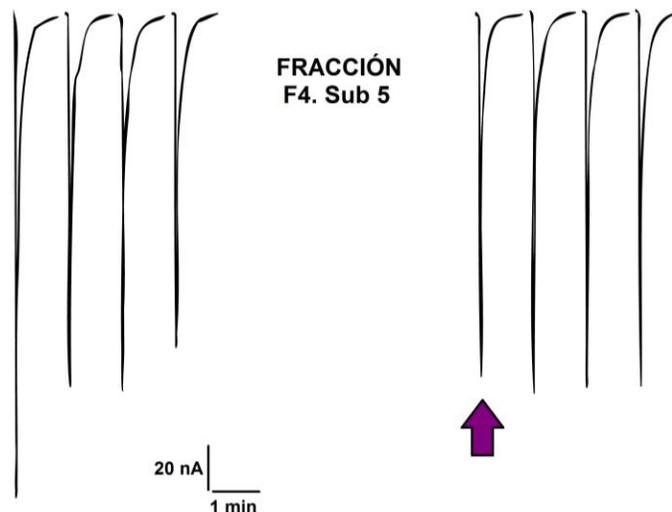


Figura 34. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4. Sub5. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F4. Sub5.

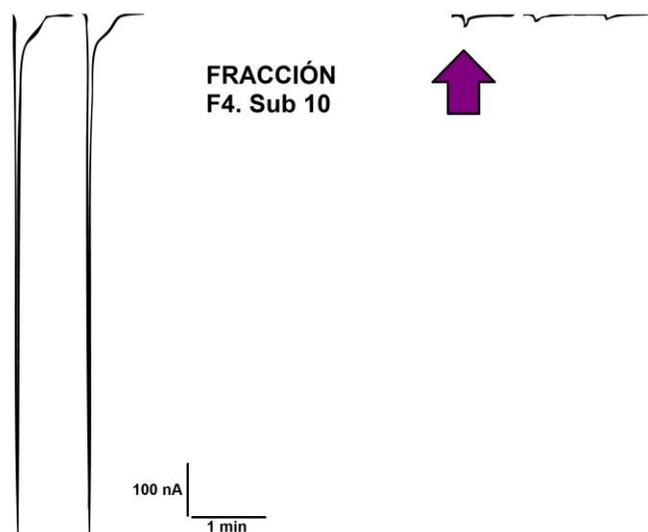


Figura 35. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F4. Sub10. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F4. Sub10.

En el caso del RnACh $\alpha 4\beta 2$ no hubo inhibición por parte de ninguna de las subfracciones y, para el receptor $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$, solo una de las subfracciones, la F4. Sub5 presentó actividad inhibitoria (Figura 36). Contrario a lo observado en el subtipo $\alpha 7$, la inhibición fue reversible, y se recuperó rápidamente el valor inicial de la corriente.

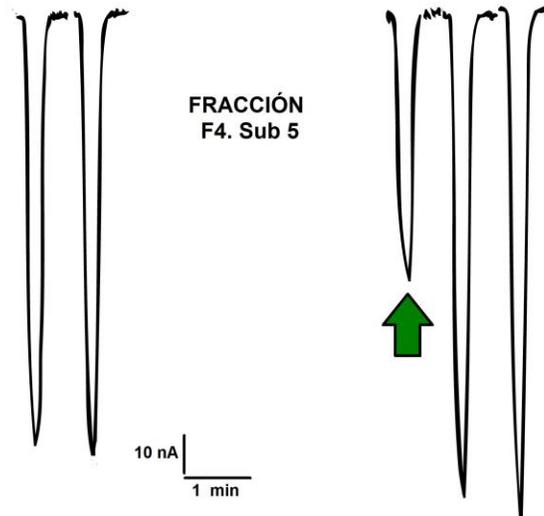


Figura 36. Evaluación de la respuesta del RnACh $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ ante la incubación con F4. Sub5. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5min de incubación con la subfracción F4. Sub5.

6.6.2 Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de F5

En la Tabla 5 se muestra el promedio del porcentaje de inhibición de tres ensayos para la subfracción F5.

Tabla 5. Porcentajes de inhibición registrados para los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ de RnACh, de acuerdo a la subfracción de F5 probada.

Subfracción F5	Porcentaje de inhibición en $\alpha 7$	Porcentaje de inhibición en $\alpha 4\beta 2$	Porcentaje de inhibición en $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$
Sub 5	0	0	0
Sub 7	98	23	0
Sub 8	96	0	0
Sub 11	100	36	0
Sub 12	97	0	0

Como se ve en la tabla anterior, cuatro de las subfracciones de F5 presentaron actividad inhibitoria para el subtipo $\alpha 7$ de RnACh. En los cuatro casos la inhibición fue irreversible, y mayor al 95%. Esto se aprecia más claramente para Sub7 en la Figura 37, Sub8 en la Figura 38, Sub11 en la Figura 39 y Sub12 Figura 40. Del lado izquierdo de las imágenes, se pueden observar las corrientes control, mientras que del lado derecho, se ve el resultado de aplicar la subfracción de veneno.

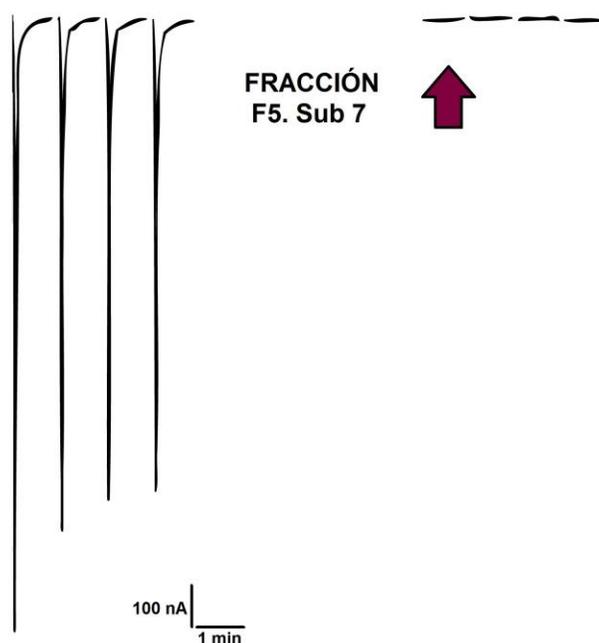


Figura 37. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub7. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F5. Sub7.

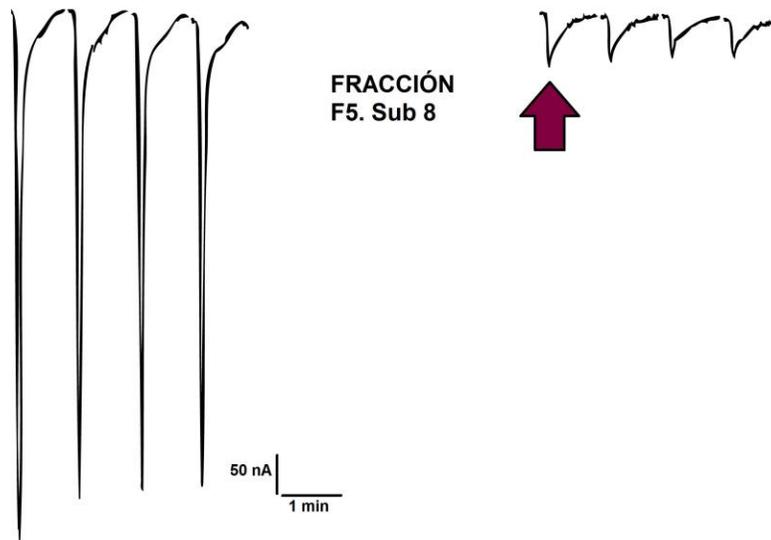


Figura 38. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub8. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F5. Sub8.

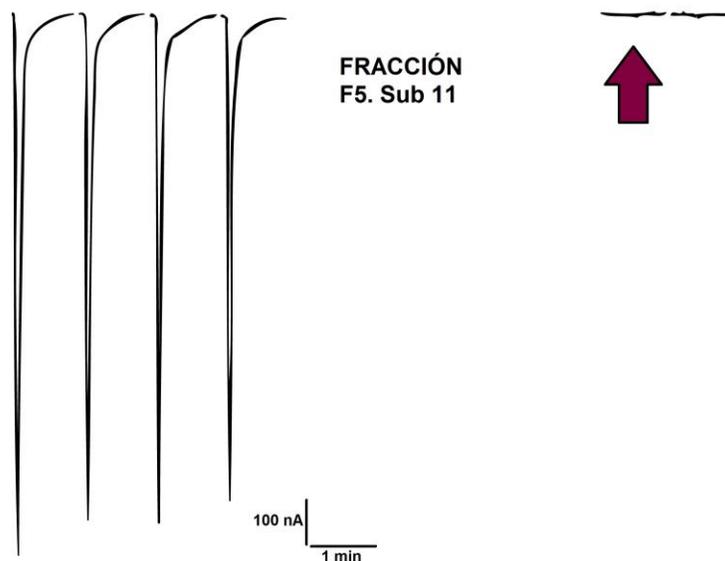


Figura 39. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub11. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F5. Sub11.

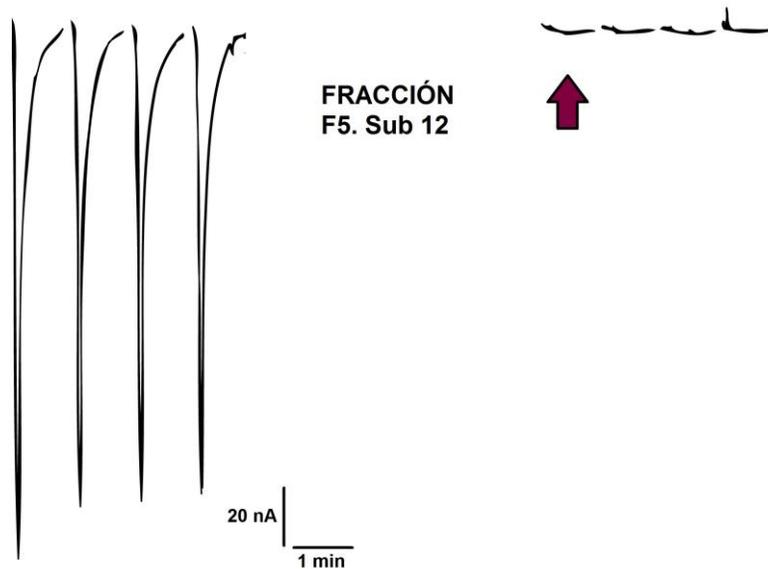


Figura 40. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 7$ ante la incubación con F5. Sub12. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F5. Sub12.

En el caso del RnACh $\alpha 4\beta 2$ hubo actividad inhibitoria con dos subfracciones: F5. Sub7 (Figura 41) y F5. Sub11 (Figura 42), ambas fueron reversibles: al paso del tiempo, las corrientes se incrementaron hasta alcanzar su valor inicial. Del lado izquierdo de las imágenes, se pueden observar las corrientes control, mientras que del lado derecho, el resultado de aplicar la subfracción de veneno.

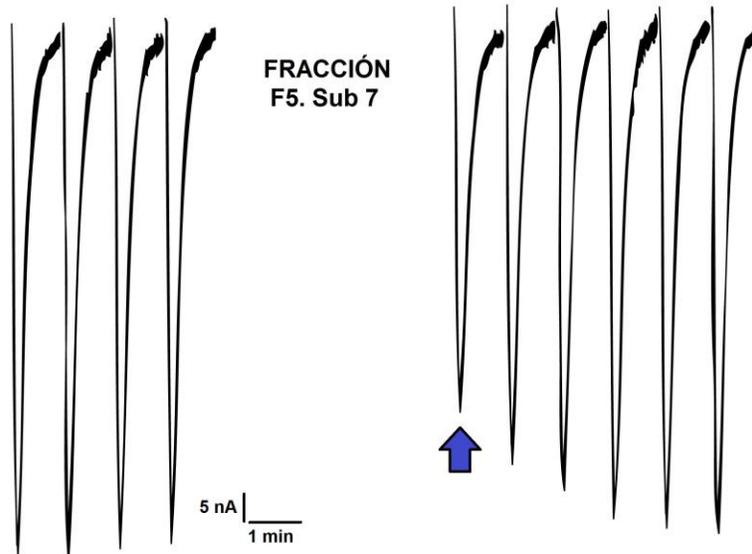


Figura 41. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F5. Sub7. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F5. Sub7.

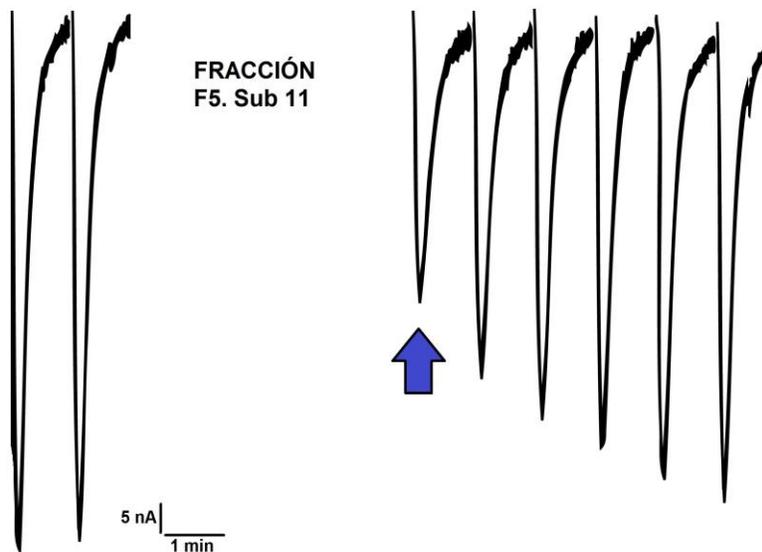


Figura 42. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F5. Sub11. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F5. Sub11.

Finalmente, para en el caso del RnACh $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$, ninguna de las subfracciones de F5 presentó actividad inhibitoria.

6.6.3 Evaluación electrofisiológica de las subfracciones de F6

El promedio del porcentaje inhibición, de tres ensayos para la subfracción F6 se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentajes de inhibición registrados para el RnACh $\alpha 4\beta 2$, de acuerdo a la subfracción de F6 probada.

Subfracción F6	Porcentaje de inhibición en $\alpha 4\beta 2$
Sub 12	0
Sub 17	0
Sub 19	0
Sub 21	13
Sub 24	0

Como se observó en la tabla anterior, de las cinco subfracciones probadas, solo una: F6. Sub21 (Figura 43), presentó actividad inhibitoria e irreversible sobre el RnACh $\alpha 4\beta 2$.

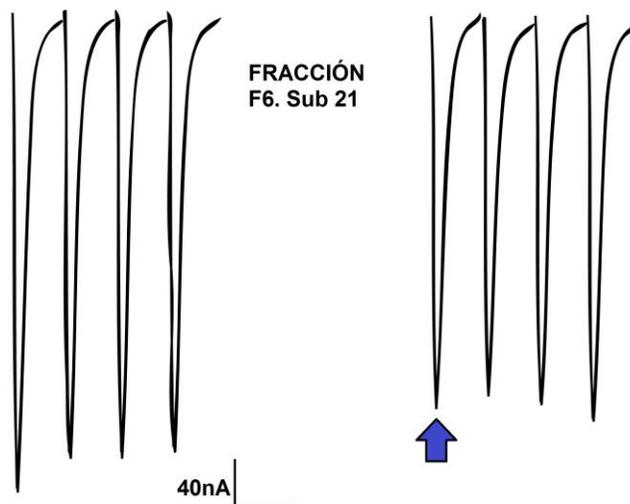


Figura 43. Evaluación de la respuesta del RnACh $\alpha 4\beta 2$ ante la incubación con F6. Sub21. Trazos representativos de las corrientes generadas por pulsos de ACh; la flecha indica el primer pulso después de 5 min de incubación con la subfracción F6. Sub21.

6.7 Determinación de masa molecular.

Las muestras F5. Sub7, Sub8, y Sub12, se enviaron al Laboratorio Universitario de Proteómica del IBt/UNAM para su análisis por espectrometría de masas. Sus espectros fueron obtenidos por la técnica de ionización tipo nano-electrospray (ESI), la cual es una técnica para una muestra que se encuentra en fase líquida. La muestra es convertida en aerosol por el sistema, y las gotas resultantes salen ionizadas, hasta que forman la fase gaseosa; es recomendado para moléculas de hasta 200,000 Da.

En la Tabla 7, se aprecian los pesos moleculares de cada una de las muestras. Estos valores se obtuvieron multiplicando el valor de la masa por el número indicado en la carga (z), posteriormente se restó el valor de la carga. Por ejemplo: en F5. Sub8, la señal más abundante tiene una masa de 1056.36 que multiplicada por la carga 2 da un total de 2,112.72, al restar la carga da como resultado 2,110.72 que corresponde al ion mayoritario marcado en la Tabla 7.

Como puede observarse, se tuvieron varios iones positivos para cada una; donde se señala, a su vez, el ión más abundante con un *. El obtener varios iones, indica varios componentes en las muestras. A manera de ejemplo, se ilustra el espectro para la muestra F5. Sub8 (Figura 44 y 45).

Tabla 7. Resultados de la masa molecular correspondiente a las fracciones F5. Sub7, F5. Sub8 y F5. Sub12 de *C. fergusonii*.

Muestra	Peso molecular experimental (Da)
F5. Sub7	2,295.58; 11,077.75*
F5. Sub8	1,752.88; 2,110.72*; 2,184.76; 2,308.88; 2,925.18; 3,775.32; 4,027.62; 11,078.80; 11,103.84
F5. Sub12	2,297.61*; 2,766.72; 5,793.92; 6,178.70; 7,530.53; 12,067.20

Nota: el signo * indica el ión más abundante en cada una de las fracciones.

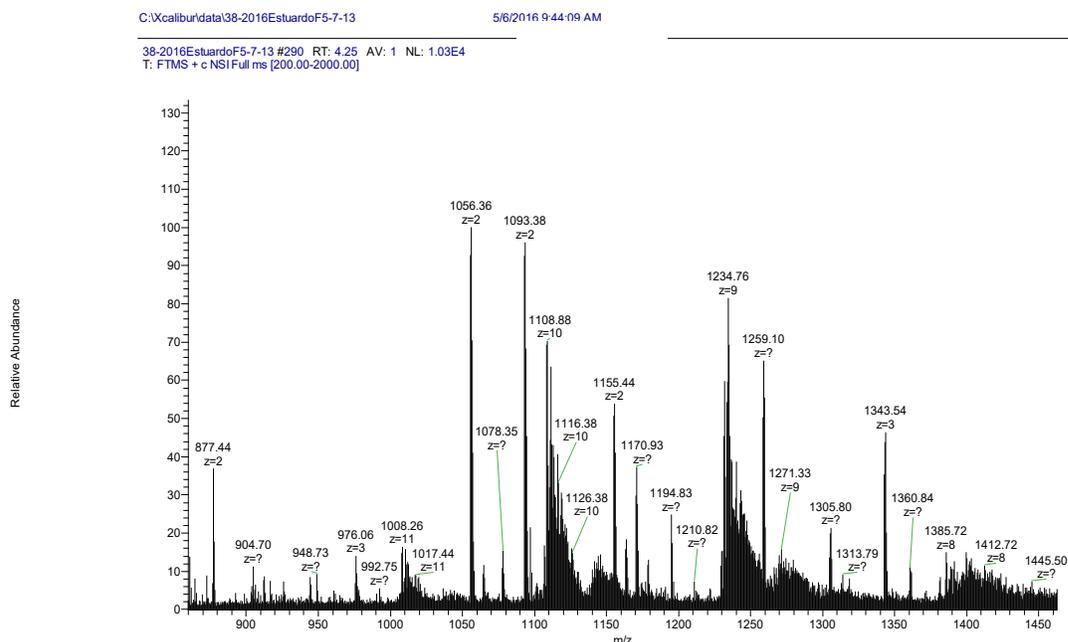


Figura 44. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra del péptido F5. Sub8 en una ventana masa/ carga que va de 800 a 1,500. La letra Z indica la carga, mientras que el valor numérico superior, la masa.

38-2016EstuardoF5-7-13_XT_00001_M_ #1 RT: 1.1
T: FTMS + c NSI Full ms [200.00-2000.00]

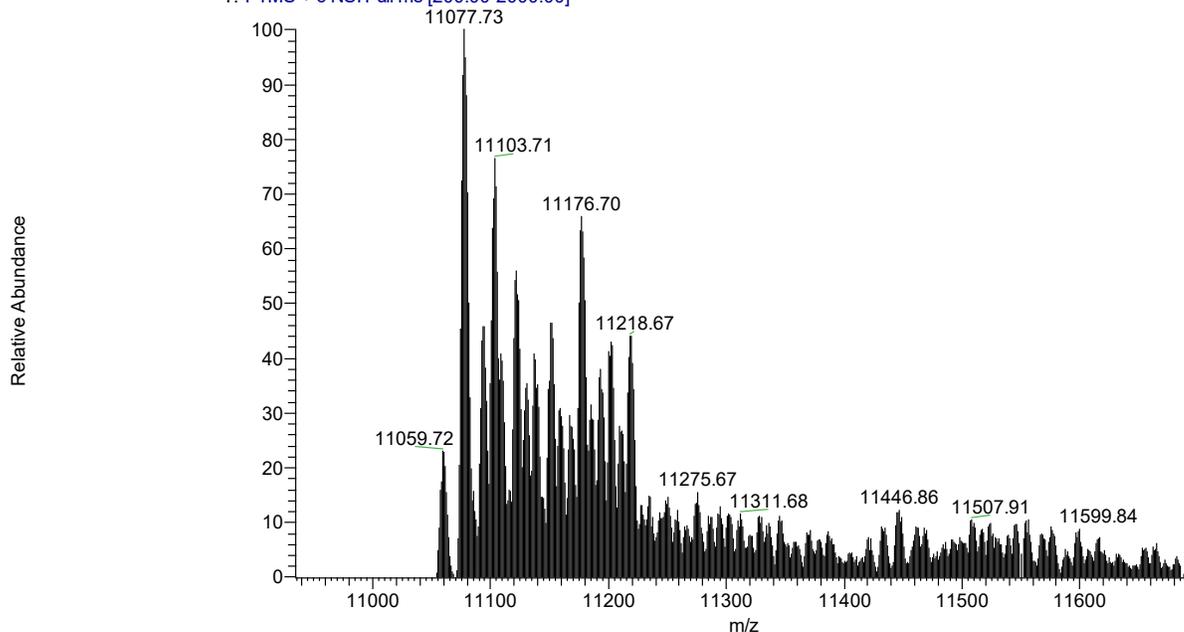


Figura 45. Espectrometría de masas (ESI) de la muestra del péptido F5. Sub8 en una ventana masa/carga que va de 11,000 a 11,700. La letra Z indica la carga, mientras que el valor numérico superior, la masa.

6.8 Secuenciación.

Para la secuenciación, se nos requirió mandar 1 nmol por muestra, por lo que se mandaron las subfracciones de F5: Sub7 (0.80 nmoles) y Sub8 (2 nmoles) al laboratorio del Dr. Possani del IBt. No obstante, la Sub12 no fue enviada por tener menos de 100 pmol.

El cálculo de los nanomoles se hizo tomando como referencia el área bajo la curva de la señal mayoritaria obtenida por RP-HPLC para 10 nmoles de la conotoxina α -RgIA sintética; esta es una conotoxina de 13 aminoácidos que actúa sobre RnACh. El área bajo la curva obtenida para α -RgIA fue de 33,658,706, mientras que para F5. Sub7 fue de 2,629,953 y para F5. Sub8 fue de 8,003,693.

Como resultados, de la F5. Sub7, no se obtuvo secuencia alguna; esto es posible debido a que el extremo N-terminal esté bloqueado por alguna modificación post-traducciona, lo que no permite el acoplamiento del reactivo de Edman.

En el caso de la F5. Sub8, se obtuvo la siguiente secuencia (Figura 45):

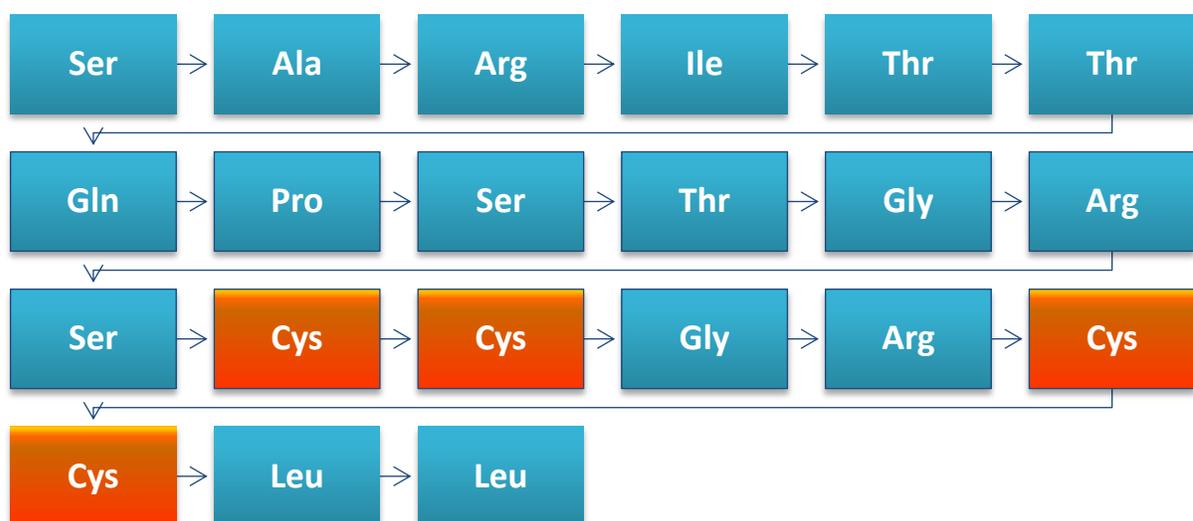


Figura 46. Secuencia de aminoácidos de la fracción F5. Sub8, obtenida por principio de degradación de Edman. Los recuadros en color naranja corresponden a residuos de cisteína; se asume que son estos, ya que no se obtuvo señal clara en los respectivos ciclos, debido a que la muestra se mandó sin reducción y alquilación de cisteínas.

A partir de esta secuencia, se obtuvo la masa calculada con ayuda del programa Ion Source (ionsource.com), considerando cisteínas oxidadas, el peso molecular fue de 2,209.57 Da (promedio).

Masa 2209.57 (prom.) 2208.02 (mono.)
Longitud 21
 Cys oxidadas N-terminal libre C-terminal libre

SARITTQPSTGRSCCGRCCLL

Figura 47. Masa calculada de F5. Sub8 obtenida con Ion source. Se consideraron cisteínas oxidadas para la determinación de la masa.

6.9 Curva Dosis-Respuesta

Se utilizó la F5. Sub7, para determinar la constante de inhibición 50 (IC_{50}) sobre el receptor $\alpha 7$. Debido principalmente a la disponibilidad de muestra (la concentración de material estimada en el tubo es de $[80 \mu M]$), ser una subfracción adyacente al Sub8 y ambas presentar porcentajes de inhibición similares.

En la Figura 46 se ilustra la curva Dosis-Respuesta, con una $IC_{50} = 492 \text{ nM}$, obtenida a partir del resultado de la prueba de cinco concentraciones diferentes, cada una por triplicado. La curva fue generada por medio del programa Prism.

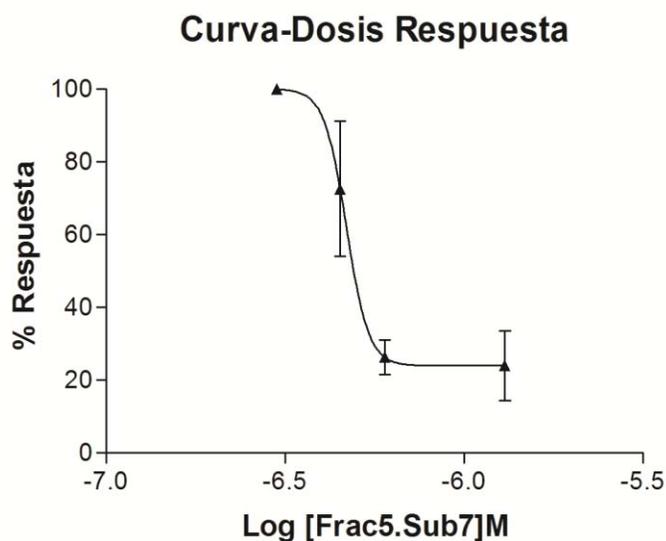


Figura 48. Curva dosis respuesta para F5. Sub7 en el RnACh $\alpha 7$. $IC_{50} = 492 \text{ nM}$.

7 Discusión

Para la realización de este trabajo, se utilizó la especie *C. fergusonii*, la cual es una especie que habita en aguas mexicanas y de la cual, hasta el momento, no se tienen reportes conocidos de amenazas a su población (IUCN, 2016). Esto lo vuelve un organismo que podría encontrarse nuevamente en futuras colectas, con el fin de identificar conotoxinas con actividad sobre diferentes canales iónicos activados tanto por ligando como por voltaje. De este modo, no solo se ampliaría el estudio de conotoxinas, sino que podría recalcarse la importancia de estudiar las especies que habitan nuestro país.

Para el fraccionamiento del veneno total de *C. fergusonii*, la colecta se realizó por tiempos de 5 minutos en vez de hacerlo por señales en el cromatograma. Martínez-Hernández (2016), menciona que la optimización del uso de los péptidos extraídos de los venenos de *Conus* es de gran importancia para posibilitar la evaluación de los mismos. Es por ello que se decidió hacer este tipo de colecta que agilizaría el proceso de identificación de la(s) fracción(es) del veneno donde se encuentra el componente o componentes inhibitorios.

Una vez identificada la actividad, dicha estrategia permitió enfocarse únicamente en las fracciones deseadas en lugar de probar una a una las señales que se hubieran obtenido del fraccionamiento inicial. Así se desperdicia una cantidad menor de material y esto agiliza la parte experimental.

Los ovocitos de *X. laevis* fueron elegidos como modelo experimental, debido a que son un sistema de expresión heteróloga versátil; se tienen caracterizados los receptores y canales endógenos. Otro beneficio es que, debido a la gran cantidad de proteína almacenada, los ovocitos no dependen de recursos extracelulares para su nutrición. Además, su tamaño de 1.3 mm, permite una manipulación sencilla (Bröer, 2010).

Su uso como un sistema de expresión *in vitro* se inició en 1971, pero fue hasta 1982 que se usaron para expresar proteínas de membrana, como pioneros

en estudios sobre el receptor de acetilcolina (Barnard *et al*; 1982; Mishina *et al*; 1984; Bröer, 2010).

Los subtipos de receptores nicotínicos utilizados para hacer los estudios en esta tesis, fueron el muscular y los neuronales $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$; esto debido a que la mayoría de las conotoxinas encontradas hasta el momento bloquean el receptor neuronal $\alpha 7$ o bien el receptor muscular, así que era altamente probable encontrar alguna toxina que afectara alguno de estos subtipos.

Respecto al $\alpha 4\beta 2$ fue elegido ya hasta el momento, no se sabe de alguna conotoxina que sea selectiva para este receptor; así que se buscó encontrar alguna toxina en el veneno de *C. fergusoni* que tuviera especificidad sobre este canal, que está relacionado con padecimientos como la enfermedad de Parkinson.

Se realizó la propagación y transcripción de diversas subunidades de RnACh tanto para el ensayo principal, como para posteriormente probar la selectividad de la(s) toxina(s) encontradas. La única subunidad en la que no se realizó linearización fue la $\alpha 7$, esto debido a que Flores-Torres había observado que el rendimiento de RNA (ng/mL) posterior al linearizado, era muy bajo (datos no mostrados).

Con base en los resultados de las pruebas electrofisiológicas, se obtuvo que del total de 12 fracciones, solo se presentó actividad inhibitoria por parte de las fracciones F4, F5 y F6, obtenido del veneno total de *C. fergusoni* (Figura 24); estas fracciones corresponden a los porcentajes de elusión que van del 20 al 35% de solución B. Esto nos indica que los componentes obtenidos en las tres fracciones son hidrofílicos, pues están eluyendo con un porcentaje mayor de agua en la solución con poco solvente orgánico.

Se sabe que los caracoles *Conus* tienen, en la gama de sus toxinas, al menos un componente contra un receptor nicotínico de acetilcolina como parte de sus blancos moleculares, pero en este trabajo se puede observar que el *C. fergusoni* presentó más de uno.

Después de las repurificaciones de las fracciones, se encontraron cuatro componentes semipuros con actividad inhibitoria sobre el RnACh $\alpha 7$. De ellos, uno se identificó hasta obtener su secuencia, como se explica después.

Respecto a los componentes con actividad inhibitoria en el RnACh $\alpha 4\beta 2$, al inicio del proyecto y con las fracciones completas F4, F5 y F6, se había presentado actividad inhibitoria (60% en el caso de F5) sobre el receptor. Sin embargo, al momento de repurificar y evaluar los componentes mayoritarios para este receptor, sólo uno presentó actividad (F6. Sub21), pero al ser sólo del 13%, un valor muy cercano al error experimental (10%) se decidió no hacer la caracterización bioquímica de este péptido.

El haber tenido una baja inhibición, por parte de estos componentes, puede deberse a que el responsable de la actividad inhibitoria, se encuentre en una de las señales minoritarias que no fueron probadas en el ensayo, o bien se sobrestimó la cantidad de muestra usada, siendo esta en realidad, mucho menor.

De los cuatro componentes con actividad sobre $\alpha 7$, el péptido F5 sub11 no fue enviado para obtener su masa molecular, debido a que la cantidad de material que se tenía era muy poca y la probabilidad que no se obtuvieran resultados era alta. Flores-Torres reporta que tuvo casos donde con una cantidad de 60 pmoles no logró tener resultados de masas debido a material insuficiente; considerando que al repurificar el péptido tendríamos una menor cantidad de material, se decidió no enviarlo.

Con esto, se obtuvieron las masas moleculares de tres subfracciones de F5 (Sub 7, Sub 8 y Sub 12) las cuales inhibieron por arriba del 95% la corriente del subtipo de receptor nicotínico $\alpha 7$ de acetilcolina de forma irreversible.

Estas subfracciones presentaron iones mayoritarios: para F5. Sub7: 11,077.75 Da; para F5. Sub8: 2,110.72 Da y F5. Sub12: 2,297.61 Da. Sin embargo, las tres muestras presentan otras señales masa/carga, lo que indica que los componentes aún no están puros.

Las subfracciones enviadas a secuenciar fueron la F5. Sub7 y F5. Sub8. Sin embargo, de Sub7, no se obtuvo secuencia. Esto pudo deberse a diversos factores: el principal, que la cantidad de material enviado no fuera suficiente, o bien, que exista una modificación post-traducciona en el amino terminal del péptido que impida el acoplamiento del PITC en la degradación de Edman. Las modificaciones más frecuentes se dan principalmente en aquellas cadenas de aminoácidos que comienzan con metionina o bien serina, por la acetilación (Hirano y Kamp, 2003; Varland *et al.*, 2015).

La única subfracción de la que se obtuvo tanto la masa experimental como la secuencia fue F5. Sub8; de ella, se puede argumentar lo siguiente:

El componente mayoritario, muy probablemente el compuesto activo, es un péptido constituido por 21 aminoácidos, cuatro de ellos posibles residuos de cisteínas. La suma de las masas de cada aminoácido da un total de 2,209.57 Da. Si se compara este peso, con el resultado obtenido en las masas, no corresponde con el ion mayoritario de la masa experimental (2,110.72 Da) existe una diferencia de 98.85 Da donde la secuencia excede este peso.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las masas tienen más de un peso molecular. En este caso, F5. Sub8, presenta un peso molecular de 2,308.88 Da, que es el peso más cercano a la masa calculada, teniendo una diferencia de 99.31 Da, y que nos explicaría que la secuencia obtenida está incompleta, faltando un aminoácido.

Revisando los pesos moleculares de los aminoácidos, se puede apreciar que el aminoácido faltante sería Valina, con un peso de 99.14 Da. Si consideramos este aminoácido en la cadena, la masa estaría completa, salvo la confirmación de los residuos de cisteína.

Considerando que para dos subfracciones adyacentes existe un ion cuyo valor es muy cercano entre ellos: 2,295.58 para Sub7 y 2,308.88 para Sub8, pudiera inferirse que es el componente inhibitorio.

Las conotoxinas encontradas en diferentes especies de *Conus* que tienen actividad inhibitoria sobre receptores nicotínicos de acetilcolina tienen entre los blancos moleculares predilectos al receptor $\alpha 7$ y al receptor muscular. Estas conotoxinas se encuentran agrupadas en la superfamilia genética A.

En la Tabla 8 se observan las conotoxinas pertenecientes a la superfamilia A que tienen actividad sobre los RnACh $\alpha 7$.

Tabla 8. α -conotoxinas de la Superfamilia A con actividad sobre RnACh $\alpha 7$.

Especie	Toxina	Secuencia	Blanco
<i>C. imperialis</i>	ImI	GCCSDPRCAWRC*	$\alpha 3\beta 2 > \alpha 7 > \alpha 9$
<i>C. imperialis</i>	ImII	ACCSDRRRCRWRC*	$\alpha 7$
<i>C. omaria</i>	OmIA	GCCSHPACNVNPHICG*	$\alpha 3\beta 2 > \alpha 7 > \alpha 6\beta 2$
<i>C. geographus</i>	GIC	GCCSHPACAGNNQHIC*	$\alpha 3\beta 2 = \alpha 6\beta 2 > \alpha 7$
<i>C. geographus</i>	GID	IRD γ CCSNPACRVNNOHVC*	$\alpha 7 = \alpha 3\beta 2 > \alpha 4\beta 2$
<i>C. episcopatus</i>	Epl	GCCSDPRCNMNNPDΨC*	$\alpha 3, \alpha 7$
<i>C. anemone</i>	AnIA	CCSHPACAANNQDΨC*	$\alpha 3\beta 2, \alpha 7$
<i>C. anemone</i>	AnIB	GGCCSHPACAANNQDΨC*	$\alpha 3\beta 2, \alpha 7$
<i>C. pennaceus</i>	PnIA	GCCSLPPCAANNPDΨC*	$\alpha 3\beta 2 > \alpha 7$
<i>C. pennaceus</i>	PnIB	GCCSLPPCALSNDΨC*	$\alpha 7 > \alpha 3\beta 2$
<i>C. pergrandis</i>	PeIA	GCCSHPACSVNHPELC*	$\alpha 9\alpha 10 > \alpha 3\beta 2 > \alpha 6\beta 2 > \alpha 3\beta 4 = \alpha 3\beta 2 > \alpha 7$
<i>C. victoriae</i>	Vc1.1	GCCSDPRCNYDHPEIC*	$\alpha 9\alpha 10 > \alpha 6\beta 2 > \alpha 3\beta 4 = \alpha 3\beta 2 > \alpha 7$
<i>C. regius</i>	RglA	GCCSDPRCRYRCR*	$\alpha 9\alpha 10 > \alpha 7$
<i>C. textile</i>	TxlA	GCCSRPPCIANNPDLC*	AChBP = $\alpha 3\beta 2 > \alpha 7$
<i>C. arenatus</i>	ArIA	IRDE CCSNPACRVNNOHVCRR	$\alpha 7 = \alpha 3\beta 2$
<i>C. arenatus</i>	ArIB	DE CCSNPACRVNPHVCRRR*	$\alpha 7 = \alpha 6\beta 2 > \alpha 3\beta 2$

O = hidroxiprolina; * = amidación del carboxilo terminal; γ = gamma-carboxilación del glutamato; Ψ = sulfatación de tirosina; **C**= en negrillas para resaltar este aminoácido. (López-Vera y Flores-Torres, 2016; Conoserver.org)

Sin embargo, la superfamilia A, no es la única que presenta conotoxinas que tienen como blanco molecular los RnACh. Existen otras familias con actividad sobre los distintos receptores nicotínicos, estas se enlistan en la Tabla 9; en ella también se puede apreciar aquellas que tienen actividad sobre el receptor $\alpha 7$.

Tabla 9. Conotoxinas pertenecientes a diferentes familias, con actividad sobre el RnACh.

Especie	Toxina	Secuencia	Blanco
Familia αA			
<i>C. purpurascens</i>	αA -PIVA	GCCGSYONAACHOCSCKDROSY CGQ*	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
<i>C. purpurascens</i>	αA -EIVA	GCCGPYONAACHOCGCKVGROO YCDROSGG*	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta, \alpha 4\beta 2$
<i>C. purpurascens</i>	αA -EIVB	GCCGKYONAACHOCGCTVGROO YCDROSGG*	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
<i>C. obscurus</i>	αA -OIVA	-CCGV-ONAACHOCVCKNT---C*	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
<i>C. obscurus</i>	αA -OIVB	-CCGV-ONAACPOCVCKNT---CG*	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta > \alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
<i>C. pergrandis</i>	αA -PeIVA	-CCGVONAA-CHOCVCTGK----C*	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta > \alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
<i>C. pergrandis</i>	αA -PeIVB	-CCGIONAA-CHOCVCTGK----C*	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta > \alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
Familia ψ			
<i>C. purpurascens</i>	ψ -PIIIE	HOCCCLYGKCRRYOGCSSASCCQ R*	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
<i>C. purpurascens</i>	ψ -PIIIF	GOCCCLYGSCROFOGCYNALCCR K*	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$
<i>C. parius</i>	ψ -PrIIIE	AARCCTYHGSLKEKCRKRYCC*	$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta > \alpha 1\beta 1\gamma\delta$
Familia αS			
<i>C. radiatus</i>	αS -RVIIIA	KCNDFKCKGTGVYNC γ SCSC γ GL HSCRCTYNIGSMKSGCACICTYY	$\alpha 7, \alpha 3\beta 2, \alpha 3\beta 4,$ $\alpha 4\beta 2$
Familia αD			
<i>C. vexilium</i>	VxXXA	DVQDCQVSTOGSKWGRCCLNRV CGPMCCPASHCYCVYHRGRGHG	$\alpha 7 > \alpha 3\beta 2$

		CSC*	
<i>C. vexillum</i>	VxXXB	DDJSJ C IINTRDSPWGR CC RTRMC GSM CC PRNGCT C VYHWRRGHGC SCP*	> α 4 β 2
<i>C. vexillum</i>	VxXXC	DLRQ C TRNAPGSTWGR CC LNPTM C GNF CC PRSG C TCAYNWRRGIYC SC*	α 1 β 1 ϵ δ
		Familia αL	
<i>C. litteratus</i>	It14a	MCPPL C KP S CTNC*	RnACh neuronales
		Familia αJ	
<i>C. planorbis</i>	PI14a	FPRPR C LN LAC RAGIGHKYP FCHC R*	α 1 β 1 ϵ δ > α 3 β 4
		Familia αC	
<i>C. parius</i>	α C-PrXA	TYGIYDAKPOF AC AGLRGG C VLPO NLROKFKE*	α 1 β 1 ϵ δ

O = hidroxiprolina; * = amidación del carboxilo terminal; γ = gamma-carboxilación del ácido glutámico; **C**= en negrillas para resaltar este aminoácido (López-Vera y Flores-Torres, 2016; Conoserver.org).

Como se puede observar, la mayoría de las conotoxinas moduladoras de RnACh, corresponden a la superfamilia A, cuyo arreglo mayoritario de cisteínas es C-C-CC. Se subdividen en 3/5, 4/3, 4/4, 4/6 y 4/7 dependiendo de los residuos intercisteínas que presenten.

Para la secuencia de F5. Sub8 de *C. fergusonii*, (suponiendo cisteínas en la cadena de aminoácidos) el arreglo de cisteínas que obtuvimos que fue CC-CC y corresponde al arreglo de cisteínas V. Este es muy diferente al característico de la superfamilia A. De igual forma, si se compara con las dos tablas anteriores, no corresponde a ninguno de los antes observados en las demás familias con actividad sobre RnACh.

Este arreglo de cisteínas, CC-CC, únicamente se ha observado en la superfamilia T de conotoxinas, que puede adoptar tres tipos de conectividad de enlaces disulfuro: globular (I-III, II-IV), de listón (I-IV, II-III) y cuentas (I-II, III-IV) (Wang *et al.*, 2014). Estas tienen una interacción con canales de sodio, canales de calcio presinápticos o bien con proteínas G asociadas a receptores presinápticos.

Hasta lo reportado por Wang *et al.* (2014) no se tenía ningún reporte de conotoxinas con actividad sobre receptores nicotínicos que se agruparan dentro de la superfamilia T. Sin embargo, estos autores reportan que la toxina TxVC de *C. textile* presenta un arreglo de cisteínas V y tiene actividad inhibitoria sobre los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 2$ del RnACh.

Como peculiaridad del péptido encontrado en *C. fergusonii* (SARITTQPSTGRSC**CCGRCC**LLV; donde V necesita ser confirmado) se puede apreciar que las cisteínas se encuentran en la parte final de la cadena peptídica (últimos 9 aminoácidos) y existen solamente dos residuos entre las cisteínas; esto tampoco coincide con lo observado en la toxina TxVC cuya secuencia es KP**CC**SIHDNS**CC**GL y presenta seis residuos intercisteínas.

Considerando la conotoxina TxVC y la secuencia obtenida a partir del veneno de *C. fergusonii*, se puede suponer que existe una amplia variedad de conotoxinas con arreglo V de cisteínas que tengan actividad sobre receptores nicotínicos que falta ser estudiada o bien descubierta en otras especies de *Conus*,

En el caso del presente trabajo, suponiendo cisteínas en la secuencia obtenida, podría decirse que es la primera conotoxina de la superfamilia T que tiene actividad sobre el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$.

Se obtuvo una IC_{50} de 492 nM para la fracción F5. Sub7. No obstante, el valor es especulativo, debido a que la muestra presenta varios componentes, por lo que no se sabe la concentración exacta del péptido activo; sin embargo, puede decirse que es menor a este valor. Por ello, es necesario trabajar ya sea con el péptido puro o bien el compuesto sintético de éste.

Comparando esta IC_{50} con la reportada en unas conotoxinas de la superfamilia A, con blanco molecular el RnACh $\alpha 7$, como lo son ImII = 571 nM; GID = 5.1 nM; PnIB = 61.3 nM; ArIA = 6.02 nM, podemos ver que la IC_{50} encontrada es alta, pero sigue dentro del rango nanomolar, cuando existen otras conotoxinas cuya concentración necesaria para bloquearlo, es milimolar.

La conotoxina TxVC, que forma parte de la superfamilia T, bloqueó al receptor $\alpha 7$, pero con una concentración mayor a 10 μ M. El receptor con el que presentó mayor afinidad fue el $\alpha 4\beta 2$, con una IC_{50} de 343.4 nM, lo cual es un poco más cercano a lo que se encontró para la toxina en *C. fergusonii*, para el receptor $\alpha 7$.

8 Conclusión

- Se encontró la presencia de 5 subfracciones (F4. Sub10, F5. Sub7, F5. Sub8, F5. Sub11 y F5. Sub12) con actividad de modulación de corrientes por arriba del 95% e irreversible sobre el subtipo $\alpha 7$ del RnACh en el veneno de *C. fergusonii*.
- Se encontró actividad inhibitoria pero reversible para el subtipo $\alpha 4\beta 2$ de receptores nicotínicos de acetilcolina en el veneno de *C. fergusonii*.
- Se pudo definir el peso molecular de los componentes de tres de las cinco subfracciones que contienen péptidos con actividad moduladora sobre el RnACh $\alpha 7$.
- Se obtuvo la secuencia parcial de un péptido contenido en la subfracción F5. Sub8 del veneno de *C. fergusonii*
- Un péptido de la subfracción F5. Sub8 con actividad inhibitoria sobre el RnACh $\alpha 7$ presentó un arreglo de cisteínas tipo V y, aparentemente, pertenece a la superfamilia T de conotoxinas.
- La IC_{50} aparente de la subfracción F5. Sub7 es de 492 nM; sin embargo no es un péptido puro por lo cual el valor es solamente una aproximación.

9 Perspectivas

- Confirmar la secuencia de aminoácidos de F5. Sub8 mediante la reducción y alquilación del péptido.
- Determinar la IC₅₀ de F5. Sub8.
- Comprobar la especificidad de la subfracción F5. Sub8 probándola en otros subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina.
- Obtener el precursor del péptido para determinar la superfamilia a la que pertenece o bien, definir si se trata de una nueva.

10 Bibliografía

- Abbott, R. T. y Dance S. P. 1998. Compendium of seashells. A full-color guide to more than 4,200 of the world's marine shells. Odyssey Publishing. El Cajon CA. 411pp.
- Aguilar M. B., E. López-Vera, E. Ortiz, B. Becerril, L. D. Possani, B. M. Olivera y Heimer de la Cotera E.P. 2005. A novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry*, 44: 11130-11136.
- Aguilar, M. B., A. Flores-Torres, C. V. Batista, A. Falcon, E. López-Vera y E. P. de la Cotera. 2009. Structural characterization of five post-traslationally modified isomorphs of a novelputative delta-conotoxin from vermivorous snail *Conus delessertii* from the Mexican Caribbean Sea. *Peptides*, 30: 458466.
- Aguilar, M., E. Ortiz, Q. Kaas, E. López-Vera, B. Becerril, L. Possani y E. P. de la Cotera. 2013. Precursor de13 1 from *Conus delessertii* defines the novel g gene superfamily. *Peptides*, 41: 1720.
- Akondi, K. B., M. Muttenthaler, S. Dutertre, Q. Kaas, D. J. Craik, R. J. Lewis, y P. F. Alewood. 2014. Discovery, Synthesis, and Structure–Activity Relationships of Conotoxins. *Chemical Reviews*. 11;114(11):5815-47.
- Bandyopadhyay, P. K., J. E. Garrett, R. P. Shetty, T. Keate, C. S. Walker, B. M. Olivera. 2002. GammaGlutamyl 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.
- Barnard, E. A., R. Miledi y K. Sumikawa. 1982. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus oocytes*. *Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 215, 241–246.
- Becerra, M. P. 2012. Purificación y caracterización estructural de dos proteínas de 10kDa del veneno del caracol marino *Conus spurius*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias. UNAM.

- Bröer, S. 2010. *Xenopus laevis* Oocytes. *Methods Mol Biol.* 637:295-310.
- Brusca, R.C. y G. J. Brusca. 2003. *Invertebrates*. 2nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc., 936 pp.
- Buczek, O., G. Bulaj y B. M. Olivera. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 3067–3079.
- Campos-Lira, E. 2014. Efecto modulador del receptor para el Ácido gamma-amino butírico tipo A por toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias. UNAM.
- Chapman, A. D. 2009. *Numbers of living species in Australia and the world*, 2nd edition. Australian Biological Resources Study, Canberra.
- Chargeux, J. P., A. Devillers-Thiery y P. Chemouilli. 1984. Acetylcholine receptor: an allsoteric protein. *Science* 225.
- Craig, A. G., T. Norberg, D. Griffin, C. Hoeger, M. Akhtar, K. Schmidt, W. Low, J. Dykert, E. Richelson, V. Navarro, J. Mazella, M. Watkins, D. Hillyard, J. Imperial, L. J. Cruz y B. M. Olivera. 1999. Conulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J. Biol. Chem.* 274:13752-9.
- Criado, M. 2011. El receptor nicotínico de acetilcolina. *Mente y Cerebro*. No. 7.
- Daly, N. L y D. J. Craik. 2009. Structural studies of Conotoxins. *IUBMB Life*, 61 (2): 144-150
- Díaz-Hernández, M., J. Gualix, R. Gómez-Villafuertes, R. Castro, J. Pintor y M. T. Miras-Portugal. 2000. Receptores nicotínicos neurales: interacción con receptores purinérgicos. *Anal Real Acad Farm.* 66: 1-21.
- Dutertre, S., D. Croker, N. L. Daly, A. Anderson, M. Muttenthaler, N. G. Lumsden, D. J. Craik, P. F. Alewood, G. Guillon y R. J. Lewis. 2008. Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressinlike peptides. *J. Biol. Chem.* 283: 7100–7108.
- Fedosov, A.E., S. A. Moshkovskii, K. G. Kuznetsova y B. M. Olivera. 2012. Conotoxins: From the biodiversity of gastropods to new drugs. *Biochemistry Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 6 (2): 107–122.

- Felder, D.L. y D. K. Camp. 2009. Gulf of Mexico origin waters and biota (TAMU Press Ed.) Estados Unidos de América: Texas AM. University Press.
- Flores-Soto, M. E y S. Torres. 2005. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Revista Mexicana de Neurociencias*: 6(4).
- Flores-Torres, A. 2009. Purificación y caracterización de péptidos del veneno del caracol marino *Conus delesserti*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Marina. UNAM.
- Gabbi, G. 2006. Shells. White Starpublisher's, Vercelli, Italia.
- Gowd, K. H., S. Han, V. Twede, J. Gajewiak, M. D. Smith, M. Watkins y B. M. Olivera. 2012. Conantokins derived from the asprella clade impart con RI-B an Methyl d-aspartate receptor antagonist with a unique selectivity profile for NR2B subunits. *Biochemistry*, 51 (23): 4685-4692.
- Halai R. y D. J, Craik. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 26: 526-536.
- Hickman, C. P., L. S. Roberts, S. L. Keen., A. Larson, H. l'Anson y D. J. Einsenhour. 2008. *Integrated Principles of Zoology*. McGraw-Hill. Higher Education. 14th ed.
- Hirano, H. y R. M. Kamp. En: Smith. B. J. 2003. *Methods in Molecular Biology*. Vol 211: Protein Sequencing Protocols., Humana Press. Inc.
- Hooper, D., M. B. Lirazan, R. Schoenfeld, B. Cook, L. J. Cruz, B. M. Olivera y P. Bandyopadhyay. 2000. Post-translational modification: A two dimensional strategy for molecular diversity of *Conus* peptides. En: Fields, G. B., J. P. Tam y B. G. Dordrecht. 2000. *Peptides for the New Millennium: Proceedings of the Sixteenth American Peptide Symposium*, The Netherlands: Kluwer Academic.
- Insera, M. C., S. N. Kompella, I. Vetter, A. Brust, N. L. Daly, H. Cuny y R. J. Lewis 2013. Isolation and characterization of α -conotoxin LsIA with potent activity at nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 86 (6): 791-799.

- Jackson, D. J., G. Wörheide y B. M. Degnan. 2007. Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evolutionary Biology*, 7 (1): 160-177.
- Jones, R. M. y G. Bulaj. 2000. Conotoxins: new vistas for peptide therapeutics. *Current Pharmaceutical Design*, 6 (12): 1249-1285.
- Kaas, Q., J. Westermann y D. Craik, D. 2010. Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon* 55: 1491-509
- Kaas, Q., R. Yu, A. H. Jin, S. Dutertre y D. J. Craik. 2012. ConoServer: updated content knowledge and discovery tools in the conopeptide Database. *Nucleic Acids Research*, 40: 325-330.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz y T. M. Jessel. 2000. *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill. 4th ed.
- Kantor, Y. 2007. How much can *Conus* swallow? Observations on molluscivorous species. *Journal of Molluscan Studies*, 73 (2): 123-127.
- Katsuno, S. y T. Sasaki. 2008. Comparative histology of radula-supporting structures in Gastropoda. *Malacologia*, 50 (1): 13-56.
- Keen, A. M. 1971. *Sea shells of tropical west America*. California: Stanford University. 2th Ed.
- Kohn, A. J. 1983. *The Mollusca: Physiology*. In: *The Mollusca*. United States of America: Academic Press INC.
- Kohn, A. J. y F. E. Perron. 1994. Life history and biogeography: patterns in *Conus*. In *Oxford Biogeography Series*. Clarendon Press. 1-106pp
- Kohn, A. J., M. Omori, H. Yamakawa y Y. Koike. 2001. Maximal species richness in *Conus*: diversity, diet and habitat on reefs of northeast Papua New Guinea. *Coral Reefs* 20: 25–38.
- Laht, S, D. Koua, L. Kaplinski, F. Lisacek, R. Stöcklin, M. Remm. 2012. Identification and classification of conopeptides using profile Hidden Markov Models. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824(3):488-492.
- Lebbe, E. K., S. Peigneur, I. Wijesekara y Jan Tytgat. 2014. Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: An overview. *Marine Drugs*. 12:2970-3004.

- Leipold, E., A. Hansel, B. M. Olivera, H. Terlau y S. H. Heinemann. 2005. Molecular interaction of δ -conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett* 579: 3881–3884.
- Lewis, J.R., S. Dutertre, I. Vetter y J. C MacDonald. 2012. *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 62(2):260-298.
- Lluisma, A. O., E. López-Vera, G. Bulaj, M. Watkins y B. M. Olivera. 2008. Characterization of a novel psi-conotoxin from *Conus parius* Reeve. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 51 (2): 174-180.
- Loffelhotz, K. 1995. Ninth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. Mainz.
- López-Vera, E. 2001. Conotoxinas. *Spira*, 1(1):7-11.
- López-Vera, E. 2005. Actividad biológica de péptidos de caracoles de la superfamilia Conoidea. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. UNAM.
- López-Vera, E. 2010. Los receptores nicotínicos de acetilcolina y las α -conotoxinas. *REB* 29(1): 8-12.
- López-Vera, E. y A. Flores-Torres. 2016. Las conotoxinas como herramientas para el estudio de receptores nicotínicos de acetilcolina. En: Pérez-Leon, J. A., A. Cordova y Vazquez. 2016. De componentes moleculares a salud pública y ambiental. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- López-Vera, E., A. Walewska, J. J. Skalicky, B. M. Olivera y G. Bulaj. 2008. Role of hydroxyprolines in the in vitro oxidative folding and biological activity of conotoxins. *Biochemistry*.47:1741–1751.
- López-Vera, E., E. P. Heimer de la Cotera, M. Maillo, J. R. Riesgo-Escovar, B. M. Olivera y M. B. Aguilar. 2004. A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). *Toxicon* 43:365-74.
- López-Vera, E., M. B. Aguilar-Ramírez y E. P. Heimer. 2006 Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. *Ciencia* 3: 47-51.

- Marshall, A. J. 1980. Zoología de Invertebrados. Barcelona España. Pp. 683-685 Reverté. 4ta. Ed.
- Marshall, J., W. P. Kelley, S. S. Rubakhin, J. P. Bingham, J. V. Sweedler y W. F. Gilly. 2002. Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. Biol Bull. 203: 27-41.
- Martínez-Hernandez, L. A. 2016. *Drosophila melanogaster* como modelo in vivo para evaluar conotoxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias. UNAM
- Massoulie, J. y S. Bon. 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Annu Rev Neurosci. 5:57-106.
- Mc Mahan, U. J. 1992. The structure and regulation of grin. Symposium on the cholinergic synapse. Life Science, Vol 50. New York: Pergamon Press.
- McIntosh, J. M., D. A. Santos y B. M. Olivera. 1999. *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Annu. Rev. Biochem. 68: 58-88.
- McIntosh, J. M., S. Gardner, S. Luo, J. E. Garrett, y D. Yoshikami. 2000. *Conus* peptides: novel probes for nicotinic acetylcholine receptor structure and function. Eur. J. Pharmacol. 393:205-8.
- McLean, J., y J. Nybakken. 1979. On the growth stages of *C. fergusonii* Sowerby, 1987, the reinstatement of *C. xanthicus* Dall, 1910, and a new species of *Conus* from the Galapagos Islands. The Veliger. California Malacozoological Society. Inc. 22:2.
- Meiglitsch, P.A. 1972. Invertebrate zoology. Oxford University Press. New York. 2nd. ed
- Meyer, L. 2001. Characterization of the venom of the marine snail *Conus delessertii*. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin. 73 pp.
- Mishina, M., T. Kurosaki, T. Tobimatsu, Y. Morimoto, M. Noda, T. Yamamoto, M. Terao, J. Lindstrom, T. Takahashi y M. Kuno. 1984. Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. Nature 307, 604–608.

- Mitchell, S.S., K. J. Shon, M. P. Foster, D. R. Davis, B. M. Olivera y C. M. Ireland. 1998. Three-dimensional solution structure of conotoxin ψ -PIIIIE, an acetylcholine gated ion channel antagonist. *Biochemistry* 37:1215-20.
- Mould, J., T. Yasuda, C. I. Schroeder, A. M. Beedle, C. J. Doering, G. W. Zamponi, D. J. Adams y R. J. Lewis. 2004. The $\alpha 2\delta$ auxiliary subunit reduces affinity of ω -conotoxins for recombinant N-type (Cav2.2) calcium channels. *J. Biol. Chem.* 279: 34705–34714.
- Nicke, A., S. Wonnacott, y R. J. Lewis. 2004. α -conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Eur. J. Biochem.* 271:2305-19.
- Nielsen, D.B., J. Dykert, J. E. Rivier y J. M. McIntosh. 1994. Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail, *Conus imperialis*. *Toxicon.* 32(7):845-848.
- Nirthanan, S. y C. Gwee. 2004. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.* 94:1-17.
- Olivera, B. M. 2006. *Conus* peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* 281(42) 31173.
- Olivera, B. M. y L. Cruz. 2001. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon.* 39: 7-14.
- Olivera, M. B. 1997. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol. Biol. of the Cell.* 8: 2101-2109.
- Olivera, M. B., J. Rivier, C. Craig, A. C. Ramilo, P. G. Corpuz, F. C. Abogadie, E. E. Mena, R. S. Woodward, R. D. Hyllyard y L. J. Cruz. 1990. Diversity of *Conus* Neuropeptides. *Science* 249: 257- 263.
- Paredes, C., F. Cardoso, K. Altamirano, P. Baltazar y L. Romero. 2010. La familia Conidae en el mar peruano. The family Conidae from Peruvian Sea. *Revista Peruana de Biología,* 17 (1): 65-73.
- Platt. R. J., T. S. Han, B. R. Green, M. D. Smith, J. Skalicky, P. Gruszczynski y J. Gajewiak. 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, W. F. y D. R. Lindberg. 2008. *Phylogeny and evolution of the Mollusca* Berkeley University California Press.
- Pulliandre, N., T. F. Duda, C. Meyer, B. M. Olivera y P. Bouchet. 2015. One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Journal of Molluscan Studies*. 81:1-23
- Randall, A. D. 1998. The molecular basis of voltage-gated Ca^{2+} channel diversity: is it time for T? *J. Membr. Biol.* 161:207-13.
- Robinson, S. D. y R. S. Norton. 2014. Conotoxin Gene Superfamilies. *Mar. Drugs*. 12:6058-6101
- Roule, L. 1935. *Fishes and their ways of life*. W. W. Northon. Company Inc.
- Ruppert, E. E., R. D. Barnes. 1995. *Zoología de Invertebrados*. México D.F. McGraw-Hill International. 6th Ed
- Sharpe, I. A., J. Gehrmann, M. L. Loughnan, L. Thomas, D. A. Adams, A. Atkins, R. J. Lewis. 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the $\alpha 1$ -adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neuroscience*, 4 (9): 902-907.
- Shon, K. J., A. Hasson, M. E. Spira, L. J. Cruz, W. R. Gray y B. M. Olivera. 1994. δ -conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry* 33:11420-5
- Shon, K. J., M. Grilley, R. Jacobsen, E. Cartier, C. Hopkins, W. R. Gray, M. Watkins, D. R. Hillyard, J. Rivier, J. Torres, D. Yoshikami y B. M. Olivera. 1997. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry*. 36: 9581-9587.
- Shon, K., B. M. Olivera, M. Watkin, R. B. Jacobsen, W. R. Gray, C. Z. Floresca, L. J. Cruz, D. R. Hillyard, A. Bring, H. Terlau y D. Yoshikami. 1998. μ -conotoxin PIIIA a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J. Neurosci.* 18: 4473-4481.
- Terlau, H y B. M. Olivera. 2004. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*. 84(1):41-68.

- Terlau, H., M. Stocker, K. J. Shon, J. M. McIntosh y B. M. Olivera. 1996. μ O-conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels, but not through site I. *J Neurophysiol.* 76:1423-9.
- Thermo Scientific. 2009. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual. Thermo Fisher Scientific. Inc
- Varland, S., C. Osberg y T. Arnesen. 2015. N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biológicas effects. *Proteomics* 15,2385-2401.
- Wang, Ch-Z., y C-W. Chi. 2004. *Conus* peptides a rich pharmaceutical treasure. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36: 713-723.
- Wang, S., T. Du, Z. Liu, S. Wang, Y. Wu, J. Ding, L. Jiang, Q. Dai. 2014. Characterization of a T-superfamily conotoxin TxVC from *Conus textile* that selectively targets neuronal nAChR subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 454:1 151–156
- Woodward, S. R., L. J. Cruz, B. M. Olivera y D. R. Hillyard. 1990. Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO J* 9:1015-20

URL:

- Biodiversitymapping. Org. Diversidad del caracol *Conus*. Recuperada el 20 de septiembre de 2015 de: <http://www.biodiversitymapping.org/conus.htm>
- Bouchet, P. 2013. *Conus pacificus*. En: The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T192850A2174203. Recuperado el 9 de octubre de 2016 de: <http://www.iucnredlist.org/details/192850/0>
- Chemistry.about.com. Molecula de Acetilcolina. Recuperada el 10 de febrero de 2017 de: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---A/Acetylcholine.htm>
- Cole, B. 2016. *Calliostoma annulatum*. Recuperado el 3 de marzo de 2016 de: http://www.brandoncole.com/photos_molluscs.htm
- coneshell.net. *Conus fergusonii*. Recuperada el 30 de octubre de 2015 de: <http://www.coneshell.net/>
- Conoserver.org. Precursor de conopéptidos. Recuperada el 20 de noviembre de 2016 de: <http://www.conoserver.org/?page=classification&type=genesuperfamilies>
- Cunnings, B. 2001. Recuperada el 8 de abril de 2016 de: http://cs.brown.edu/people/tld/note/blog/13/04/19/figures/google_slides_with_video/cellular_recording_synaptic_transmission.jpg
- Dahl, H. 2016. Diagrama de morfología interna del gasterópodo. Recuperado el 3 de marzo de 2016 de: <http://images-mediawiki-sites.thefullwiki.org/03/1/6/7/8798767243165146.png>
- Elasmodiver.com. Pez torpedo. Recuperada el 20 de mayo de 2015 de: <http://www.elasmodiver.com/Sharkive%20images/MarbledTorpedoRay015.jpg>
- Flipper.diff.org. *Helix aspersa* Recuperada el 3 de marzo de 2016 de: <http://flipper.diff.org/app/items/info/5643>
- fossilshells.nl; *H. stromboides*. Recuperado el 15 de marzo de 2016 de: <http://www.fossilshells.nl/frparlutgast084.htmlmL>

- Freeman, W. H. 2016. Transmisión eléctrica entre las células. Recuperada el 4 de abril de 2016 de: <http://america.pink/images/9/4/5/7/8/3/en/3-chemical-synapse.jpg>
- idscaro.net. *Conus fergusonii*. Recuperada el 28 de octubre de 2015 de: http://www.idscaro.net/sci/08_perio/plates/species/conidae/conus_fergusonii.htm
- Ion Source. Programa. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de: www.ionsource.com
- IUCN, 2016. *Conus fergusonii*. Recuperado el 12 de noviembre de 2016 de: <http://www.iucnredlist.org/details/192566/0>
- Ling, R. 2016. *Hypselodoris obscura*, *Dendrodoris denisoni* y *Flabellina iodinea*. Recuperadas el 3 de marzo de 2016 de: <http://www.flickrriver.com/photos/riling/tags/opisthobranchia/>
- Passano, A. 2010. *Conus mediterraneus*. Recuperada el 20 de abril de 2016 de: http://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC_ID=119871
- piximus.net. *Ariolimax californicus*. Recuperada el 15 de marzo de 2016 de: <http://piximus.net/animals/banana-slug>.
- s3.vidimg.popscreen.com. *Conus geographus*. Recuperada el 25 de junio de 2016 de: http://s3.vidimg.popscreen.com/original/21/eG5uNzY3MTI=_o_le-conus-geographus-un-assassin-silencieux.jpg.
- Tenorio, M. J. 2013. *Conus fergusonii*. En: IUCN 2016. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T192566A2117478. Recuperado el 19 de septiembre de 2015 de: <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=192566>