



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

**DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA
CONOTOXINA α D-FrXXA EN RECEPTORES NICOTÍNICOS
DE ACETILCOLINA**

Tesis

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

PRESENTA:

M. en C. XIMENA CECILIA RODRIGUEZ RUIZ

TUTOR PRINCIPAL:

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

COMITÉ TUTOR:

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ,
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)
DRA. CECILIA ROBLES MENDOZA
FACULTAD DE CIENCIAS-UMDI, SISAL (UNAM)
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUÍMICA, SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM)

MÉXICO, CDMX, noviembre de 2022.



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.



DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA CONOTOXINA α D-FrXXA EN RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Doctora en Ciencias

Biología Marina

PRESENTA:

M. en C. XIMENA CECILIA RODRIGUEZ RUIZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA.

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ,

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

DRA. CECILIA ROBLES MENDOZA

FACULTAD DE CIENCIAS-UMDI, SISAL (UNAM)

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

UNIDAD DE QUÍMICA, SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM)

México, CDMX, noviembre de 2022.

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

El presente trabajo fue financiado gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IG200220, a los Proyectos Institucionales 615 y 406, 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 a la becaria 666534.

**Embrace your dreams and,
whatever happens,
protect your honor**

Zack Fair. CCFF7

DEDICATORIA

A mi mamá,

quien toda la vida ha pedido el poder verme terminar la etapa académica en que me encuentro.

¿Jamás te imaginaste que eso implicaría un doctorado, verdad, ma?

Reconozco que hubo momentos en lo que pensé que no llegaríamos juntas a este momento, pero todas tus oraciones dieron fruto y aquí estamos

A mi tía Ceci,

porque gracias a ti, mi mamá sigue a mi lado.

Y porque, aunque no fue por medicina,

espero que te llene de orgullo el saber que ya también puedo ser llamada Doctora

AGRADECIMIENTOS

Académicos

Al **Dr. Estuardo López** por permitirme y confiar en mí para seguir en el laboratorio una vez más y estudiar el Doctorado. Por hacer que pese a las altas y bajas, no pierda el amor por la ciencia. Mil gracias por todo el apoyo y amistad.

Al **Dr. Manuel Aguilar**, por apoyarme y enseñarme tanto a lo largo de este proyecto. De igual forma, gracias por permitirme la estancia en su laboratorio y las buenas pláticas que tuvimos durante ese tiempo.

A la **Dra. Judith Sánchez**, por toda la confianza que ha tenido en mí por tantos años, sus palabras de aliento y animo en todo momento (maestría, ingreso al doctorado, tutorales, candidatura y finalmente ahora), espero ser la profesionista que usted ve en mí y no decepcionarla jamás.

A la **Dra. Cecilia Robles**, por siempre animarme y estar interesada en mi investigación. Por hacerme aprender tanto al plantearme y cuestionarme enfoques que iban más allá del tema que estoy realizando.

Al **Dr. Sergio Rodríguez**, porque siempre me ha ayudado a que mi trabajo sea mejor. Porque cada vez que hablo con usted, me hace ver que hay mil y un posibilidades más a considerar y en cada una de ellas aprendo más y más.

A la **Dra. Mónica Ortiz Arellano**, por brindarnos los caracoles utilizados en el proyecto. En especial, por su amabilidad y por hacer de la salida de campo una de las mejores semanas de mi vida. No tiene idea de cuánto aprendí de usted.

Al personal de la Coordinación de Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología: **Lupita, Yazmin, Gaby** y en especial a **Diana** por las facilidades, paciencia y apoyo que me brindaron durante tantos años.

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.

Personales

A mi mamá **Carmen**, por todo el apoyo que siempre me brindas y la confianza ciega con la que sabes y me dices que las cosas van a salir bien. Por ser mi acompañante, taxi, asistente y banco de quejas, todo en uno y siempre tener una coquita lista para mí.

A mi papá **Gonzalo**, por todo el apoyo con el que siempre he contado para poder seguir estudiando y llegar hasta este punto.

A mi tía **Ceci**, por ser mi guía, apoyo, doctora y madre. Por ayudarme y escucharme todo el tiempo.

A mi tía **Lu**, mi tío **Oscar** y mi prima **Bere**, por todos los ánimos y cariño que siempre me brindan y el interés de saber cómo voy avanzando en el laboratorio

A **Leo**, porque, aunque no estudio tiburones, quiero ser un buen ejemplo para ti y poder ver tu sonrisa cada vez que preguntes algo y sepa responderte.

A mis “**Primos del cerrito**” porque estamos en mayor comunicación que antes y desde ahí siempre tengo su apoyo y comparten su alegría por cada uno de mis logros.

A **Zai**, hermana mía, por ser quien me apoya incondicionalmente en cada cosa que digo, que me dices “tu hazlo, tu puedes” así sea un doctorado con la misma facilidad como si fuéramos a ver una película y también porque entiendes mis ausencias.

A **Karime**, mi hermanita, por contar en todo momento con tu apoyo y ánimos, por escucharme, por las revisiones, ediciones, correcciones, ajustes y todo lo que se cruzó a través de este posgrado. Y por emocionarte tanto cuando te iba contando como se daban las cosas.

A **Jal**, hermano, por todas tus palabras y apoyo. La verdad si me he vuelto una mejor profesionalista, es gracias a ti y tus enseñanzas.

A mis queridos biólogos **David**, **Gerardo** y **Gary**, con quienes pasan los años y corroboro son mi familia, porque siempre se han interesado en mi proyecto, comparten mis alegrías y siempre están dispuestos a darme su guía y apoyo cuando les pregunto algo.

A **Roberto**, ya voy por la tercera (y sigo esperando la tuya). Chico, confío en que no lo olvides y ahora si grites buscando un Doctor.

A **Uribe** y **Villo**, porque a pesar de la distancia, sé que siguen están apoyándome

A **Luis**, porque tu genialidad me ha permitido aprender muchísimas cosas, gracias por toda la paciencia y el detalle con el que explicas y enseñas todo. Espero llegar a tener un poquito de esa genialidad.

A mis Reinas del Lab: **Elba**, por ser mi “big sis” y por todo tu cariño. **Angie**, por tu amistad por tantos años. **Haydee**, por siempre estar, escucharme y andar al pendiente de todo. **Mine**, por música (aunque no toda) y compañía, en especial en los momentos de decoración. **Lissa**, por tu apoyo y tus enseñanzas, aunque andes lejos. **Brenda**, por las risas y buenas pláticas.

De entre los alumnitos del taller, a **Dani** y **Kaori** porque me han mostrado cuanto más puedo aprender al estar yo enseñándoles.

A **Xóchitl**, señorita, usted es un ejemplo de bióloga para mí y espero estar a su nivel algún día

Nuevamente, a **Estuardo**, jefe muchísimas gracias por todo. En especial por todo tu apoyo en todas las situaciones familiares que se dieron durante este tiempo. Gracias por tu paciencia, la compañía y amistad a lo largo de todos estos años.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
2.1.	Género <i>Conus</i>	3
2.2.	Conotoxinas.....	7
2.2.1.	Clasificación de las conotoxinas.....	8
2.2.2.	α -conotoxinas. Superfamilia A.....	12
2.2.3.	α -conotoxinas. Otras superfamilias.....	13
2.2.3.1.	α S-conotoxinas.....	13
2.2.3.2.	α B3-conotoxinas.....	14
2.2.3.3.	α J-conotoxinas.....	14
2.2.3.4.	α M-conotoxinas.....	14
2.2.3.5.	α T-conotoxinas.....	15
2.2.3.6.	α C-conotoxinas.....	15
2.2.3.7.	α O1-conotoxinas.....	15
2.2.3.8.	α D-conotoxinas.....	15
2.3.	Acetilcolina y receptores de acetilcolina.....	16
2.3.1.	Acetilcolina.....	16
2.3.2.	Receptor nicotínico de acetilcolina.....	17
2.4.	<i>Conus fergusonii</i>	22
2.4.1.	Estudios previos de <i>C. fergusonii</i>	25
3.	JUSTIFICACIÓN.....	26
4.	HIPÓTESIS.....	27
5.	OBJETIVOS.....	28
5.1.	Objetivo general.....	28
5.2.	Objetivos particulares.....	28
6.	MATERIAL y MÉTODOS.....	29
6.1.	Material biológico.....	29
6.2.	Obtención del veneno.....	30

6.3.	Fraccionamiento del veneno total por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.....	31
6.4.	Subfraccionamientos del veneno por RP-HPLC	32
6.5.	Espectrometría de masas.....	32
6.6.	Determinación de la secuencia.....	33
6.6.1.	Método de Degradación de Edman.....	33
6.6.2.	Transcriptómica.....	34
6.7.	Reducción y alquilación parcial de cisteínas	34
6.7.1.	Método utilizado por Loughnan <i>et al.</i> , 2006	34
6.7.2.	Método utilizado por Aguilar <i>et al.</i> , 2006	34
6.8.	Reducción y alquilación total de cisteínas.....	35
6.8.1.	Método reportado por Aguilar <i>et al.</i> , 2006.....	35
6.8.2.	Protocolo elaborado para la reducción y alquilación total.....	35
6.9.	Propagación de subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina	36
6.10.	Transcripción <i>in vitro</i>	37
6.11.	Obtención de ovocitos.....	37
6.12.	Expresión heteróloga	39
6.13.	Ensayos electrofisiológicos	40
6.14.	Curva dosis respuesta	42
7.	RESULTADOS.....	43
7.1.	Fraccionamiento del 1er lote de veneno total.....	43
7.2.	Subfraccionamiento del 1er lote de veneno.....	44
7.3.	Determinación de los espectros de masas del 1er lote de veneno	46
7.4.	Secuenciación. Técnica de degradación de Edman.....	46
7.5.	Fraccionamiento del 2do lote de veneno total	47
7.6.	Identificación del péptido de interés en el 2do lote de veneno.....	50
7.7.	Secuenciación. Transcriptómica de <i>C. fergusonii</i>	54
7.8.	Estudio de similitud.....	55
7.9.	Reducción y alquilación parcial de cisteínas	56
7.9.1.	Método utilizado por Loughnan <i>et al.</i> , 2006.....	56
7.9.2.	Método usado por Aguilar <i>et al.</i> , 2006.....	58
7.10.	Reducción y alquilación total de cisteínas.	62

7.10.1.	Método usado por Aguilar <i>et al.</i> , 2006	62
7.10.2.	Método obtenido por la revisión de artículos	63
7.11.	Reducción total de cisteínas (Método obtenido por la revisión de artículos)	70
7.12.	Curva dosis-respuesta	74
8.	DISCUSIÓN.....	77
9.	CONCLUSIÓN	90
10.	PERSPECTIVAS	91
11.	BIBLIOGRAFÍA	92
12.	ANEXOS	101
12.1.	Anexo I.....	101
12.2.	Anexo II.....	102
12.3.	Anexo III.....	103
12.4.	Anexo IV	105
12.5.	Anexo V.....	106
12.6.	Anexo VI	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Ejemplos de conchas representativas de algunas especies de caracoles del género <i>Conus</i>	3
2	Distribución del género <i>Conus</i>	4
3	Diagrama del aparato venenoso de un caracol <i>Conus</i>	6
4	Organización del precursor de conopéptidos	8
5	Clasificación de las conotoxinas	11
6	Distribución de los distintos subtipos de RnACh en el cuerpo humano	18
7	Estructura del RnACh	19
8	Homómeros y heterómeros del RnACh	20
9	Distribución de los distintos subtipos de RnACh en el encéfalo de rata	21
10	Mapa de distribución de <i>Conus fergusonii</i>	23
11	Concha y diente radular del caracol de <i>C. fergusonii</i>	24
12	Concha de caracol <i>C. fergusonii</i>	29
13	Conducto venenoso disecado	30
14	Cultivo de células XL1-Blue	37
15	Microcirugía a hembra adulta de <i>Xenopus laevis</i>	38
16	Ovocitos de rana de <i>X. laevis</i> recién extraídos	38
17	Ovocitos de <i>X. laevis</i> después del tratamiento con colagenasa	39
18	Inyección de ovocito	40
19	Registro electrofisiológico	41
20	Perfil cromatográfico del veneno total de <i>Conus fergusonii</i>	43
21	Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F5 del veneno de <i>C. fergusonii</i>	44
22	Perfiles cromatográficos de los subfraccionamientos de F5.Sub7 y F5.Sub8	45
23	Secuencia parcial de aminoácidos de la fracción 8A obtenida por el principio de degradación de Edman	47
24	Perfiles cromatográficos del veneno total de <i>Conus fergusonii</i> , segundo lote disuelto en solución de extracción	48
25	Perfiles cromatográficos del veneno total de <i>Conus fergusonii</i> , segundo lote disuelto en fase móvil A	49
26	Perfiles cromatográficos del subfraccionamiento de I, J y K	52
27	Espectros de masas de los péptidos semi-purificados de dos de las fracciones activas	53
28	Transcriptómica de las α D-conotoxinas presentes en el veneno de <i>C. fergusonii</i>	55
29	Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación parcial de 5 nmol del péptido F5.Sub8	57
30	Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación parcial de 2.5 nmol del péptido K	59

31	Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación parcial de 10 nmol del péptido K	61
32	Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación total de 4 nmol del péptido K	62
33	Perfiles cromatográficos del blanco la reducción y alquilación total	64
34	Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación total de 5.5 nmol del péptido K	65
35	Perfiles cromatográficos de la reducción y alquilación total del péptido I	67
36	Perfiles cromatográficos de la reducción y alquilación total del péptido J	69
37	Perfiles cromatográficos del blanco la reducción total	71
38	Perfil cromatográfico de la reducción total de 2.89 nmol del péptido K	72
39	Perfil cromatográfico de la reducción total de 3.95 nmol del péptido I	73
40	Perfil cromatográfico de la reducción total de 3.78 nmol del péptido J	74
41	Curva dosis-respuesta del péptido K sobre el RnACh	75
42	Registro de corrientes de diferentes subtipos de RnACh antes y después de su incubación con [600 nM] del péptido α D-FrXXA	76
43	Comparación de los perfiles cromatográficos del péptido reducido y alquilado	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Categorías usadas para clasificar a las conotoxinas	9
2	Familias farmacológicas y sus blancos moleculares principales	10
3	Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras 7A, 7B, 8A y 8B	46
4	Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las señales equivalentes a la fracción F5 disueltas en solución de extracción y fase móvil A	50
5	Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras I, J, K1 y K2	54
6	Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras del péptido F5.Sub8 reducidas y alquiladas parcialmente por el método usado por Loughnan <i>et al.</i> , 2006	58
7	Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras reducidas y alquiladas parcialmente del péptido K por el método usado por Aguilar <i>et al.</i> , 2006	60
8	Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras reducidas y alquiladas parcialmente del péptido K por el método usado por Aguilar <i>et al.</i> , 2006	61
9	Concentraciones del péptido K utilizadas para obtener la IC ₅₀ de cada subtipo de RnACh	75
10	Pesos moleculares desconvolucionados de 7A, 7B, 8A y 8B	77
11	Conotoxinas que presentan el arreglo de cisteínas tipo XXIV	80
12	IC ₅₀ de α D-FrXXA en diferentes subtipos de RnACh	87
13	IC ₅₀ de α D-conotoxinas con actividad sobre RnACh	89

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
[N]	Concentración normal
°C	Grados Celsius
μl	Microlitros
μm	Micrometros
4-VP	4-vinil piridina
5-HT3	Receptores de serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BLASTp	Blast protein
C	Cisteína
C.	<i>Conus</i>
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CarAT	Carnitina acetiltransferasa
ChAT	Colina acetiltransferasa
CHCA	Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico
CONABIO	Comisión Nacional de la Biodiversidad
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
Cys	Cisteína
Da	Daltones
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Ionización electrospray
GABA	Ácido γ-aminobutírico
H	Hidrógeno
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
K	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilo daltones
M	Concentración molar
m/z	Masa/carga
mAU	Mili unidades de absorbancia
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mV	Milivolts

Na	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NEM	N-etilmaleimida
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nmol	Nanomol
N-terminal	Extremo amino terminal
P	Prolina
PM	Peso molecular
pmol	Picomol
R	Arginina
RE	Retículo endoplásmico
RnACh	Receptor nicotínico de acetilcolina
RP-HPLC	Reverse Phase-High Liquid Chromatography
S	Serina
SF	Superfamilia
T	Treonina
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Tiempo de vuelo (time of flight)
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
UV	Ultravioleta
WoRMS	World Register of Marine Species
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
α-	Alfa-

RESUMEN

Se aisló una nueva conotoxina dimérica con actividad inhibidora sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina de tipo neuronales. La degradación de Edman y los estudios transcriptómicos indican que se trata de una conotoxina homodimérica compuesta por dos cadenas de 47 aminoácidos. Tiene un arreglo de cisteínas tipo cisteína XX y 10 enlaces disulfuro. Según la nomenclatura de las conotoxinas, se ha denominado α D-FrXXA. La conotoxina α D-FrXXA inhibió la respuesta inducida por la ACh en el RnACh con una IC_{50} de 125 nM en el subtipo $\alpha 7$, de 282 nM en el $\alpha 3\beta 2$, de 607 nM en el $\alpha 4\beta 2$, de 351 nM en el muscular adulto de ratón y de 447 nM en el muscular fetal de ratón. Esta es la primera toxina caracterizada de *C. fergusonii* y, al mismo tiempo, la segunda α D-conotoxina caracterizada de una especie del Pacífico Oriental.

ABSTRACT

We isolated a new dimeric conotoxin with inhibitory activity against neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Edman degradation and transcriptomic studies indicate a homodimeric conotoxin composed by two chains of 47 amino acid in length. It has the cysteine framework XX and 10 disulfide bonds. According to conotoxin nomenclature, it has been named as α D-FrXXA. The α D-FrXXA conotoxin inhibited the ACh-induced response on nAChR with IC_{50} of 125 nM on $\alpha 7$, 282 nM on $\alpha 3\beta 2$, 607 nM on $\alpha 4\beta 2$, 351 nM on mouse adult muscle, and 447 nM on mouse fetal muscle. This is first toxin characterized from *C. fergusonii* and, at the same time, the second α D-conotoxin characterized from a species of the Eastern Pacific.

1. INTRODUCCIÓN

El humano siempre ha tenido un interés nato en estudiar aquello que lo rodea, es por ello que los organismos terrestres fueron los primeros en ser estudiados debido a su facilidad de acceso, colecta y, en muchos casos, gracias a que es sencillo cultivarlos (Dias, *et al.*, 2012). Con ello, se ha logrado purificar o sintetizar una amplia variedad de compuestos que han tenido un gran interés para la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica, etc. (Dias, *et al.*, 2012).

Por su parte, por mucho tiempo, el estudio del ambiente marino estuvo limitado a lo que se podía conseguir en las costas o atrapar con diferentes artes de pesca (Cifuentes *et al.*, 1987). Pero muchas veces, al estar los organismos muertos, los compuestos se degradaban o se afectaba su naturaleza. Sin embargo, gracias a Jacques-Yves Cousteau, quien brindó nuevas técnicas y artes para inmersión, se inició la modernización del estudio oceánico (Biography.com, 2019). Esto, sumado a las nuevas tecnologías, nos ha permitido considerar a los océanos como una de las mayores reservas para encontrar compuestos de interés, principalmente el farmacológico (Dias, *et al.*, 2012).

Actualmente, los caracoles del género *Conus* han llamado el interés de la comunidad científica ya que sintetizan su propio veneno y en él, encontramos una amplia variedad de toxinas llamadas conotoxinas que gozan de gran interés farmacológico (Terlau y Olivera, 2004; López-Vera, 2010). Su estudio bioquímico comenzó en 1985 con la especie *Conus geographus* (Olivera *et al.*, 1985) y, desde entonces, su conocimiento se ha ampliado de manera asombrosa, habiendo varios países que cuentan con grupos de estudio exclusivos para ellas; México es uno de ellos.

Casewell *et al.*, 2012, mencionan que los sistemas de veneno proporcionan modelos para investigar las interacciones depredador/presa, la influencia de la selección natural y la evolución natural. En el caso de los caracoles *Conus*, esto se refleja en la diversidad, abundancia y/o efectividad de los componentes de su veneno ya que cada especie tiene un veneno diferente, lo que hará que en cada una se encuentren conotoxinas distintas.

De entre los canales iónicos y receptores de membrana sobre los que actúa el veneno de *Conus*, se sabe que cada especie de caracol secreta, al menos, una conotoxina

con actividad sobre el receptor nicotínico de acetilcolina (RnACh), lo que garantiza la obtención de conotoxinas sobre este blanco molecular. Hasta el momento, se ha reportado un agonista para este receptor, pero existen al menos, 64 conotoxinas que son antagonistas de los diferentes subtipos del RnACh, las cuales pueden interactuar con el receptor de forma ortostérica como sucede con la mayoría de las α -conotoxinas o bien de forma alostérica como ocurre en el caso de las α D-conotoxinas (Jin *et al.*, 2014; López-Vera y Flores-Torres, 2016; Prashanth *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1. Género *Conus*

Los caracoles del género *Conus*, conocidos como caracoles Cono, forman parte de la superfamilia de invertebrados marinos más diversa y taxonómicamente compleja llamada Conoidea (Olivera, 2002; Lewis, 2009; Fallon, 2016). Son un grupo de moluscos marinos cuyo registro fósil indica que existen desde hace 55 millones de años y, muchas especies se han extinguido durante este tiempo y otras más han surgido; sin embargo, se calcula que la actual población de *Conus* tiene alrededor de 800 especies, volviéndolo el género de invertebrados marinos con mayor cantidad de organismos vivos (Mari y Tytgat, 2010; Fallon, 2016; Prashanth *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017).

Por mucho tiempo, los caracoles Cono han sido de interés para coleccionistas debido a lo hermoso de sus conchas; las diferencias en la morfología, patrones y color de estas permiten su identificación a nivel de especie (Figura 1). Sin embargo, la concha puede presentar variaciones regionales e intraespecíficas que hacen más difícil su identificación (Marshall *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2017).



Figura 1. Ejemplos de conchas representativas de algunas especies de caracoles del género *Conus*.

Los *Conus* se encuentran distribuidos principalmente en todos los ambientes marinos tropicales y subtropicales de todo el mundo (Figura 2) (Olivera, 2002). La mayor riqueza predomina en la región del Indo-Pacífico con más del 60% de su hábitat en esta zona. Sin embargo, se hallan en el continente americano, en el Pacífico Oriental, desde el sur de California hasta Perú, y en el Atlántico Occidental, desde Florida hasta el Río de la Plata (norte de Argentina), incluido el mar Caribe. También están en la costa occidental de África y una especie habita el Mar Mediterráneo (Mari y Tytgat, 2010; Gao *et al.*, 2017).

Solo unas pocas especies, como *C. californicus* (costa del Pacífico en Norteamérica) se han adaptado a aguas más frías, pero en general, la diversidad de especies desciende bruscamente fuera de los trópicos (Prashanth *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017).

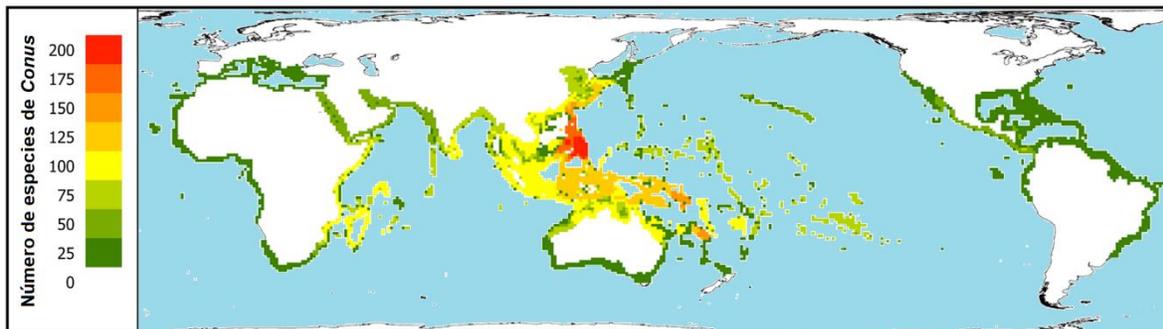


Figura 2. Distribución del género *Conus*. En color se ilustra la diversidad de especies localizada por zona (Modificado de Peters *et al.*, 2013).

La información respecto a la abundancia real de *Conus*, es poca. De un total de 632 especies registradas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) se incluye a 41 especies dentro las categorías de “*vulnerable*”, “*en peligro*” o “*en peligro crítico*”. Como “*preocupación menor*”, a 478 especies y como “*datos insuficientes*” a 87 especies (Peters *et al.*, 2013).

Se sabe que los *Conus* son animales muy adaptables y están en una gran variedad de hábitats. Son organismos bentónicos que habitan zonas arenosas o entre las rocas; el 53.6% de los *Conus* se encuentran en la zona intermareal a menos de 5 metros de profundidad, un 27% hasta los 50 metros, e incluso, hay algunas excepciones a más de

500 metros (Kohn 1959, 1985; Kohn y Nybakken, 1975; Mari y Tytgat, 2010; Peters *et al.*, 2013). Una característica es que contribuyen sustancialmente a la gran biodiversidad de los entornos arrecifales; un solo arrecife de coral en el Indo-Pacífico tropical puede tener más de 30 especies de *Conus* (Kohn, 1998; Kohn *et al.*, 2001; Olivera, 2002). Respecto a su tamaño, pueden ser tan grandes como 250 mm (*Conus pulcher*, especie de África occidental) o tan pequeños como 4 mm (*Conus sahlbergi*, especie de las Bahamas) (Mari y Tytgat, 2010).

Además, son un grupo numeroso y exitoso de depredadores carnívoros marinos que están muy especializados en cuanto a la captura de sus presas, las cuales suelen clasificarse en tres grupos en función de sus hábitos alimentarios (Kohn, 1966; Olivera, 2002; Buczek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2012; Prashanth *et al.*, 2016):

 **Conus vermívoros**; son el primer y más grande grupo, se alimentan de varios tipos de gusanos, principalmente poliquetos, aunque también se incluyen equiuroides y hemicordados.

 **Conus moluscívoros**; son el segundo grupo, se alimentan de otros moluscos gasterópodos o bivalvos.

 **Conus piscívoros**; son el tercer grupo, y el más sorprendente ya que capturan peces que pueden ser de mayor tamaño que ellos y lo hacen por técnicas de arpón y sedal o bien pesca con red.

Algunas especies como *C. californicus*, que habita aguas más frías y no tiene congéneres con los que competir, son generalistas (Kohn, 1966; Olivera, 2002).

Los caracoles como se mueven con lentitud en un entorno donde sus presas son rápidas y esto hace que la supervivencia de estos depredadores sea un gran reto. Además, deben interactuar con sus competidores y reducir su exposición a la depredación por parte de peces u organismos más grandes (Lewis, 2009; Gao *et al.*, 2017).

Durante mucho tiempo, han sido de interés las estrategias altamente evolucionadas que emplean para asegurar, en cuestión de segundos, la captura de sus presas. Para compensar la falta de movilidad han desarrollado, como adaptación evolutiva, un aparato venenoso muy sofisticado, responsable de la síntesis, el almacenamiento y el suministro de un potente veneno, el cual bioquímicamente, posee una enorme e inusualmente compleja

diversidad de toxinas (Terlau *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 2002; Himaya *et al.*, 2015; Olivera *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017).

El aparato venenoso incluye (Figura 3) (Terlau *et al.*, 1996; Olivera, 2002):

- 🐌 **Conducto venenoso**; es largo y tubular; en las células epiteliales que lo recubren se sintetizan los componentes biológicamente activos del veneno.
- 🐌 **Bulbo venenoso**; es aquel que expulsa por medio de contracciones el veneno contenido en el conducto hacia el saco radular.
- 🐌 **Saco radular**; es donde se almacenan las rádulas modificadas y donde son cargadas de veneno.
- 🐌 **Dientes radulares (arpones)**; son rádulas modificadas y especializadas a modo de diente hueco en forma de arpón que se utilizan como aguja hipodérmica para inyectar el veneno en el tejido blando de los animales. También, se utilizan para la taxonomía de *Conus* ya que son anatómicamente distintos entre grupos.
- 🐌 **Probóscide**; se encarga de “cargar” al arpón previo a ser disparado.

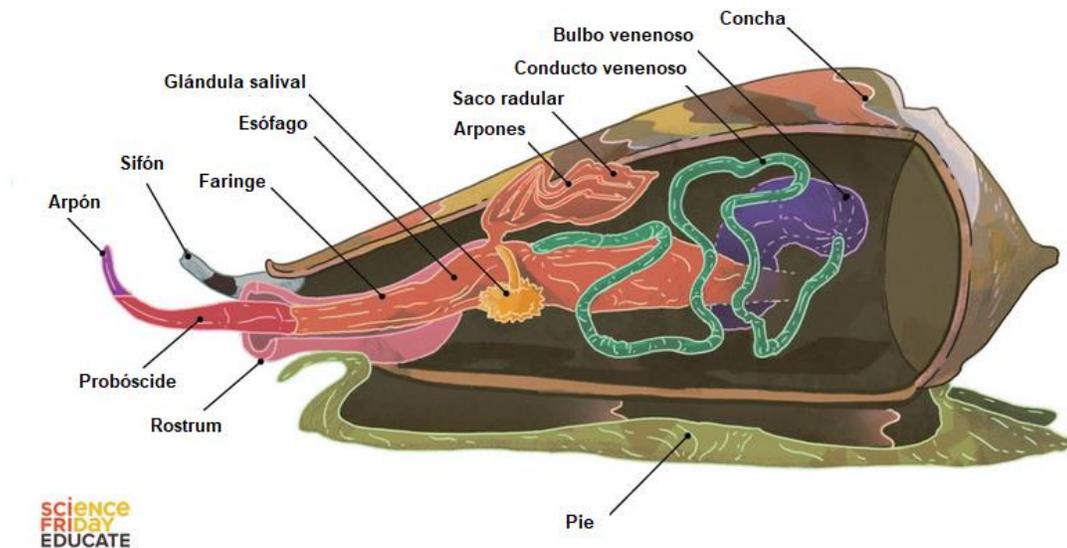


Figura 3. Diagrama del aparato venenoso de un caracol *Conus* (Imagen modificada de Science Friday Educate, 2018).

Todas las especies de *Conus* utilizan veneno como parte de una estrategia bioquímica para inmovilizar y capturar a sus presas; cada especie produce grandes cantidades de un rico cóctel de péptidos, comúnmente denominados conopéptidos o conotoxinas (Olivera, 2002; Mari y Tytgat, 2010).

2.2. Conotoxinas

La composición exacta del veneno del caracol Cono es específica de cada especie y presenta una importante variabilidad intraespecífica. El primer componente activo identificado en el veneno de un *Conus* fue la serotonina en 1972 (Cottrell y Twarog, 1972; Mari y Tytgat, 2010).

La mayor parte del veneno de los *Conus* es una compleja mezcla de péptidos con características únicas; cada especie suele poseer de 20 a 200 componentes. Por ello, considerando la cantidad de especies, se calcula que existen más de 80,000 conotoxinas naturales (Mari y Tytgat, 2010; Gao *et al.*, 2017).

Todas las conotoxinas se traducen en el conducto venenoso a partir del ARNm como precursores peptídicos o prepropéptidos; se procesan en toxinas maduras en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi. La organización de una conotoxina se muestra en la Figura 4. Durante el proceso de maduración, la secuencia de señal del RE y, a continuación, las regiones pro N- y C-terminales se escinden para dar paso a la toxina biológicamente activa; sin embargo, algunos aminoácidos pueden ser modificados postraduccionalmente. La región del prepropéptido cuenta con aproximadamente de 80 a 100 aminoácidos y, la región del péptido o toxina madura (siempre en una sola copia) tiene, en la mayoría de las conotoxinas caracterizadas, una longitud de entre 10 a 30 aminoácidos; sin embargo, existen casos donde son más grandes (Terlau y Olivera, 2004; Buczek *et al.*, 2005; ConoServer, 2022).



Figura 4. Organización del precursor de conopeptidos. La toxina ejemplificada es SmIVA (Modificado de ConoServer, 2022)

Las conotoxinas de un veneno pueden correlacionarse con parámetros ecológicos y de comportamiento. Por una parte, la divergencia funcional y la información molecular han corroborado la relación de la potencia del veneno de una especie con el tipo de presa de la que se alimenta (peces, gusanos o moluscos); esto indica que las conotoxinas están bajo presión selectiva para desarrollar una alta afinidad por el objetivo fisiológicamente relevante (Endean *et al.*, 1974, Olivera, 2002). Por otra, existen las combinaciones sinérgicas conocidas como cabales, los cuales utilizan distintos cócteles de toxinas en un veneno que provocan una amplia gama de fuertes respuestas neurofisiológicas en una variedad de organismos, ya sea para la captura de presas (siendo los primeros cabales en descubrirse) o para la defensa de sus depredadores (pulpos, cangrejos y peces). Esto se logra compartimentando al conducto venenoso en sección distal (depredación) y proximal (defensa); sin embargo, el veneno que será utilizado puede cambiar rápidamente dependiendo de los estímulos recibidos por el caracol, sus necesidades y el tipo de respuesta que necesite (Terlau *et al.*, 1996; Olivera y Cruz, 2001; Marshall *et al.*, 2002; Dutertre *et al.*, 2014; Prashanth *et al.*, 2016).

2.2.1. Clasificación de las conotoxinas

Para poder clasificar las conotoxinas, se han considerado diferentes aspectos que pueden ser desde los que se basan únicamente en su secuencia hasta los que se basan en una mezcla de secuencia y propiedades estructurales, pasando por los que consideran la funcionalidad específica *in vivo* (Tabla 1) (Kaas *et al.*, 2010; Akondi *et al.*, 2014; Mansbach *et al.*, 2019). Algunos pueden determinarse más fácilmente que otros una vez

que se cuenta con el conocimiento de su secuencia (como la superfamilia genética y el arreglo de cisteínas).

Tabla 1. Categorías usadas para clasificar a las conotoxinas (Modificado de Mansbach *et al.*, 2019).

Categoría	Tipo	Descripción
Superfamilia genética	Secuencia	Grupo en la región precursora
Arreglo de cisteínas	Secuencia	Arreglo de cisteínas
Clase de bucle	Secuencia	Número de aminoácidos entre cisteínas
Conectividad de disulfuros	Estructura	Patrón en la formación de enlaces disulfuro
Familia farmacológica	Acción	Blanco molecular y modo de acción

Las clasificaciones más conocidas e importantes al momento de nombrar a una conotoxina son:

-  Superfamilia genética.
-  Arreglo de cisteínas.
-  Familia farmacológica.

La superfamilia genética es una clasificación evolutiva basada en la parte de toxina que presenta una evolución lenta, es decir, la proteína precursora procesada por el retículo endoplásmico. Actualmente, existen 30 superfamilias genéticas (A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N, O1, O2, O3, P, Q, R, S, T, U, V, Y, y las conodipinas) y, a su vez, cada una puede dividirse en varias familias de acuerdo con sus arreglos de cisteína (Robinson y Norton, 2014; Mansbach *et al.*, 2019).

El resto de las clasificaciones, utilizan a las toxinas maduras, las cuales presentan una diversidad estructural y funcional de acuerdo con la alta variación en las secuencias descubiertas en el veneno (Kaas *et al.*, 2012; Robinson y Norton, 2014).

El arreglo de cisteínas es una característica clave de las conotoxinas ya que es altamente conservado, su clasificación se basa en la secuencia de aminoácidos y se refiere al patrón de cisteínas adyacentes y no adyacentes en la secuencia (Kaas *et al.*, 2010; Akondi *et al.*, 2014). Actualmente existen 28 tipos de arreglos de cisteínas (I – XXVIII) catalogados en ConoServer los cuales pueden tener desde 2 hasta 10 residuos de cisteínas.

Entre los residuos de cisteína presentes en la toxina madura se forman puentes disulfuro que sirven para dar estabilidad a la estructura secundaria; dependiendo de la conotoxina y su cantidad de cisteínas puede existir uno o más puentes disulfuro (Jin *et al.*, 2019).

La familia farmacológica agrupa a las conotoxinas en función de su blanco molecular y las actividades farmacológicas correspondientes (Dutertre *et al.*, 2013). Sus estructuras y funciones son muy diversas y se dirigen principalmente a las proteínas de membrana; en particular a canales iónicos, receptores de membrana y transportadores (Gao *et al.*, 2017). Actualmente se reconocen 12 familias que son denominadas con letras del alfabeto griego (Tabla 2) (Kaas *et al.*, 2012).

Tabla 2. Familias farmacológicas y sus blancos moleculares principales (Modificada de Mansbach *et al.*, 2019).

Familia	Blanco
α (alpha)	Receptores nicotínicos de acetilcolina
γ (gamma)	Corrientes de cationes marcapasos neuronales
δ (delta)	Canales de sodio dependientes de voltaje
ε (epsilon)	Canales de calcio presinápticos o receptores presinápticos acoplados a proteínas G
ι (iota)	Canales de sodio dependientes de voltaje
κ (kappa)	Canales de potasio dependientes de voltaje
μ (mu)	Canales de sodio dependientes de voltaje
ρ (rho)	Receptores adrenérgicos alfa-1
σ (sigma)	Canales iónicos activados por serotonina
τ (tau)	Receptor de somatostatina
χ (chi)	Transportador neuronal de noradrenalina
ω (omega)	Canales de calcio activados por voltaje

De las de 6,000 secuencias reportadas en ConoServer, solo 243 de ellas tienen una familia farmacológica asociada. En parte, esto se debe a que, durante los últimos 10 años, la mayoría de las conotoxinas se han descubierto a través de la secuenciación del transcriptoma del conducto del veneno y, el mecanismo de acción de una toxina no es algo que pueda determinarse fácilmente a partir de la secuencia, requiere mucha mayor experimentación (Kaas *et al.*, 2012; Mansbach *et al.*, 2019).

Finalmente, el saber cómo se cataloga una conotoxina en un esquema de clasificación no es indicativo de su categorización bajo otro (Mansbach *et al.*, 2019). Por ejemplo, un arreglo de cisteínas no está limitado a pertenecer a una única familia farmacológica y, un blanco farmacológico no se limita a una superfamilia. Como se puede observar en la Figura 5 existen arreglos de cisteína como el XIV que se encuentra en las Superfamilias A, D, J, L y M o bien, familias farmacológicas que también se encuentran en diferentes Superfamilias.

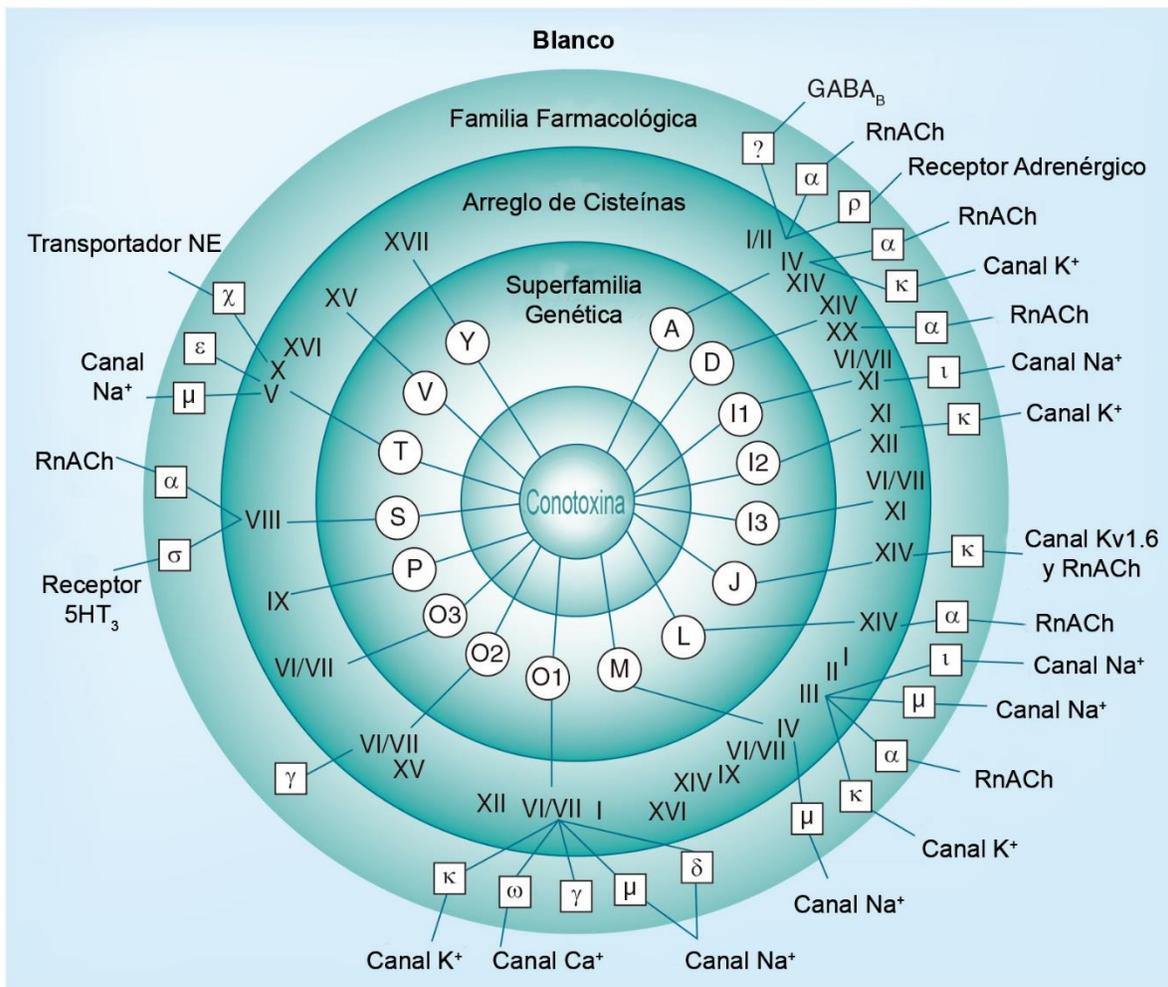


Figura 5. Clasificación de las conotoxinas. Esquema de la clasificación basada en la superfamilia, el arreglo de cisteínas y el blanco molecular (Imagen modificada de Schroeder y Craik, 2012).

Las conotoxinas, al ser secuencias cortas y relativamente fáciles de sintetizar, han sido de interés para la investigación neurocientífica debido a la eficacia que presentan para distinguir entre diferentes blancos moleculares, además de contar con un potencial uso farmacológico (Lewis *et al.*, 2003; Robinson y Norton, 2014; Gao *et al.*, 2017).

2.2.2. α -conotoxinas. Superfamilia A

Entre las primeras toxinas aisladas del veneno de *Conus* se encuentran las α -conotoxinas. En 1981, el equipo del Dr. Olivera y colaboradores, purificó y caracterizó bioquímicamente la primera α -conotoxina. Desde entonces se ha obtenido gran información sobre ellas (Gray *et al.*, 1981; Arias, 2000).

Las α -conotoxinas son una clase de conotoxinas grande y creciente de antagonistas competitivos específicos de los subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh) musculares o neuronales; es decir compiten por los sitios de unión de la acetilcolina y los agonistas colinérgicos (Nicke *et al.*, 2004). Son llamadas así porque tienen el mismo sitio de acción que las α -neurotoxinas aisladas del veneno de serpiente que se dirigen al RnACh. Hasta el momento se tienen 45 α -conotoxinas pertenecientes a la Superfamilia A, reportadas a partir de 23 especies diferentes (Nicke *et al.*, 2004; Terlau y Olivera, 2004; Kaas *et al.*, 2008).

Suelen tener un tamaño pequeño, de entre 12 y 20 aminoácidos y contienen cuatro cisteínas conectadas por dos enlaces disulfuro. Se han caracterizado varias subfamilias de α -conotoxinas dependiendo de la cantidad de residuos de aminoácidos que hay entre la segunda y tercera cisteína y entre la tercera y cuarta (Luo *et al.*, 1998; Terlau y Olivera, 2004).



α 4/7-conotoxinas; actúan como antagonistas sobre todos los subtipos de receptor ya sean musculares o bien los neuronales homoméricos o heteroméricos (estos se detallarán más adelante).



α 3/5-conotoxinas; actúan como antagonistas sobre los subtipos musculares, siendo capaces de diferenciar entre los dos sitios de unión. Se encuentran en la mayoría de las especies piscívoras.

 **α 4/3-conotoxinas;** actúan como antagonistas sobre los subtipos neuronales. Se encuentran en especies vermívoras.

 **α 4/4-conotoxinas;** actúan como antagonistas sobre subtipos neuronales.

 **α 4/6-conotoxinas;** actúan como antagonistas sobre subtipos neuronales.

De acuerdo a la conectividad que pueden presentar con los puentes disulfuro, existen tres isoformas conocidas (Gehrmann *et al.*, 1998; Schroeder y Craik, 2012):

 **Globulares;** (CysI-CysIII y CysII-CysIV).

 **Listón;** (CysI-CysIV y CysII-CysIII).

 **Rosario;** (CysI-CysII y CysIII-CysIV); esta no se encuentra de forma nativa, solo se ha realizado sintéticamente.

Pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos de la conotoxina pueden alterar la especificidad que presenta sobre algún subtipo en especial o bien, dirigirse al mismo subtipo, pero en sitios diferentes de este (Mari y Tytgat, 2010).

2.2.3. α -conotoxinas. Otras superfamilias

La mayoría de las α -conotoxinas pertenecen a la superfamilia A, sin embargo, se han identificado como parte de otras superfamilias que se mencionan a continuación (Jimenez y Cruz, 2017; Abraham y Lewis, 2018):

2.2.3.1. α S-conotoxinas

Dentro de la superfamilia S es donde se encontró el primer inhibidor de RnACh aislado de una superfamilia no -A. La familia α S de conotoxinas tiene un arreglo de cisteínas C-C-C-C-C-C-C-C. A la fecha, se han identificado dos conotoxinas (Teichert *et al.*, 2005; Christensen *et al.*, 2015; ConoServer, 2022):

 **α S-RVIII A** de *C. radiatus* que es un péptido de 47 aminoácidos con 10 cisteínas; presenta actividad inhibitoria sobre los subtipos musculares de forma irreversible, pero en los neuronales de forma reversible.



α S-GVIIIA de *C. geographus*, es un péptido de 45 aminoácidos con 10 residuos de cisteína; presenta actividad inhibitoria sobre el subtipo α 9 α 10.

2.2.3.2. α B3-conotoxinas

La familia α B3 de conotoxinas tiene un arreglo de cisteínas C-CC-C y solo hay una conotoxina caracterizada (Luo *et al.*, 2013; ConoServer, 2022).



α -VxXXIVA de *C. vexillum*, es un péptido de 40 aminoácidos con 4 residuos de cisteína y presenta actividad inhibitoria sobre el subtipo α 9 α 10.

2.2.3.3. α J-conotoxinas

Dentro de la familia α J de conotoxinas está la primera conotoxina caracterizada con actividad inhibitoria en un canal iónico activado por voltaje y en un receptor ligando dependiente, tiene un arreglo de cisteínas C-C-C-C (Imperial *et al.*, 2006; ConoServer, 2022).



PIXIVA de *C. planorbis*, es un péptido de 26 aminoácidos con 4 residuos de cisteína; presenta actividad inhibitoria sobre el canal de potasio K_v1.6 y sobre los subtipos muscular y neuronal α 3 β 4 del RnACh.

2.2.3.4. α M-conotoxinas

La familia α M también presenta una conotoxina que tiene actividad inhibitoria para un canal iónico activado por voltaje y para un receptor ligando dependiente, tiene un arreglo de cisteínas CC-C-C-CC (Favreau *et al.*, 2012; ConoServer, 2022).



α CnIIIC de *C. consors* es un péptido de 23 aminoácidos con 4 residuos de cisteína; tiene actividad inhibitoria sobre los canales de sodio Na_v 1.2 y 1.4 y sobre el subtipo neuronal α 3 β 4 del RnACh.

2.2.3.5. α T-conotoxinas

La familia α T de conotoxinas tienen un arreglo de cisteínas CC-CC y cuenta con una conotoxina (Wang *et al.*, 2014; ConoServer, 2022).

 **α TxVC** de *C. textile*, es un péptido de 14 aminoácidos con 4 residuos de cisteína y presenta actividad sobre los subtipos α 4 β 2 y α 3 β 2.

2.2.3.6. α C-conotoxinas

La familia α C de conotoxinas tiene un arreglo de cisteína C-C teniendo como peculiaridad el poseer un solo puente disulfuro, hasta hoy solo se ha caracterizado una conotoxina (Jiménez *et al.*, 2007; ConoServer, 2022).

 **α C-PrXA** de *C. parius*, es un péptido de 32 aminoácidos con 2 residuos de cisteína; presenta actividad inhibitoria sobre los dos subtipos musculares.

2.2.3.7. α O1-conotoxinas

La familia α O de conotoxinas presenta una conotoxina que tiene un arreglo de cisteínas C-C-C-C (Luo *et al.*, 2015; ConoServer, 2022).

 **α O-GeXIVA** de *C. generalis*, es un péptido de 28 aminoácidos con 4 residuos de cisteína; presenta actividad sobre el subtipo α 9 α 10.

2.2.3.8. α D-conotoxinas

La familia α D de conotoxinas tiene un arreglo de cisteínas C-CC-C-CC-C-C-C-C, su característica principal es que forman dímeros (homo-, pseudohomo- y heterodímeros). Actualmente se han caracterizado 7 conotoxinas.

- 
 α D-VxXIIA, α D-VxXIIB y α D-VxXIIC de *C. vexillum*, sus cadenas monoméricas son de 47 aminoácidos y 10 residuos de cisteína; presentan actividad sobre los subtipos α 7, α 3 β 2 y α 4 β 2 (Loughnan *et al.*, 2006).
- 
 α D-Cp de *C. capitaneus*, es un péptido cuya cadena monomérica es de 48 aminoácidos y 10 residuos de cisteína; presenta actividad sobre los subtipos α 7, α 3 β 2 y α 4 β 2 (Kaufenstein *et al.*, 2009).
- 
 α D-Ms de *C. mustelinus*, es un péptido cuya cadena monomérica es de 48 aminoácidos y 10 residuos de cisteína; presenta actividad sobre los subtipos α 7, α 3 β 2 y α 4 β 2 (Kaufenstein *et al.*, 2009).
- 
 α D-GeXXA de *C. generalis*, es un péptido cuya cadena monomérica es de 46 aminoácidos y 10 residuos de cisteína; presenta actividad sobre el subtipo α 9 α 10 (Yang *et al.*, 2017).
- 
 α D-PiXXA de *C. princeps*, es un péptido cuya cadena monomérica es de 50 aminoácidos y 10 residuos de cisteína; presenta actividad sobre el subtipo α 7 (Hernández-Sámano *et al.*, 2019).
- 
 α D-FrXXA de *C. fergusonii*, la cual se detalla en el presente trabajo.

2.3. Acetilcolina y receptores de acetilcolina

2.3.1. Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor conocido en los sistemas nervioso central y periférico de vertebrados e insectos. La mayoría del conocimiento sobre su síntesis y metabolismo deriva de su estudio en mamíferos (Tuček, 1982; Tuček, 1988).

Se sintetiza principalmente por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) en el sistema nervioso central, y tanto por ChAT como por la carnitina acetiltransferasa (CarAT) en el sistema periférico. Se degrada por la acetilcolinesterasa (AChE) en las uniones neuromusculares y neuroefectoras, y por la butirilcolinesterasa, conocida como colinesterasa, en plasma, hígado y elementos neuronales (Tuček, 1982; Tuček, 1988).

Además, se ha identificado en varios tejidos no neuronales de especies de mamíferos, como lo son linfocitos, epitelios mucocutáneos, células epiteliales

gastrointestinales, respiratorias y urogenitales, placenta, células amnióticas y células endoteliales vasculares (Horiuchi, 2003).

2.3.2. Receptor nicotínico de acetilcolina

Los receptores nicotínicos de acetilcolina son miembros de la superfamilia de receptores de asa de cisteína (Cys-loop) que son ligando dependientes a neurotransmisores, en los que se incluyen los receptores de serotonina (5-HT₃, 5-hidroxitriptamina), el de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) el de GABA_{A-C} (ácido γ -aminobutírico) y el de glicina, que participan en una variedad de funciones fisiológicas, incluida la regulación de la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores (Wu y Lukas, 2011; Dineley *et al.*, 2015).

Jean-Pierre Changeux realizó el aislamiento, purificación y secuenciación de la proteína correspondiente al RnACh muscular del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata*. Desde entonces, comenzó un mayor y riguroso estudio sobre este receptor (Changeux *et al.*, 2009).

Están ampliamente distribuidos en todo el sistema nervioso central y periférico; así como en el sistema inmunitario y diversos tejidos periféricos (Wu y Lukas, 2011; Dineley *et al.*, 2015) (Figura 6).

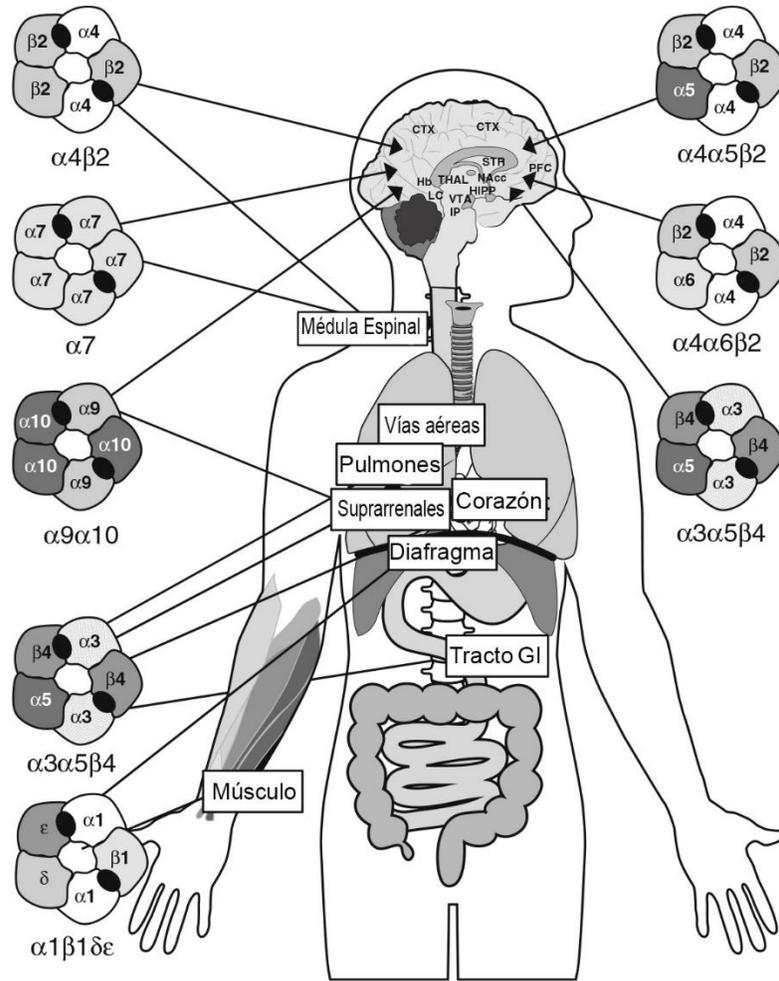


Figura 6. Distribución de los distintos subtipos de RnACh en el cuerpo humano (Imagen modificada de Rollema *et al.*, 2015).

Los receptores nicotínicos se componen de: cinco subunidades que constan de 450 a 700 aminoácidos, un largo dominio extracelular N-terminal, cuatro dominios o hélices transmembrana de unos 20 aminoácidos cada uno denominados M1, M2, M3 y M4, un largo dominio citoplasmático y un dominio extracelular C-terminal (Changeux *et al.*, 2009; Mari y Tytgat, 2010). Los dominios extracelulares de las cinco subunidades se pliegan y ensamblan en el dominio extracelular hidrofílico formando así el sitio de unión a ACh, siendo los segmentos M2 lo que quedan en la cara interna del receptor y forman el poro del canal (Figura 7) (Changeux *et al.*, 2009).

El primer gen identificado fue de la subunidad α_1 del receptor muscular. Desde entonces, se han identificado diecisiete genes que codifican para distintas subunidades del RnACh ($\alpha_1 - \alpha_{10}$, $\beta_1 - \beta_4$, γ , δ y ϵ) en genomas de mamíferos y en humanos (Lukas *et al.*, 1999; Dani y Bertrand, 2007; Wu y Lukas, 2011).

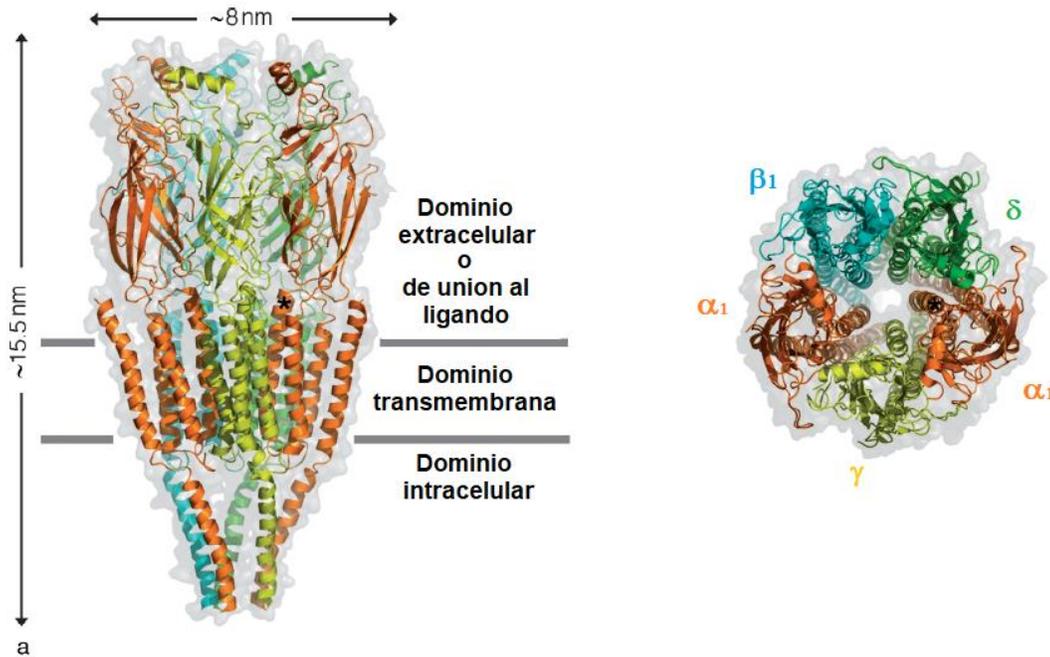


Figura 7. Estructura del RnACh. Dominios que presenta el receptor y en cuál de ellos se encuentra el sitio de unión al ligando (izquierda); vista superior del receptor y de las cinco subunidades que lo componen formando el poro del canal (derecha) (Imagen modificada de Changeux *et al.*, 2009).

Existen como pentámeros en complejos homoméricos que se forman por cinco subunidades iguales o heteroméricos, siendo estos los más comunes al contener dos o más tipos de subunidades diferentes (Lukas *et al.*, 1999; Wu y Lukas, 2011) (Figura 8). En el caso de los receptores homopentaméricos, el sitio de unión al ligando (acetilcolina) se da entre dos subunidades α y, en el caso de receptores heteropentaméricos, el sitio de unión al ligando se sitúa en la interfaz entre las subunidades α - y las no α -. Para ambos casos, es necesaria la unión de dos moléculas de ACh para activarse (Mari y Tytgat, 2010).

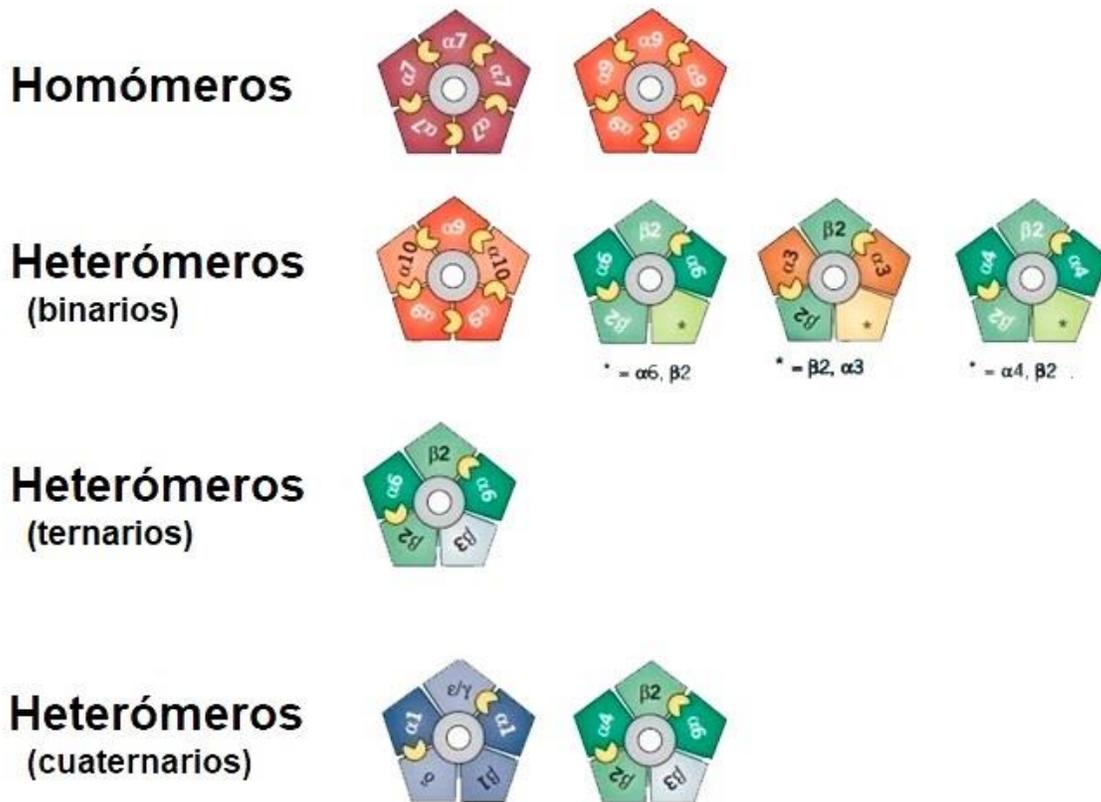


Figura 8. Homómeros y heterómeros del RnACh (Imagen modificada de News-Medical.net).

Los subtipos de RnACh se nombran de acuerdo con las subunidades que los componen, y se utiliza un * para indicar otras posibles subunidades de ensamblaje. Aunque muchos subtipos son teóricamente posibles, parece haber limitaciones en el número de combinaciones viables de las subunidades (Lukas *et al.*, 1999; Wu y Lukas, 2011).

Las subunidades filogenéticamente antiguas, como $\alpha 7$ o $\alpha 9$ pueden formar homopentámeros funcionales; sin embargo, esta última presenta actividad modesta en forma homomérica y mejora cuando se ensambla con la subunidad $\alpha 10$ para formar un ensamblaje binario (Wu y Lukas, 2011).

Los estudios de expresión heteróloga sugieren que las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$ pueden combinarse de forma binaria con las subunidades $\beta 2$ o $\beta 4$ para formar el sitio de unión al ligando y/o sitios funcionales. Mientras que las subunidades $\beta 3$ y $\alpha 5$ no pueden

formar RnACh solos o con otro tipo de subunidad, pero son capaces de integrarse en complejos binarios para formar complejos ternarios (Wu y Lukas, 2011).

También, se puede tener la formación de complejos cuaternarios que contienen más de una de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$ o que contienen ambas subunidades y más de una subunidad β (por ejemplo, $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ - o $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ -. Los nAChRs de tipo muscular son complejos cuaternarios compuestos por las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, δ y γ , (fetal) o ϵ (adulto) (Wu y Lukas, 2011).

En el cerebro, los subtipos predominantes son los $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$; sin embargo, existen otros RnACh menos abundantes y pueden desempeñar funciones fisiológicas importantes (Wu y Lukas, 2011; Dineley, 2015) (Figura 9).

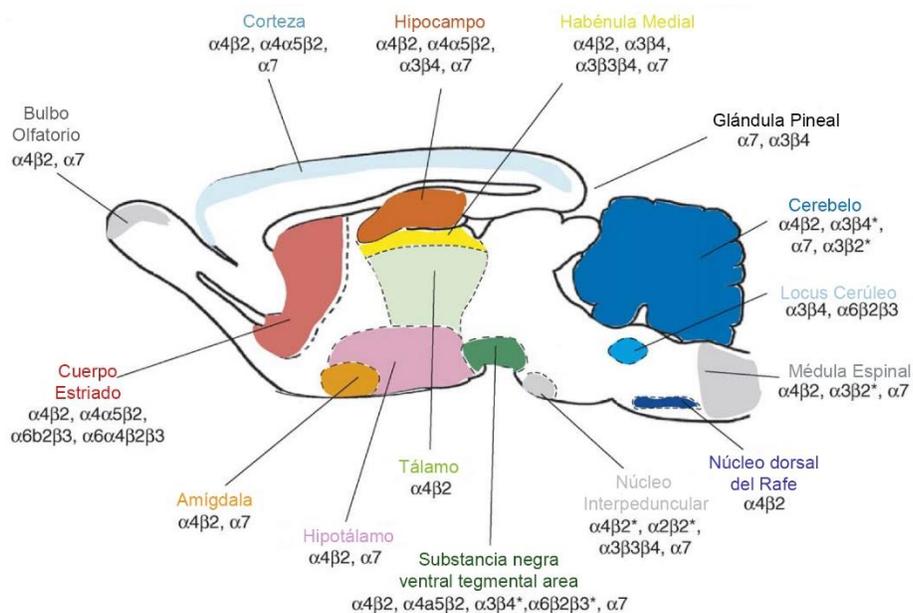


Figura 9. Distribución de los distintos subtipos de RnACh en el encéfalo de rata (Imagen modificada de Gotti *et al.*, 2006).

Todos los RnACh muestran permeabilidad a varios cationes, como Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , siendo los subtipos $\alpha 7$ y musculares los que muestran la mayor permeabilidad para el Ca^{2+}

(Dang *et al.*, 2016). Es por ello que, con la activación de los RnACh en las fibras musculares, inicia una cascada que conduce a la contracción muscular (Changeux *et al.*, 2009).

El conocimiento del RnACh, los avances en farmacología, y su papel en la patología de distintas enfermedades, han aumentado el interés por estos receptores para actuar como posibles blancos farmacológicos a una serie de trastornos psiquiátricos, neurológicos y periféricos; como lo son (Changeux *et al.*, 2009; Hurst *et al.*, 2013):

-  *Miastenia gravis* (RnACh musculares).
-  Adicción al alcohol (RnACh $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ o $\alpha 3\beta 4$).
-  Dolor (RnACh $\alpha 4\beta 2$ y subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$).
-  Inflamación (RnACh $\alpha 7$).
-  Depresión (RnACh $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ o $\alpha 3\beta 4$).
-  Déficit de atención (RnACh $\alpha 4\beta 2$).
-  Epilepsia (RnACh $\alpha 7$).
-  Esquizofrenia (RnACh $\alpha 7$).
-  Parkinson (RnACh $\alpha 4\beta 2$ y/o $\alpha 6^*$).
-  Alzheimer (RnACh $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$).

2.4. *Conus fergusonii*

Se sabe que hay alrededor de 70 especies de caracoles Conos habitan aguas mexicanas, distribuidos en la provincia Panámica (costa del Océano Pacífico), y Costa Caribeña (costas del Golfo de México y del Mar Caribe) (López-Vera *et al.*, 2006), una de ellas es *Conus fergusonii*, especie descrita por Sowerby III en 1873.

Su distribución va al norte desde Bahía Tortuga, Baja California y Guaymas, Sonora en México y en el sur hasta la Isla Lobos de Afuera en Perú. Incluso, aunque no es común, se han encontrado especímenes colectados en las Islas Galápagos (Figura10) (McLean y Nybakken, 1979).



Figura 10. Mapa de distribución de *Conus fergusonii* (IUCN, 2013).

Con un tipo de alimentación vermívora, *C. fergusonii* habita zonas nerítico marina con profundidades que van desde los 0 a 200 metros de profundidad en fondos blandos, como lo son los sustratos fangosos y fangoso/arenoso submareales; sin embargo, muchas partes de su distribución se conocen solo debido a la captura por draga. (Paredes *et al.*, 2010; Tenorio *et al.*, 2012).

La descripción de *C. fergusonii* indica que posee una concha grande de longitud máxima de 153 mm, con 12 a 13 espirales, una espira baja o moderadamente elevada; el contorno de la espira es cóncavo en los ejemplares jóvenes y casi recto en adultos. Hombro fuertemente angulado en ejemplares jóvenes y menos angulado en los adultos. La presencia de coronaciones es clara hasta que la concha llega a medir 50 mm; en organismos de mayor tamaño son indistintas y onduladas. Presenta una superficie lisa excepto por 10 a 15 estrías en el tercio inferior del espiral, y cuenta con una abertura de la

misma anchura en todo el cuerpo y conforme al perfil del espiral. El opérculo es romo y unas 4 veces más largo que ancho (McLean y Nybakken, 1979).

En juveniles, la concha es de color amarillo/anaranjado claro, más pálido en los ejemplares de tamaño medio y finalmente se desvanece a blanco en ejemplares adultos. El periostraco es delgado y de color claro en los ejemplares juveniles y grueso y de color marrón oscuro en los adultos (McLean y Nybakken, 1979) (Figura 11A).



Figura 11. Concha y diente radular del caracol de *C. fergusonii*; (A) concha de organismo adulto recubierta por el periostraco; (B) esquema y fotografía del arpón (diente radular) de *C. fergusonii* (Imagen de Ortiz-Arellano, 2014).

El diente radular en los organismos adultos, es largo y termina en una cúspide puntiaguda o redondeada; presenta dos barbas, una en la punta, la otra en el lado opuesto; hoja y cintura ausentes, base agrandada, redondeada, con un espolón puntiagudo (Figura 11B).

Desde 2011 es considerada como “preocupación menor” en la lista roja de especies de la UICN. Esta categoría se debe en parte a que no hay literatura disponible sobre la población de la especie y, por consiguiente, no se tienen medidas para su conservación (Tenorio *et al.*, 2012; UICN, 2013).

2.4.1. Estudios previos de *C. fergusonii*

La especie *Conus fergusonii* está reportada en artículos científicos como el de McLean y Nybakken (1979) donde se mencionan su distribución principalmente y las características morfológicas del organismo; de igual forma es nombrada en diferentes bases de datos como lo es WoRMS, CONABIO o la UICN, las cuales también indican esta información; en algunos otros, se habla sobre su clasificación taxonómica y las actualizaciones que presenta.

Sin embargo, pese a no haber ningún artículo donde se haga mención del estudio de las conotoxinas que posee, se han realizado estudios con el veneno de esta especie. Existen tesis realizadas donde:

-  Se evalúa la actividad antagónica del veneno en canales de potasio (Martínez-Hernández, 2016).
-  Se analizan bioquímicamente algunos de los componentes del veneno (Lievano-Beltran, 2017).
-  Se evalúa el efecto del veneno sobre la modulación de corrientes de receptores nicotínicos de acetilcolina (Rodríguez-Ruiz, 2017).
-  Se analiza el veneno desde una perspectiva ecológico/bioinformática (Montiel-Reyes, 2021).
-  Se modifica la técnica utilizada para optimizar el fraccionamiento y repurificación de un componente hidrofílico del veneno (Báez-Cruz, 2022).

Como parte de los resultados de Rodríguez-Ruiz (2017) una de las fracciones del veneno de *C. fergusonii*, presentó modulación de las corrientes en los subtipos neuronales $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ del RnACh. Esta fracción fue llamada Fr5A; sin embargo, su caracterización bioquímica (secuencia) no logró ser completada y al haberse identificado actividad en algunos subtipos del RnACh, se planteó el identificar su posible actividad sobre otros subtipos.

3. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos mostraron que el péptido Fr5A del veneno de *C. fergusonii* presentó actividad moduladora sobre receptores nicotínicos de acetilcolina. Es por ello que, en este trabajo, se busca realizar la caracterización química del péptido, además de determinar su especificidad sobre estos receptores dado que pudiera servir como una herramienta molecular para el estudio del sistema nervioso, además de poseer un potencial uso farmacológico.

4. HIPÓTESIS

La mayoría de las conotoxinas estudiadas con efecto sobre receptores nicotínicos de acetilcolina presentan diferente afinidad dependiendo del subtipo en el cual sean evaluadas; por ello, la afinidad que presente la conotoxina Fr5A será diferente para cada subtipo del receptor nicotínico de acetilcolina.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

 Caracterizar bioquímica y funcionalmente la conotoxina Fr5A del veneno de *C. fergusonii*.

5.2. Objetivos particulares

 Completar la secuencia primaria de aminoácidos de la conotoxina Fr5A.

 Determinar la selectividad de Fr5A mediante su ensayo sobre diferentes subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina

6. MATERIAL y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Durante este proyecto se utilizaron dos lotes de veneno de la especie de caracol marino *Conus fergusonii* (Figura 12). El primer lote de veneno perteneció al resto de un material asilado previamente a partir de 4 ejemplares. El segundo lote fue obtenido a partir de 5 caracoles que se encontraban almacenados a -70°C en el laboratorio. Para ambos lotes se utilizaron ejemplares colectados en las costas de Mazatlán, Sinaloa, México, todos ellos organismos adultos y sin diferenciar sexo.



Figura 12. Concha de caracol *C. fergusonii*. Se ejemplifica uno de los organismos utilizados en este estudio.

6.2. Obtención del veneno

Para obtener los conductos venenosos, se disecaron los caracoles sobre una cama de hielo para evitar la desnaturalización de los componentes de veneno. Una vez obtenidos los conductos (Figura 13), se colocó cada uno de ellos en tubos Eppendorf con 1 mL de solución de extracción: acetonitrilo (ACN) al 40% y ácido trifluoroacético (TFA) al 2% y se mantuvieron a 4 °C por un día hasta su maceración.



Figura 13. Conducto venenoso disecado. Se observa la probóscide, el conducto y el bulbo.

Los conductos venenosos se juntaron en un solo tubo, el cual se llevó a 10 mL de solución de extracción, y se maceraron con un homogenizador (Tissue Tearor 985370, BioSpec Products), en la velocidad seis, hasta que se observó que el tejido se había disgregado en su totalidad. Durante todo el procedimiento el tubo con los conductos venenosos se mantuvo en hielo para evitar la desnaturalización de los componentes.

El extracto obtenido se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 14,000 g, durante 15 minutos. El sobrenadante (como la fracción rica en péptidos) se conservó, decantándolo en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

La cuantificación del veneno se realizó con un Nanodrop (Implen NanoPhotometer NP80) mediante lecturas a una longitud de onda de 280 nm. Posteriormente, todas las muestras colectadas fueron liofilizadas en un evaporador centrífugo (Speedvac concentrator, ThermoElectron Corporation).

6.3. Fraccionamiento del veneno total por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

Los componentes del veneno total se fraccionaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR), la cual es más comúnmente conocida por sus siglas en inglés como RP-HPLC (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography) y como será nombrada de aquí en adelante, utilizando una columna analítica de sílice *Vydac* C18 (4.6 mm x 250 mm, tamaño de partícula 5 µm, 300 Armstrong tamaño de poro), provista con una pre-columna de sílice (218TP54, 4.6 x 10 mm, 5 µm de tamaño de partícula).

Las soluciones ocupadas fueron:



Fase móvil A: TFA al 0.1% y H₂O grado HPLC.



Fase móvil B: TFA al 0.085%, ACN al 90% y H₂O grado HPLC.

El gradiente de elusión consistió de un paso isocrático al 5% de fase móvil B durante 5 min y, posteriormente un gradiente lineal de 5-100% de fase móvil B en 95 min con un flujo de 1 mL/min. El perfil cromatográfico de los péptidos presentes en el extracto se determinó con un detector de UV a 220 y 280 nm.

Con el primer lote de veneno, se realizaron 9 análisis cromatográficos inyectando en cada uno 8 mg de veneno crudo disuelto en solución de extracción. La colecta se realizó de manera manual, colectando el veneno por fracciones de 5 minutos, siendo un total de 12 fracciones.

Con el segundo lote de veneno, se realizaron en total 16 análisis cromatográficos. En los primeros 10 se inyectaron por análisis 8 mg de veneno crudo, disuelto en solución de extracción. Los siguientes 6 se realizaron inyectando en cada uno 10 mg de veneno crudo disuelto en fase móvil A. En ambos casos, se colectó cada señal del cromatograma de manera manual. Todas las muestras colectadas se liofilizaron.

6.4. Subfraccionamientos del veneno por RP-HPLC

El subfraccionamiento de las muestras de interés del veneno de *Conus fergusonii*, se realizó utilizando el sistema RP-HPLC con la columna y condiciones señaladas en la sección anterior.

Para la separación de los péptidos del primer lote de veneno, se utilizó:



Elusión isocrática de 5 minutos al 20% de fase móvil B, seguido de un gradiente lineal de 20% a 35% de fase móvil B en 45 minutos.

Para el segundo lote de veneno, se utilizó:



Elusión isocrática de 5 minutos al 17% de fase móvil B, seguido de un gradiente lineal de 17% a 37% de fase móvil B en 65 minutos.

6.5. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas fue hecha en el Laboratorio de Servicios Analíticos del Instituto de Química/UNAM a través del Dr. Arreguín Espinosa de los Monteros. Todos los análisis se realizaron en un espectrómetro de masas marca Bruker Microflex con MALDI-tiempo de vuelo (MALDI-ToF) para realizar los todos análisis.

Para ello, se usó una placa de 99 pozos con una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), con 40% ACN y 0.1% TFA. Los calibradores fueron Angiotensina II, Melitina y Citocromo C.

Se colocaron 2 pmol de muestra en 5 μ l de matriz y de ahí se tomaron 2 μ l para poner en la placa. Hecho esto, la matriz se dejó secar por unos minutos en la campana de extracción; posteriormente, la placa se introdujo en el espectrómetro y se realizó la lectura utilizando el Software FlexControl con el método ProMit. Se obtuvieron los espectros de masas con ayuda del programa FlexAnalysis se delimitó a voluntad el rango de m/z para determinar el ión molecular más abundante; asimismo fue posible marcar señales minoritarias.

6.6. Determinación de la secuencia

6.6.1. Método de Degradación de Edman

La secuencia por la técnica de degradación de Edman fue realizada en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (IBt)/UNAM, en Cuernavaca por medio de los Doctores Lourival Possani Postay y Fernando Zamudio. Se utilizaron 2 nmol de las muestras para ser procesadas utilizando un secuenciador automático de proteínas (PPSQ-31A Protein Sequencer, Shimadzu Scientific Instruments).

El cálculo de los nmol se realizó de dos formas. La primera, haciendo la relación del área bajo la curva obtenida por RP-HPLC para 5 nmol de la conotoxina α -RglA sintética (16,829,353 unidades) respecto al área obtenida con la muestra de interés.

La segunda, fue cuando ya se contó con el peso molecular de la muestra, se consideró el peso en miligramos para así poder tener un valor más preciso de los nmoles totales. Esto se realizó partiendo de que 5 nmol de RglA equivalen a 7.8 μ g y el valor del área bajo la curva es de 16,829,353 unidades. Este cálculo permitió obtener la cantidad de microgramos que cada muestra tiene en relación con su área bajo la curva; posteriormente, este valor se dividió entre el peso molecular (en kDa) obtenido por los espectros de masas.

6.6.2. Transcriptómica

La secuencia por transcriptómica fue realizada en el Department of Biochemistry por medio del Dr. Baldomero Olivera en colaboración con la Dra. Helena Safavi en la Universidad de Utah, Salt Lake City, EUA.

Se utilizó el conducto venenoso de un organismo del segundo lote, el cual fue almacenado en solución RNAlater (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y, enviado para su procesamiento.

6.7. Reducción y alquilación parcial de cisteínas

6.7.1. Método utilizado por Loughnan *et al.*, 2006

Del péptido con actividad, se tomaron 5 nmol (a partir del primer cálculo) que fueron reducidos en presencia de 10 mM de TCEP (Tris(2-carboxietil) fosfina clorhidrato), 50 mM de acetato de amonio (pH 4.5) y 10% de ACN, a 37 °C por una hora.

Posteriormente, el péptido fue alquilado con 20 mM de N-etilmaleimida (NEM) a 37 °C por una hora.

El péptido reducido y alquilado fue purificado por RP-HPLC con un gradiente de 20-35% de fase móvil B en 80 minutos con un flujo de 1 mL/min, con una lectura de longitud de onda a 220 y 280 nm.

6.7.2. Método utilizado por Aguilar *et al.*, 2006

Del péptido con actividad, se utilizaron 2.5 nmol (a partir del primer cálculo) para la reducción parcial. Se utilizó amortiguador desnaturizante: 0.1 M de citrato de sodio con [6 M] de clorhidrato de guanidina (pH 3.0) y 0.1 M TCEP, a temperatura ambiente por 15 minutos.

Posteriormente, fue alquilado con 0.1 M NEM a temperatura ambiente por 30 minutos.

El péptido reducido y alquilado se diluyó con 10% fase móvil B y fue purificado utilizando RP-HPLC con una elusión isocrática de 5 minutos al 5% de fase móvil B y posteriormente, un gradiente lineal de 5-95% de fase móvil B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min, con una lectura de longitud de onda a 220 y 280 nm.

6.8. Reducción y alquilación total de cisteínas

6.8.1. Método reportado por Aguilar *et al.*, 2006

Del péptido con actividad, se utilizaron 4 nmol (a partir del primer cálculo) para la reducción total de cisteínas. Se utilizó 0.1 M de Tris HCl disuelto en clorhidrato de guanidina [6 M] (pH 8.0) y 50 mM de ditioneitol (DTT), a 65 °C por 25 minutos.

Para la alquilación se utilizó 4-vinil piridina (4-VP) y se desplazó el aire del tubo con nitrógeno. Se incubó a temperatura ambiente por 18 horas en oscuridad.

El péptido reducido y alquilado se diluyó con 5% de fase móvil B y fue purificado usando RP-HPLC con una elusión isocrática de 5% fase móvil B por 20 minutos y, posteriormente, un gradiente lineal de 5-100% fase móvil B en 100 minutos con un flujo de 1mL/min y con una lectura de longitud de onda a 220 y 280nm.

6.8.2. Protocolo elaborado para la reducción y alquilación total

Se realizó una revisión de artículos donde se realizó la reducción y alquilación total de diferentes péptidos. La bibliografía utilizada para esta parte de muestra en el Anexo I, con base en ella, se elaboró el siguiente protocolo.

De los péptidos con peso de ± 11 kDa, se utilizaron ≥ 2 nmol (a partir del segundo cálculo) para la reducción total de cisteínas. Se usaron 100 μ L de [0.1 M] Tris HCl con 100 mg de Clorhidrato de guanidina (pH 8.0), 45 μ L de [50 mM] DTT, a 65°C por 25 minutos.

Para la alquilación se utilizaron 4 μ L de 4-VP. Se incubó a temperatura ambiente por 18 horas en oscuridad.

El péptido reducido y alquilado se diluyó con agua y fue purificado usando RP-HPLC con una elusión isocrática de 5% fase móvil B durante 70 minutos y, posteriormente, un gradiente lineal de 5-35% fase móvil B en 90 minutos, seguido por un gradiente de 35 a 100% B en 65 minutos y finalmente una elusión isocrática con 100% de fase móvil B por 10 minutos (regresando después de esto a condiciones iniciales y equilibrio), con un flujo de 1 mL/min y una lectura de longitud de onda a 220 y 280 nm.

6.9. Propagación de subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina

El cDNA que codifica las distintas subunidades de los RnACh fue provisto amablemente por el Dr. Michael McIntosh de la Universidad de Utah.



Musculares de rata: α 1, β 1, γ , δ , y ϵ .



Neuronales humanos: α 2, α 3, α 4, α 7, β 2, β 3, y β 4.

La propagación de los plásmidos de estas subunidades se realizó mediante la transformación de células competentes de la cepa XL1 Blue de *E. coli*.

Se hizo mediante la siembra de 100 μ l de bacterias con 400 μ l de medio SOC, en cajas de Petri con medio LB agar/ampicilina, dejándose incubar toda la noche a 37 °C (Figura 14). Al día siguiente, se tomó una colonia de bacterias y se sembró en tubos Falcon de 15 mL con 4 mL de medio LB líquido/ampicilina, y se dejó incubar toda la noche a 37°C.

Para obtener y purificar el DNA proveniente del cultivo de bacterias, se utilizó y siguió el protocolo del Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). La cuantificación del cDNA se realizó mediante un nanodrop (Nanodrop 2000Thermo Fisher).

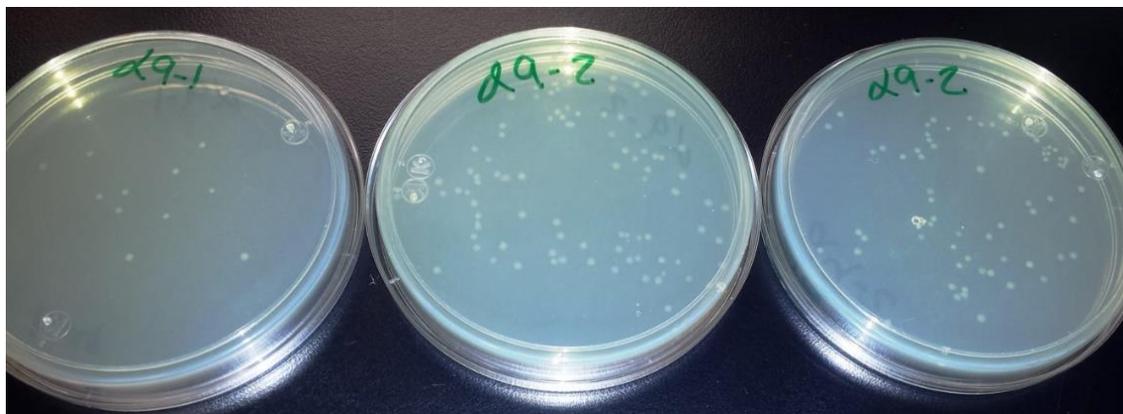


Figura 14. Cultivo de células XL1-Blue. Crecimiento de colonias en agar LB posterior a incubarse a 37°C toda la noche.

6.10. Transcripción *in vitro*

El cDNA de las subunidades neuronales (con excepción del subtipo $\alpha 7$) se linearizó utilizando la enzima Not I y se purificó con el kit EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (Bio Basic).

La transcripción de todas subunidades neuronales se llevó a cabo utilizando 2 μ L de la enzima T7 Ambion mMessage mMachine, bajo el protocolo del mMessage mMachine Kit (Applied Biosystem) y la purificación se realizó con el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN).

La cuantificación del RNA se realizó en el *Nanodrop 2000*.

6.11. Obtención de ovocitos

Se realizaron microcirugías a ranas hembras de la especie *Xenopus laevis* para la obtención de ovocitos. Estas fueron previamente anestesiadas con triclaína metanosulfonato (MS-222) al 2% (pH 7-7.3) durante 30 minutos aproximadamente.

La incisión se realizó en la parte ventral de la rana (Figura 15).

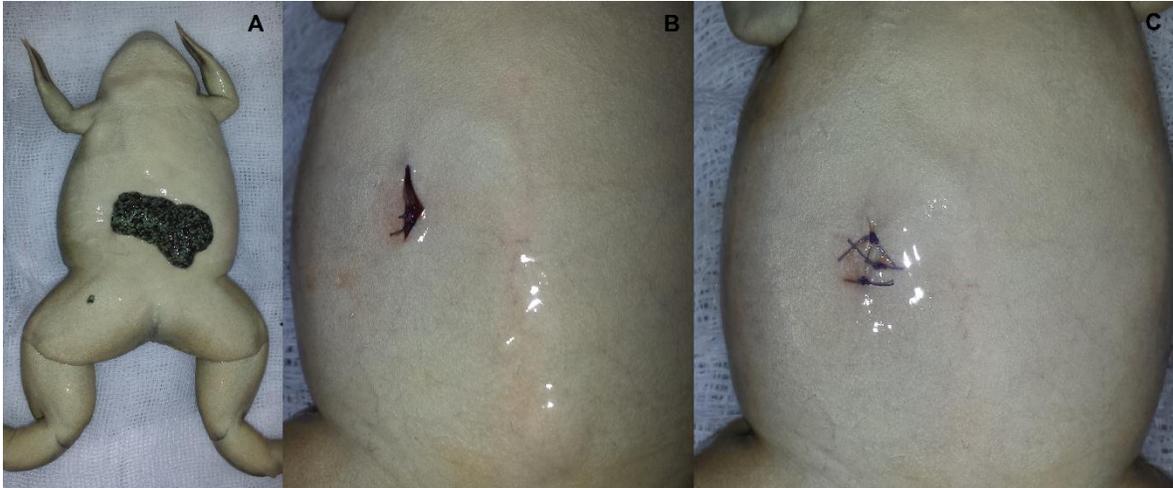


Figura 15. Microcirugía a hembra adulta de *Xenopus laevis*. (A) incisión realizada y extracción de ovocitos, (B) cierre de la incisión realizada en el músculo, (C) cierre de la incisión realizada en la piel de la rana.

Los ovocitos extraídos (Figura 16) se colocaron en tubos Falcon de 50 mL con 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]), en el cual se lavaron al menos 5 veces con 40 mL de medio para eliminar impurezas.



Figura 16. Ovocitos de rana *X. laevis* recién extraídos. Se observa que posterior a la extracción, se obtienen ovocitos en diferentes estadios.

Para quitar la cubierta folicular de los ovocitos, a 20 mL de medio OR-2 se añadieron 1.15 mg/mL de Colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) o bien 0.75 mg/mL de Colagenasa A de *Clostridium histolyticum* (Roche) y se mantuvieron en agitación manual durante media hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, los ovocitos se lavaron al menos 5 veces con 40 mL de medio OR-2 para eliminar la colagenasa y se procedió a la selección de estos (Figura 17). De manera manual, se escogió únicamente a los ovocitos que se encontraban en estadios de desarrollo V y VI y se colocaron en solución extracelular ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM (pH 7.1-7.5 ajustado con 10 N NaOH) con Penicilina/Estreptomicina (100 U/100 µg) /mL (Sigma) y gentamicina 100 µg/mL (Gibco). Se mantuvieron en incubación a 18 °C hasta su uso.



Figura 17. Ovocitos de *X. laevis* después del tratamiento con colagenasa; (Izquierda) antes de la selección manual; (derecha) ovocitos en estadio V y VI después de la selección y listos para ser inyectados.

6.12. Expresión heteróloga

Un día posterior a la extracción de los ovocitos, se realizó la inyección de los subtipos de RnACh de la siguiente manera:



Muscular (α_1)₂ β 1 γ δ con 2.5 ng de cDNA.



Muscular (α_1)₂ β 1 δ ϵ con 5.2 ng de cDNA.



Neuronal $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 2$ con 32.2 ng de RNA.



Neuronal $\alpha 4\beta 2$ con 18 ng de RNA.

La inyección de cDNA se realizó al núcleo y la de RNA en el citoplasma (Figura 18) con ayuda de un nanoinyector (Nanoliter 2000, World Precision Instruments).

Dependiendo del receptor, la expresión de corrientes de RnACh se evaluó de 24 a 72 horas posteriores a la inyección.

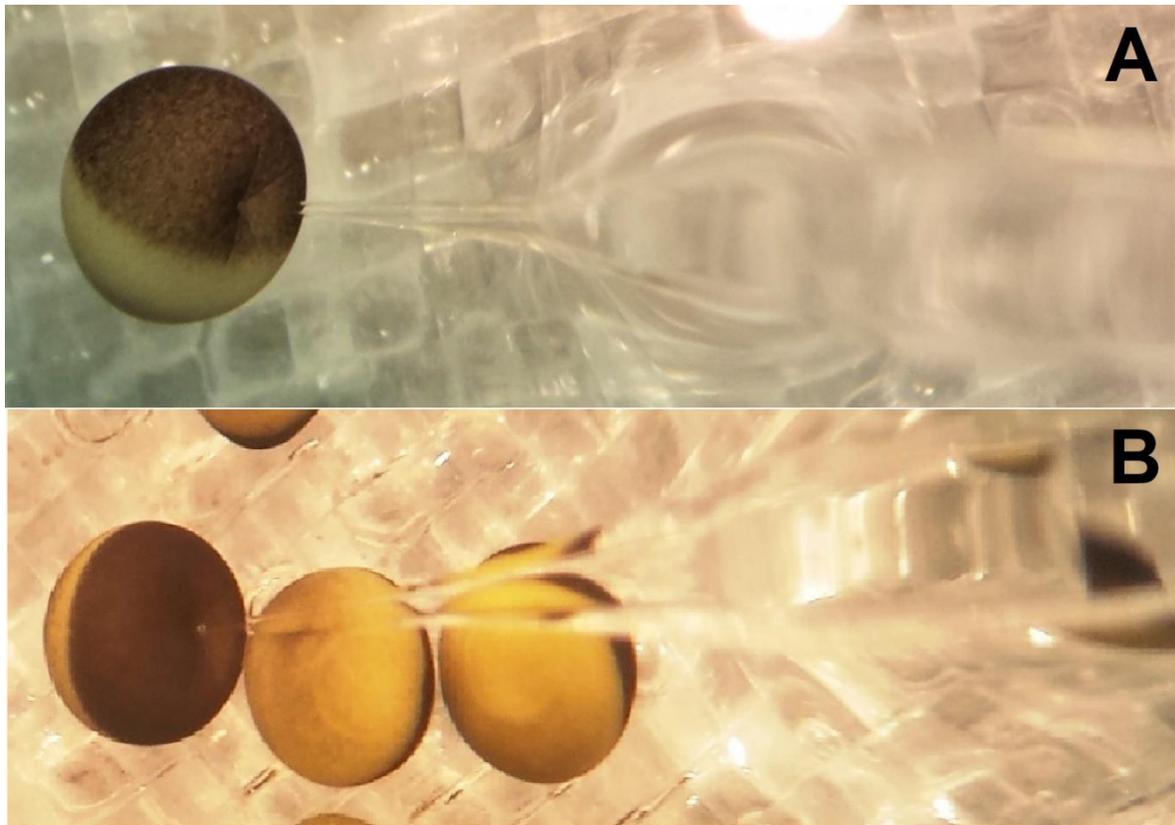


Figura 18. Inyección de ovocito. (A) Inyección de RNA al citoplasma. (B) Inyección de DNA al núcleo.

6.13. Ensayos electrofisiológicos

Para confirmar la expresión de los RnACh, se utilizó la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje con dos electrodos de acuerdo con Cartier *et al.*, 1996. Se utilizaron

capilares de borosilicato para hacer microelectrodos, los cuales fueron llenados con KCl 3 M. Los ovocitos, previamente inyectados, se colocaron en una cámara de registro y el potencial de membrana se fijó a -70 mV. Estos se perfundieron por gravedad con la solución ND96 sin antibióticos añadidos (Figura 19).

La toma de datos se realizó con el programa LabView (National Instruments). Este fue programado para que las corrientes fueran generadas permitiendo un pulso de 1 segundo de acetilcolina (ACh) cada minuto. La concentración de ACh utilizada fue diferente dependiendo del subtipo de RnACh expresado: 200 μ M para α 7, 100 μ M para α 3 β 2 y α 4 β 2, 10 μ M para $(\alpha$ 1)₂ β 1 δ ϵ y 1 μ M para $(\alpha$ 1)₂ β 1 γ δ .



Figura 19. Registro electrofisiológico. Ovocito en la cámara de registro con la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos.

Para realizar las pruebas de actividad, el flujo de ND96 se detuvo durante 5 minutos y se pipetearon directamente en la cámara ya fueran 3 μ L de ND96 (como control) o bien 3 μ L de diferentes concentraciones de la toxina y se dejó actuar. Pasados los 5 minutos, se volvió a activar el flujo de ND96 al igual que los pulsos con ACh.

En cada ovocito se midió la amplitud de la corriente antes y después de administrarse la toxina y, las diferencias entre ambas corrientes se consideraron como el porcentaje de inhibición.

6.14. Curva dosis respuesta

El porcentaje de inhibición se obtuvo con los datos de, al menos, 3 ovocitos (obtenidos de ranas diferentes) para cada una de las concentraciones y así calcular el promedio del porcentaje de inhibición.

Las curvas de concentración-respuesta se ajustaron a la ecuación % de respuesta $+ 100[1 + (\text{concentración de toxina}/IC_{50})^{n_H}]^{-1}$, donde n_H es el coeficiente de Hill, y los gráficos se obtuvieron con el software GraphPadPrism (versión 9.1.0, San Diego, CA, USA).

7. RESULTADOS

7.1. Fraccionamiento del 1er lote de veneno total

Con el fin de tener veneno suficiente del componente de interés, lo primero fue realizar el fraccionamiento del veneno total de *C. fergusonii*. Se realizaron 9 análisis cromatográficos por RP-HPLC; en la Figura 20 se ilustra una de ellas y, en color, el área que corresponde a cada fracción que fue colectada en periodos de 5 minutos. Los minutos 60 a 100 del análisis, no se muestran debido a que no se observó ninguna señal durante ese tiempo.

Se colectaron 12 fracciones en cada fraccionamiento, siendo la fracción F5 aquella que cuenta con la muestra de interés.

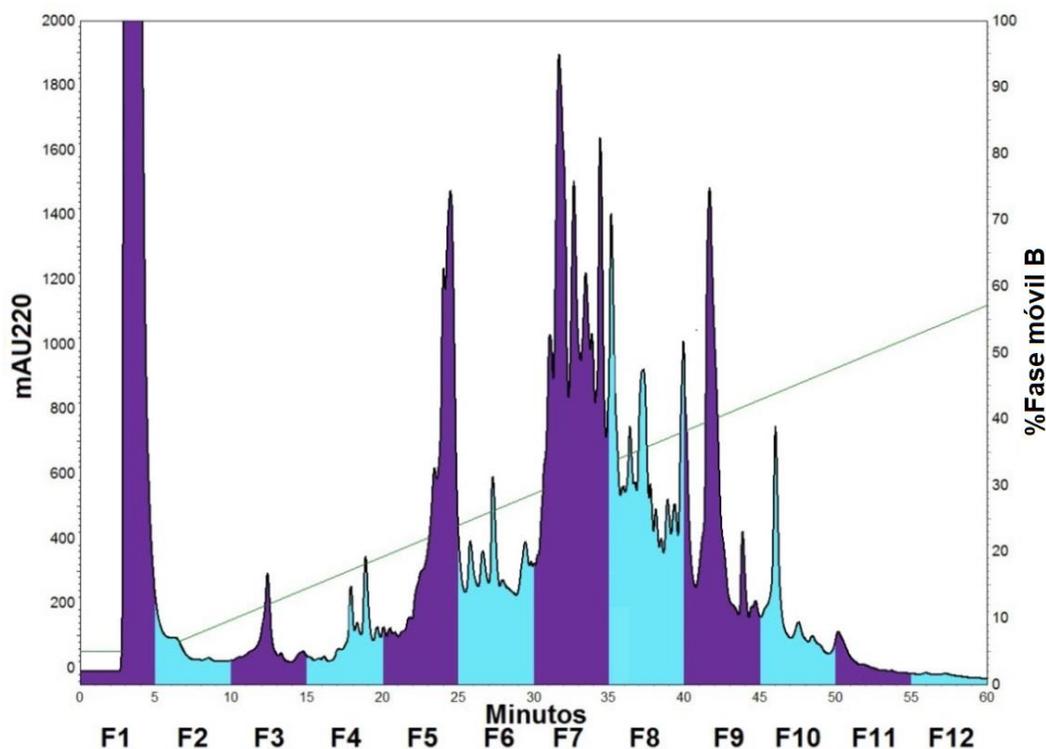


Figura 20. Perfil cromatográfico del veneno total de *Conus fergusonii*. Paso isocrático a 5% de fase móvil B y gradiente lineal de 5 a 100% de fase móvil B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/ min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. Solo se muestra una ventana de 0 a 60 min, donde con colores se indica cómo fueron colectadas cada una de las fracciones, enumeradas de F1 a F12.

7.2. Subfraccionamiento del 1er lote de veneno

Para obtener un componente puro, se realizó el subfraccionamiento de la fracción F5 y, en la Figura 21 se muestra el cromatograma resultante. En este se muestran dos señales mayoritarias que eluyeron muy cercanas una de la otra; ambas fueron colectadas de forma manual y se nombraron F5.Sub7 (azul) y F5.Sub8 (rojo).

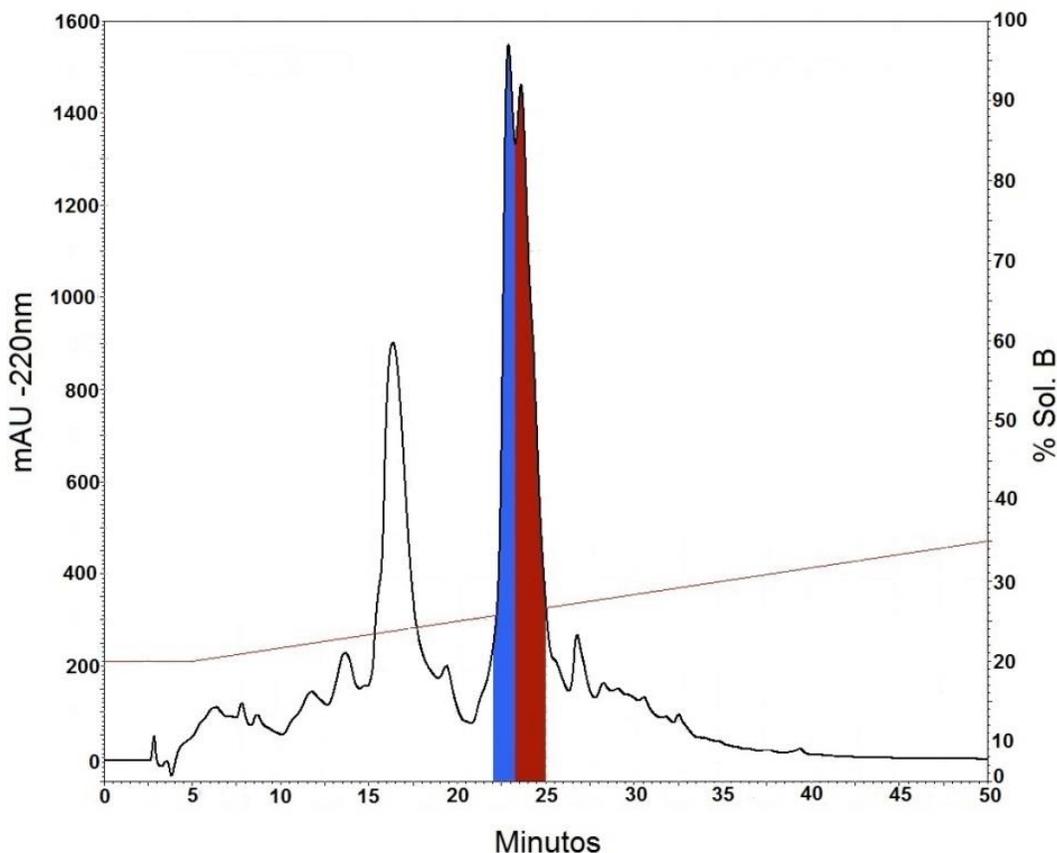


Figura 21. Perfil cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción F5 del veneno de *C. fergusonii*. Gradiente lineal de 20 a 35% de solución B en 45 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. Los colores indican las señales mayoritarias de interés F5.Sub7 (azul) y F5.Sub8 (rojo).

Para una mayor pureza las muestras F5.Sub7 y F5.Sub8 se separaron usando el mismo gradiente de elusión que para la fracción F5. La colecta manual permitió recuperar dos muestras de cada una.

En la Figura 22(A) se observa el subfraccionamiento de F5.Sub7 que dio como resultado las muestras 7A (dorado) y 7B (azul), mientras que en la Figura 22(B) se observan las muestras 8A (naranja) y 8B (verde) provenientes del subfraccionamiento de F5.Sub8.

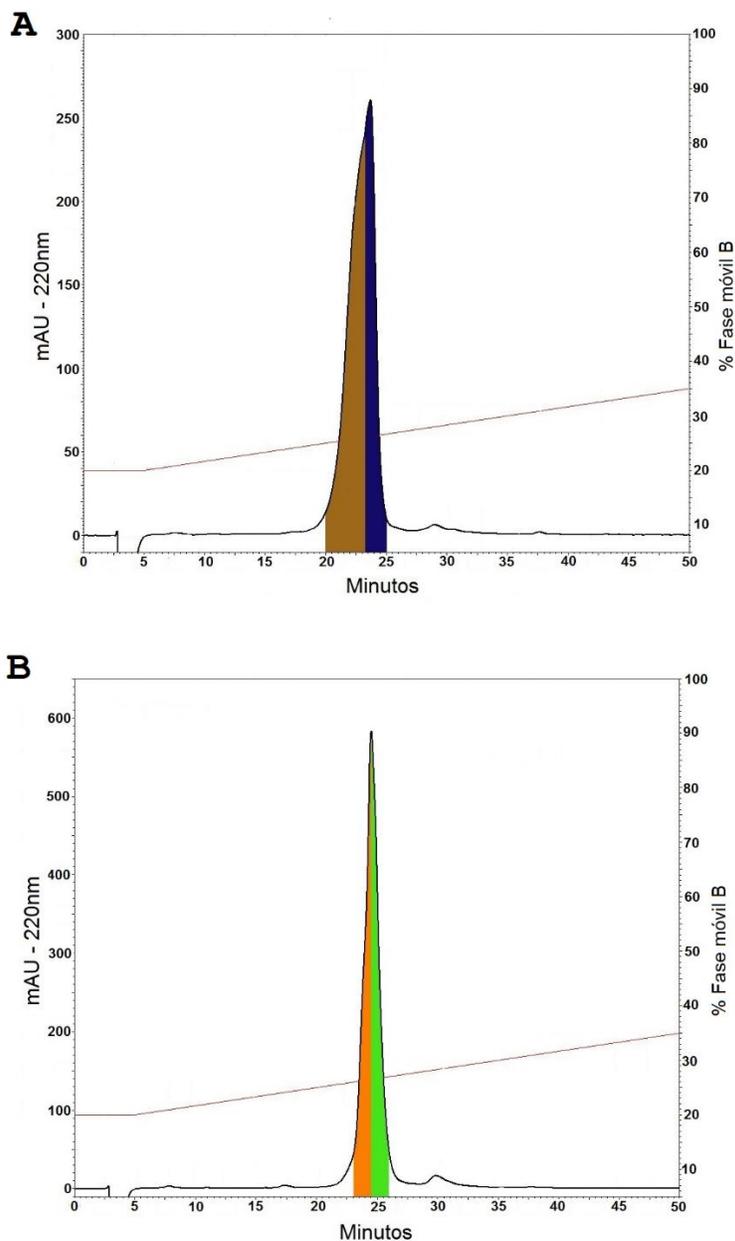


Figura 22. Perfiles cromatográficos de los subfraccionamientos de F5.Sub7 y F5.Sub8. Gradiente lineal de 20 a 35% de fase móvil B en 45 minutos con un flujo de 1 mL/min utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Subfraccionamiento de F5.Sub7; (B) Subfraccionamiento de F5Sub8. Los colores indican las señales mayoritarias de interés (A) 7A (dorado) y 7B (azul); (B) 8A (naranja) y 8B (verde).

Posterior a su purificación, las cuatro muestras (7A, 7B, 8A y 8B) se evaluaron electrofisiológicamente sobre el RnACh $\alpha 7$. Todas ellas presentaron actividad inhibitoria sobre el receptor y sus registros de corrientes se muestran en el Anexo II.

7.3. Determinación de los espectros de masas del 1er lote de veneno

Por medio del análisis de masas de MALDI-ToF, se obtuvieron los espectros de masas para las muestras 7A, 7B, 8A y 8B. En la Tabla 3 se resumen los valores m/z de las 4 muestras. En el Anexo III se aprecian los espectros de masas correspondientes a estas.

Tabla 3. Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras 7A, 7B, 8A y 8B.

Muestra	Pesos moleculares (m/z)				
7A	2,765.176	3,610.942	4,402.111	5,536.863*	11,078.365
7B	2,770.802	3,688.926		5,535.501*	11,072.749
8A			4,400.109	5,567.990*	11,137.035
8B	3,611.874*	3,991.108	4,427.199	5,593.579	11,132.280

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

7.4. Secuenciación. Técnica de degradación de Edman

De la fracción 8A, se enviaron 2 nmol (sin reducir y alquilar) para ser secuenciados bajo el principio de degradación de Edman. Como resultado, se obtuvo una secuencia de 26 aminoácidos. Como se observa en la Figura 23, en los ciclos 6, 17, 18 y 23 no se registraron señales cromatográficas (fueron en blanco), por lo que se asumió que corresponden a residuos de cisteínas. De igual forma, se observó una segunda secuencia con diferencias en los ciclos 8 y 9, que pudieran ser [S8P] y [T9R].

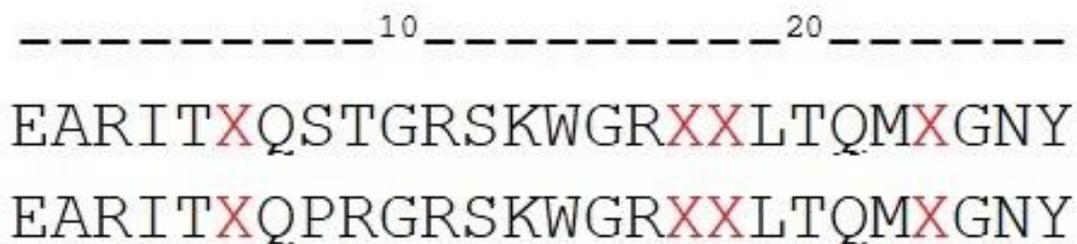


Figura 23. Secuencia parcial de aminoácidos de la fracción 8A obtenida por el principio de degradación de Edman. Las letras X en color rojo, corresponden a los ciclos en blanco que se asume que son posibles cisteínas.

7.5. Fraccionamiento del 2do lote de veneno total

A partir de un segundo lote de caracoles de *C. fergusonii*, se realizó la disección de 5 de ellos y se obtuvo de veneno crudo un total de 150 mg de proteína. Se utilizaron 80 mg de veneno disuelto en solución de extracción para realizar el fraccionamiento.

Se realizaron 10 análisis cromatográficos en RP-HPLC donde, para optimizar la obtención del componente de interés, la colecta manual se hizo por señales individuales en vez de fracciones de 5 minutos como se realizó anteriormente. En la Figura 24(A) se ilustra una de ellas y, en color naranja se muestra el equivalente al tiempo de retención de la fracción F5 (donde eluye el péptido de interés). En Figura 24(B) se aprecia un aumento al área de color naranja y cómo se nombraron las muestras colectadas en esta área.

El resto del veneno crudo se llevó a sequedad y posteriormente fue disuelto en fase móvil A. Se realizaron 6 análisis cromatográficos en RP-HPLC donde la colecta se realizó nuevamente por señales individuales; una de ellas se ilustra en la Figura 25(A) donde, en color naranja se muestra el equivalente al tiempo de retención de la fracción F5. Mientras que, en la Figura 25(B) se aprecia un aumento en esta área y como se nombraron las muestras colectadas en esta área.

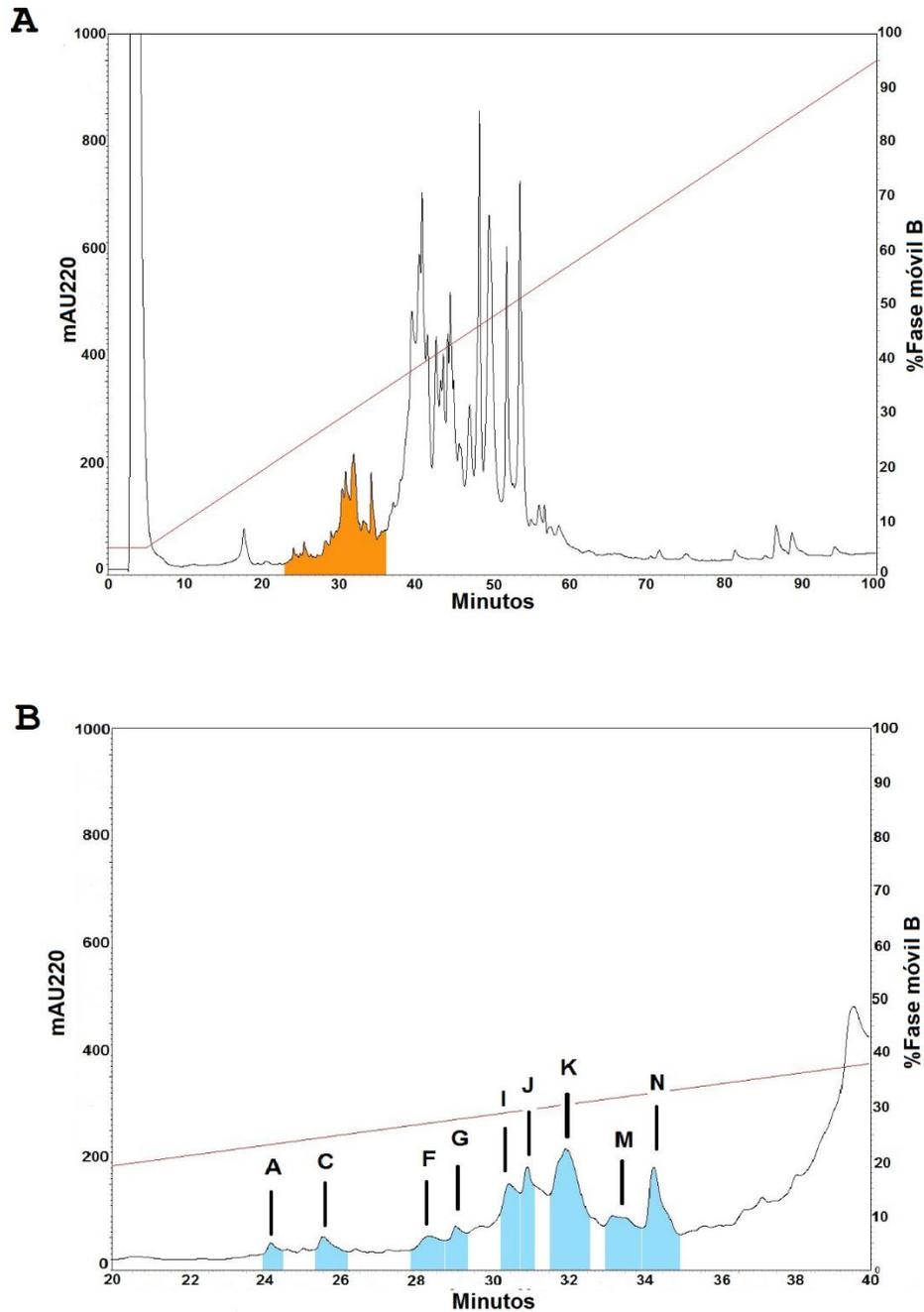


Figura 24. Perfiles cromatográficos del veneno total de *Conus fergusonii*, segundo lote. Paso isocrático a 5% de fase móvil B durante 5 min y gradiente lineal de 5 a 95% de fase móvil B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Veneno total disuelto en solución de extracción. El color naranja indica el tiempo que corresponde a la fracción F5, donde se encuentra el péptido de interés. (B) Aumento del área que corresponde a la fracción F5 (minutos 20 a 40); el color azul indica las señales mayoritarias y cómo fue su colecta.

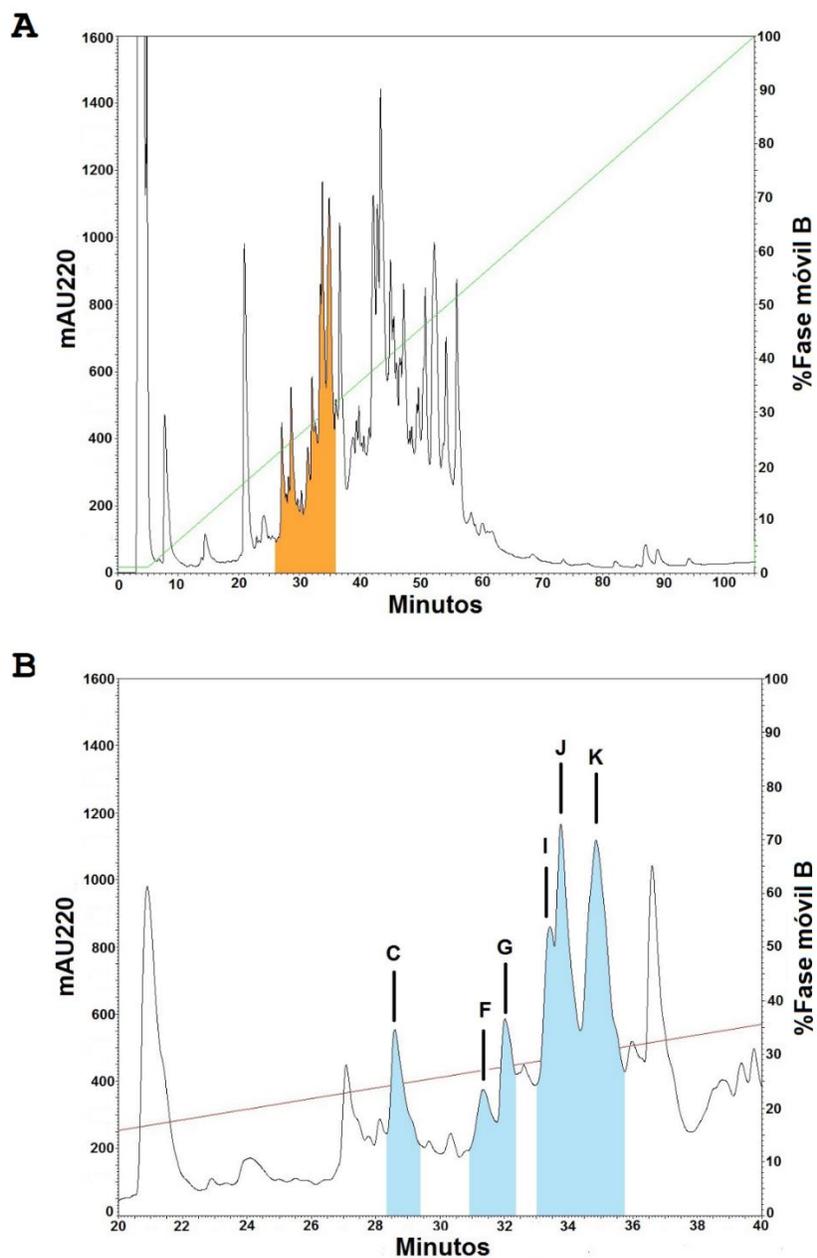


Figura 25. Perfiles cromatográficos del veneno total de *Conus fergusonii*, segundo lote. Paso isocrático a 1% de fase móvil B durante 5 min y gradiente lineal de 1 a 100% de fase móvil B en 105 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Veneno total disuelto en fase móvil A. El color naranja indica el tiempo que corresponde a la fracción F5, donde se encuentra el péptido de interés. (B) Aumento del área que corresponde a la fracción F5 (minutos 20 a 40); el color azul indica las señales mayoritarias y cómo fue su colecta.

7.6. Identificación del péptido de interés en el 2do lote de veneno

Para identificar cuál de las señales colectadas correspondía con exactitud al péptido con actividad, se enviaron 0.3 nmol de las muestras señaladas en las Figuras 24(B) y 25(B) para obtener sus espectros de masas.

En la Tabla 4 se resumen las m/z reportadas en los espectros de masas para el veneno que fue disuelto en fase móvil de extracción y fase móvil A respectivamente y se indica en color rojo, los pesos que son similares al encontrado para el péptido de interés.

Tabla 4. Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDIMALDI-ToF de las señales equivalentes a la fracción F5 disueltas en solución de extracción y fase móvil A.

Muestra	Pesos moleculares (m/z)					
Veneno disuelto en solución de extracción						
A	2,208.345*	3,231.528	3,445.438	4,767.698	6,311.371	6,968.107
C	3,216.046	3,445.085	3,883.193*	6,967.480		
F	3,119.843	3,625.125	4,722.911	4,916.096	5,462.269*	10,927.960*
G	2,722.470	3,076.158	3,624.263	4,923.023	5,263.381*	
I	2,725.070	3,625.370*	5,502.736*	11,005.930*		
J	2,725.311	3,626.285*	5,542.259	11,060.360		
K	2,727.029*	3,612.033	3,994.317	4,037.145	5,538.271	11,089.000
M	2,725.978*	3,612.142	3,840.405	4,034.790	5,470.423	
N	2,725.905*	3,707.400				
Veneno disuelto en fase móvil A						
C	3,453.806	3,934.524*	6,966.461			
F	3,123.512	3,641.323	4,726.419	5,266.503*	10,710.914*	10,933.717
	11,839.183	12,591.900	13,692.532	14,382.296	15,965.808	21,442.666
G	3,041.476	3,649.210	4,038.081	4,932.572	5,269.854*	

I	3,629.795	5,268.288*	5,694.265	11,006.272		
J	3,624.548*	5,264.270				
K	2,012.077	2,736.136	3,608.078	5,534.620*	11,075.988	

Nota: Se señalan en rojo las señales con un m/z similar al del péptido de interés. El asterisco (*) indica el ion molecular más abundante en cada una de las muestras.

A partir de este momento se utilizó el veneno disuelto en fase móvil A para el resto de las pruebas y ensayos debido a que se contaba con mayor cantidad de material.

Además de tener los espectros de masas, se realizaron registros electrofisiológicos a una concentración de 1.0 μM de las muestras, para identificar actividad inhibitoria sobre el RnACh $\alpha 7$; es por ello que, en este punto, sólo se realizaron los registros por duplicado. Se obtuvo que las muestras I, J y K presentaron inhibición por arriba del 90% sobre este receptor y de forma irreversible. El resto tuvo actividad por debajo del 70% o bien, no presentó actividad.

Las muestras I, J y K volvieron a fraccionarse para tener componentes puros, los cromatogramas resultantes se observan en la Figura 26(A) I en color verde, J en color naranja y Figura 26(B) K en color azul (K1) y rojo (K2) debido a que se colectaron de forma individual las dos señales que presentó.

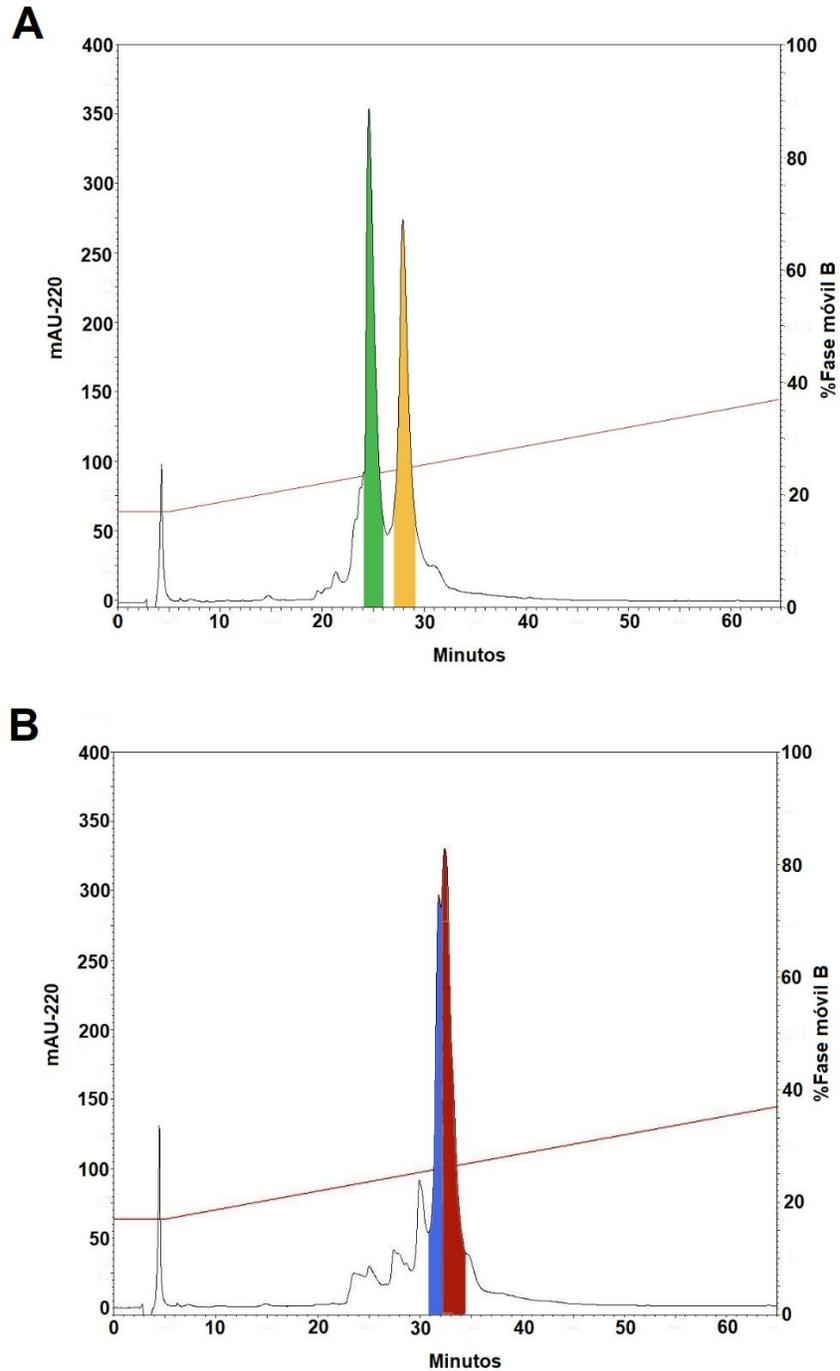


Figura 26. Perfiles cromatográficos del subfraccionamiento de I, J y K. Paso isocrático a 17% de fase móvil B durante 5 min y gradiente lineal de 17 a 37% de fase móvil B en 65 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Subfraccionamiento de I (verde) y J (amarillo); (B) Subfraccionamiento K, separando K1 (azul) y K2 (rojo). Los colores indican las señales mayoritarias y cómo fue su colecta para obtener sus espectros de masas.

Se obtuvieron los espectros de masas para las 4 muestras. Los valores se resumen en la Tabla 5 y, en la Figura 27 se muestran los espectros de K1 (A) y K2 (B), los de I y J se muestran en el Anexo IV.

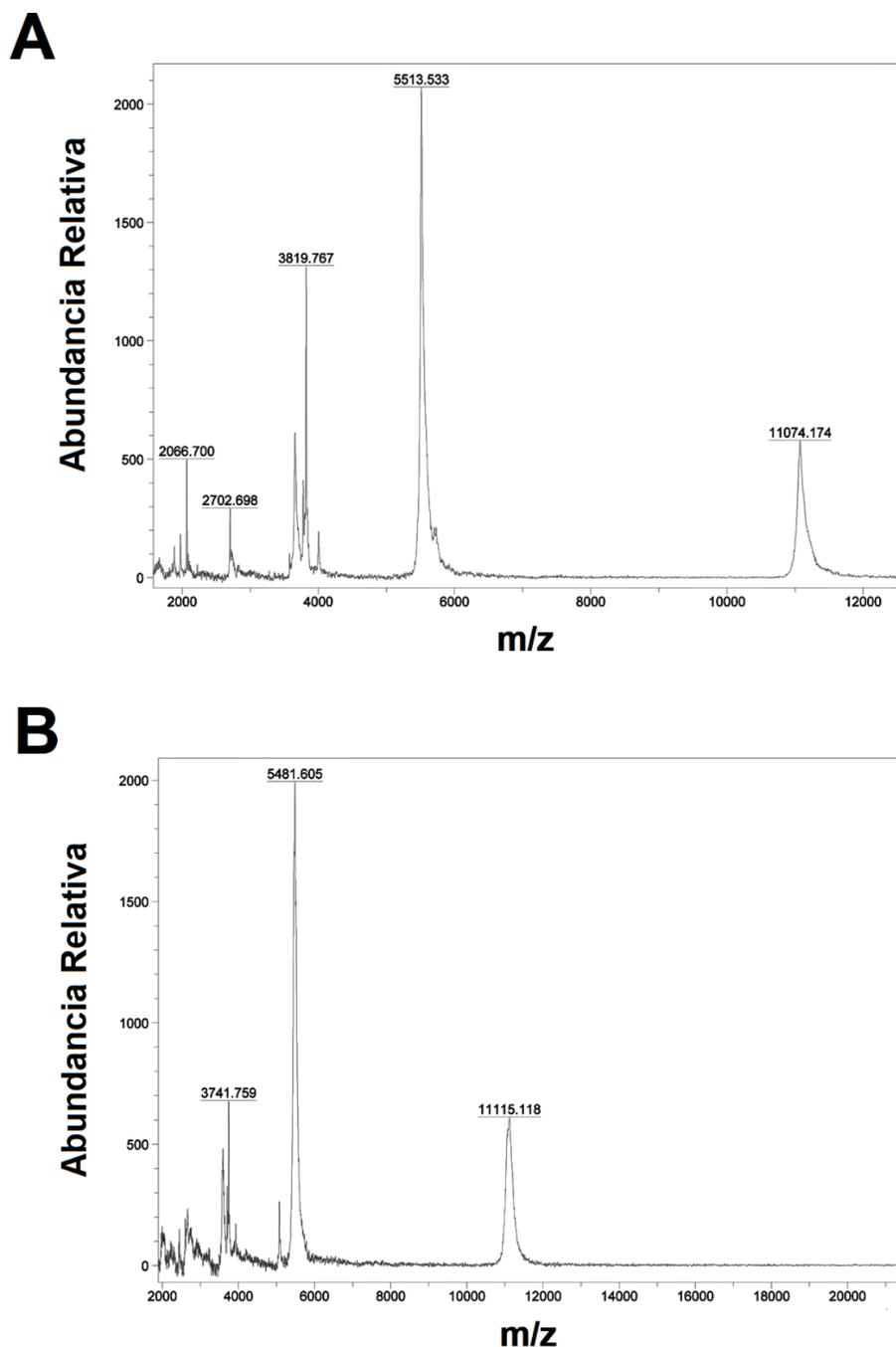


Figura 27. Espectros de masas de los péptidos semi-purificados de dos de las fracciones activas. (A) Péptido K1 en una ventana masa/carga que va de los 2,000 a los 12,000; (B) Péptido K2 en una ventana masa/carga que va de los 2,000 a los 20,000.

Tabla 5. Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras I, J, K1 y K2 resultado del subfraccionamiento.

Muestra	Pesos moleculares (m/z)					
I	1,812.44	2,313.290	3,591.955*	5,238.923	7,241.673	
J			3,903.081	5,479.732*		11,003.535
K1		2,066.700	3,819.767	5,513.533*		11,074.174
K2			3,741.759	5,481.605*		11,115.118

Nota: El asterisco (*) indica el ion molecular más abundante en cada una de las muestras.

7.7. Secuenciación. Transcriptómica de *C. fergusonii*

De un conducto aislado de *C. fergusonii*, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos que constituyen los transcritos del veneno de esta especie. Entre ellas, se identificaron tres precursores que contienen secuencias similares a la región de la toxina madura obtenida por la técnica de degradación de Edman.

Todas las secuencias están compuestas por 92 aminoácidos de longitud que incluyen la secuencia señal, una región pro y una toxina madura (Figura 28). Los precursores 1 y 2 contienen la misma toxina madura; por lo tanto, se refieren como secuencia 1 (de los precursores 1 y 2) y secuencia 2 (del precursor 3).

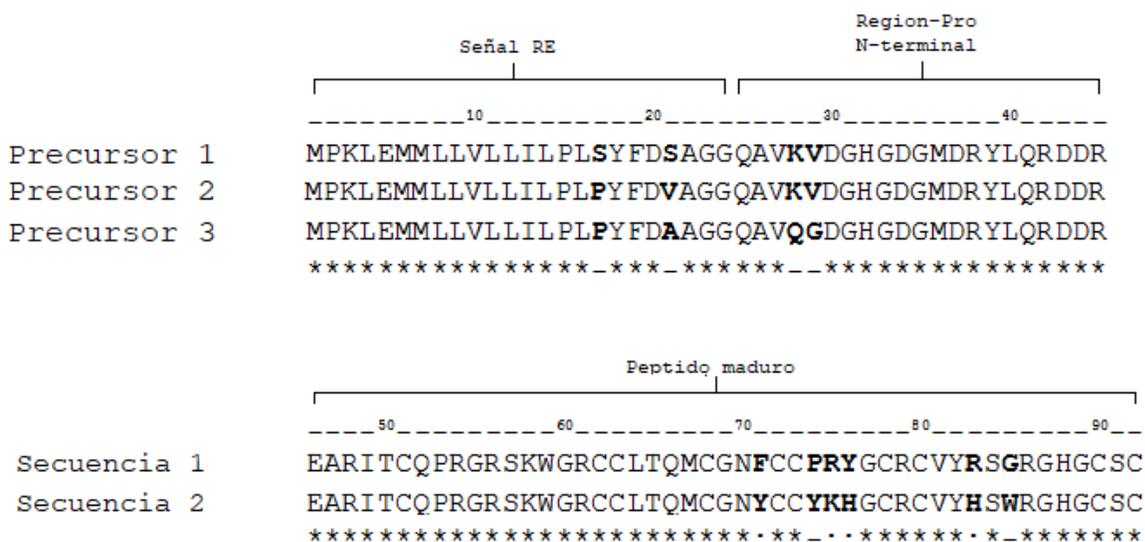


Figura 28. Transcriptómica de las α D-conotoxinas presentes en el veneno de *C. fergusonii*. Se muestra: en letras negritas los aminoácidos diferentes; * = el mismo aminoácido; _ = aminoácidos de diferente grupo funcional; : = aminoácidos del mismo grupo funcional.

7.8. Estudio de similitud

Se realizó el alineamiento de secuencias para la búsqueda de similitud de proteínas “BLASTp” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

Para la secuencia 1, dio 26 BLAST hits con un valor de E superior a $1e^{-20}$. Un porcentaje de identidad del 69.57% con valor de E de $3e^{-29}$ y una cobertura de búsqueda del 100% para el precursor de la superfamilia D de conotoxinas de *C. ermineus*. Además, de tener un porcentaje de identidad del 65.59% con un valor de E de $2e^{-37}$ y una cobertura de consulta del 100% para la conotoxina Cp20.4 de *C. capitaneus*, y un porcentaje de identidad del 64.13% con un valor de E de $1e^{-36}$ y una cobertura de consulta del 100% para VxXXA de *C. vexillum*.

Para la secuencia 2, se obtuvieron 25 BLAST hits con un valor de E superior a $1e^{-20}$. Un porcentaje de identidad del 72.83% con valor de E de $5e^{-30}$ y una cobertura de búsqueda del 100% para el precursor de la superfamilia D de conotoxinas de *C. ermineus*. Además, de un porcentaje de identidad del 67.74% con un valor E de $1e^{-38}$ y una cobertura de consulta del 100% para la conotoxina Cp20.4 de *C. capitaneus*, y un porcentaje de identidad del 61.29% con un valor de E de $7e^{-36}$ y una cobertura de consulta del 100% para GeXXA de *C. generalis*.

Considerando que la toxina con actividad pertenece a la superfamilia D de conotoxinas la cual se forma por dímeros, se decidió realizar la alquilación y reducción parcial y total de cisteínas.

7.9. Reducción y alquilación parcial de cisteínas

7.9.1. Método utilizado por Loughnan *et al.*, 2006

Se utilizaron 5 nmol del péptido F5.Sub8 (Figura 21, color rojo) para la reducción y alquilación parcial de cisteínas con el método utilizado por Loughnan *et al.*, 2006. En la Figura 29 (izquierda) se muestra el cromatograma del blanco de la reacción y (derecha) el cromatograma resultado de la purificación de la reducción y alquilación, en este se muestra en color las señales mayoritarias de las que obtuvieron los espectros de masas.

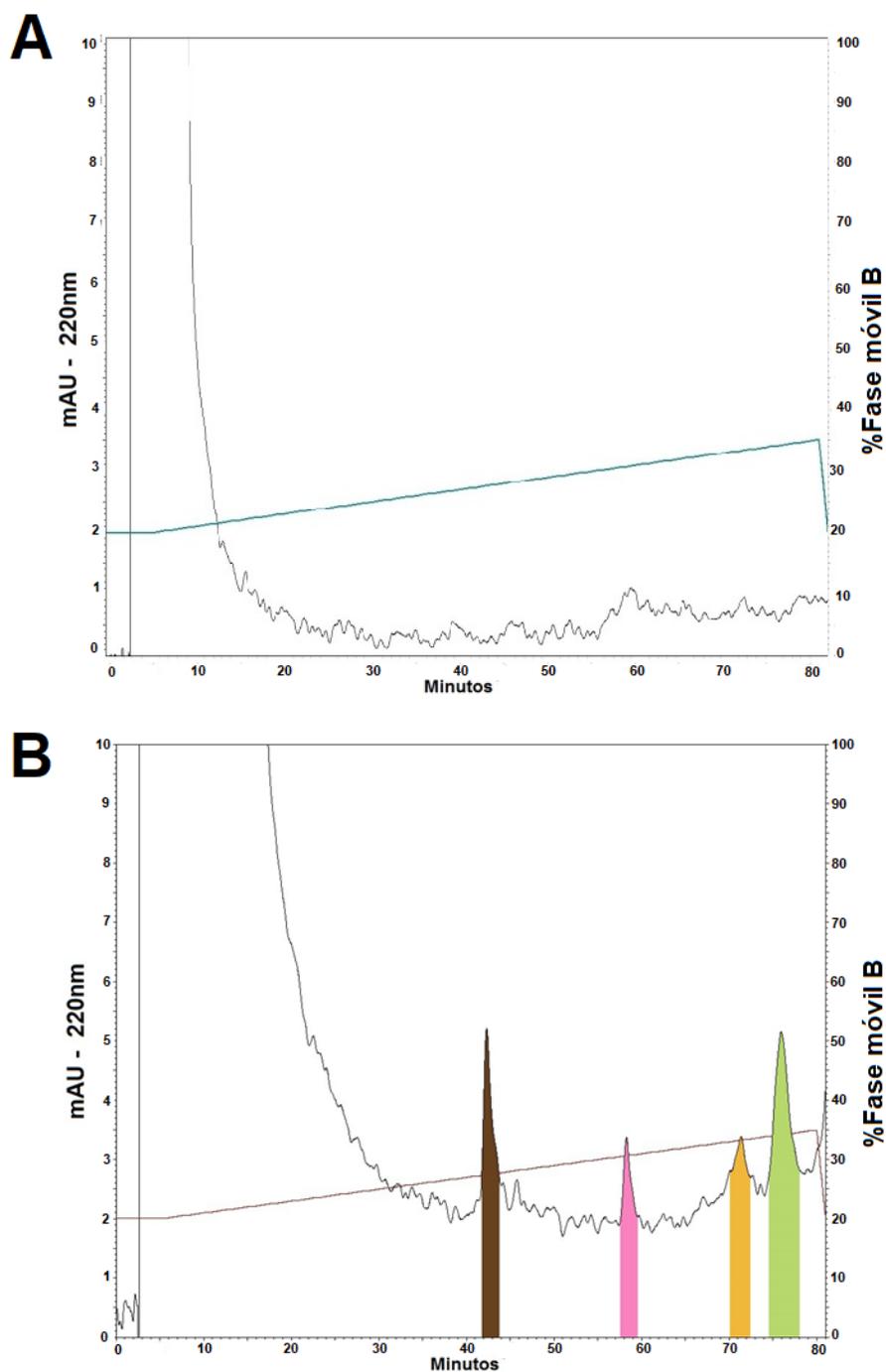


Figura 29. Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación parcial de 5 nmol del péptido F5.Sub8. Paso isocrático a 20% de fase móvil B y gradiente lineal de 20 a 35% de fase móvil B en 80 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Cromatograma del blanco de la reacción; (B) Cromatograma de la reducción y alquilación parcial de 5 nmol del péptido. Los colores indican cómo fue la colecta de las señales mayoritarias.

Los valores m/z para las señales mayoritarias p10 (café), p17 (rosa) y p23 (verde) se resumen en la Tabla 6. De la muestra p21 (amarilla) no se obtuvo espectro de masas.

Tabla 6. Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras del péptido F5.Sub8 reducidas y alquiladas parcialmente por el método usado por Loughnan *et al.*, 2006.

Muestra	Pesos moleculares (m/z)				
P10	5,382.576			7,654.525*	8380.135
P17				7,773.168*	
P23	5,377.058*	6,567.855	6736.731		

Nota: El asterisco (*) indica el ion molecular más abundante en cada una de las muestras.

7.9.2. Método usado por Aguilar *et al.*, 2006

Se utilizaron 2.5 nmol del péptido K para la reducción y alquilación parcial de cisteínas con el método utilizado por Aguilar *et al.*, 2006. En la Figura 30 (A) se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción y en la Figura 30 (B) el aumento en el área que corresponde al tiempo de elusión del péptido de interés; en este se muestra en color las señales mayoritarias de las que se obtuvo el análisis de espectrometría de masas.

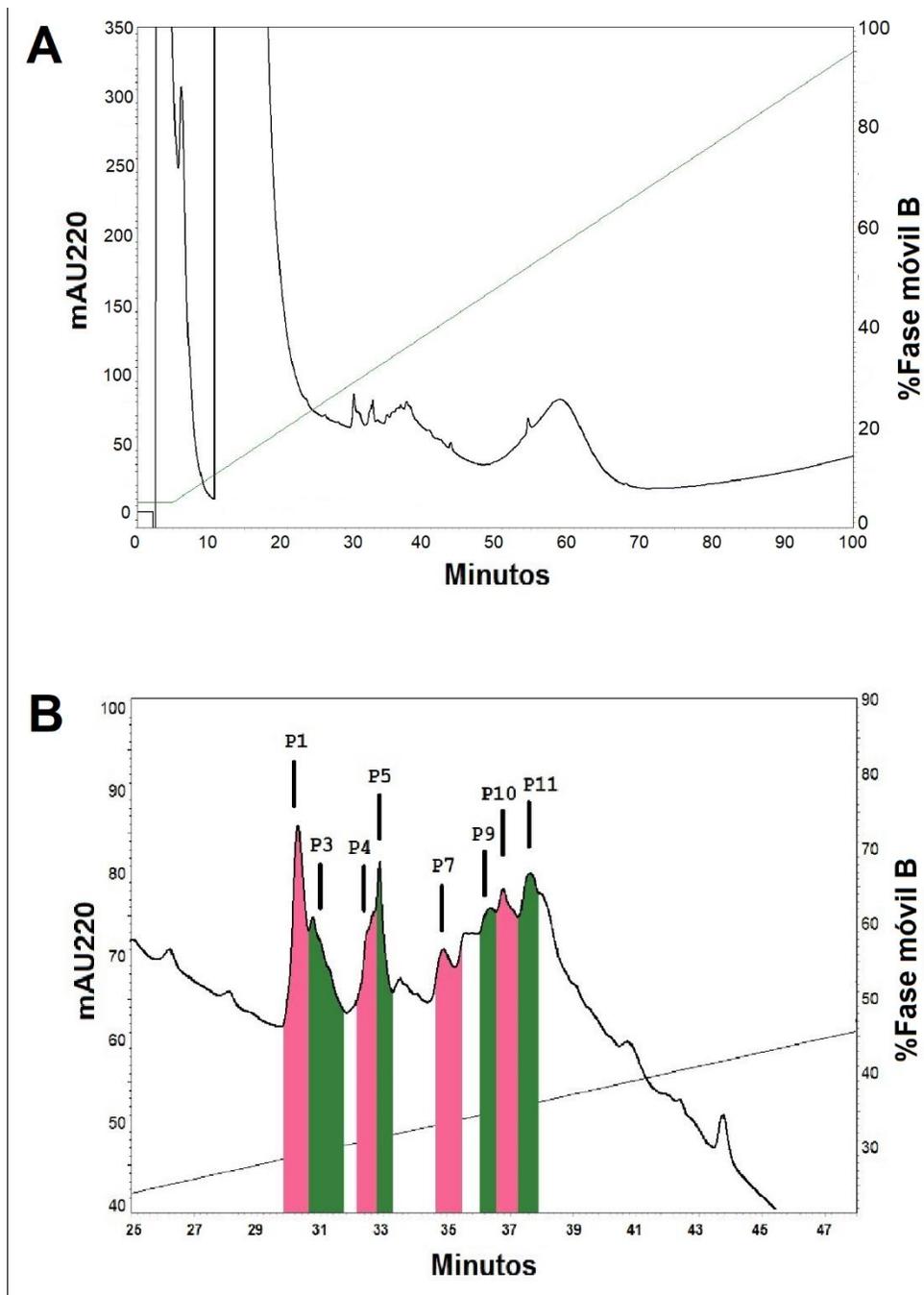


Figura 30. Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación parcial de 2.5 nmol del péptido K. Paso isocrático a 5% de fase móvil B y gradiente lineal de 5 a 95% de fase móvil B en 95 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Cromatograma de la reducción y alquilación parcial de 5 nmol del péptido; (B) Aumento del área que corresponde al tiempo de elución del péptido de interés (minutos 25 a 40); en colores se indica cómo fue la colecta de las señales mayoritarias y como fueron nombradas.

Los valores m/z para las 8 señales mayoritarias resultado de la reducción y alquilación, se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras reducidas y alquiladas parcialmente del péptido K por el método usado por Aguilar *et al.*, 2006.

Muestra	Pesos moleculares (m/z)					
P2				5,375.713*	6,951.387	
P3	2,784.249*				6,918.060	11,025.93
P4	2,811.761*			5,347.483		
P5	2,692.711*	3,846.893	4,093.17	5,349.21	6,923.67	
P7		3,114.392*		5,342.240	6,927.616	
P9		3,059.151*			6,929.786	
P10		3,059.329*			6,929.546	
P11		3,075.787*		5,353.051		

Nota: El asterisco (*) indica el ión molecular más abundante en cada una de las muestras.

Se utilizaron 10 nmol del péptido K para repetir la reacción; se utilizó el mismo método, pero se modificó el gradiente a utilizar siendo: 5 minutos de elución isocrática al 5% de fase móvil B, seguido por un gradiente lineal de 5-25% de B en 25 minutos, 10 minutos de elución isocrática en 25% de Sol B y, finalmente, un gradiente lineal de 25-50% de B en 75 minutos con un flujo de 1 mL/min).

En la Figura 31 se muestra el cromatograma del blanco (azul) y del resultado de la purificación de la reacción (negro); se marcan en color las señales de las que se obtuvo el análisis de espectrometría de masas.

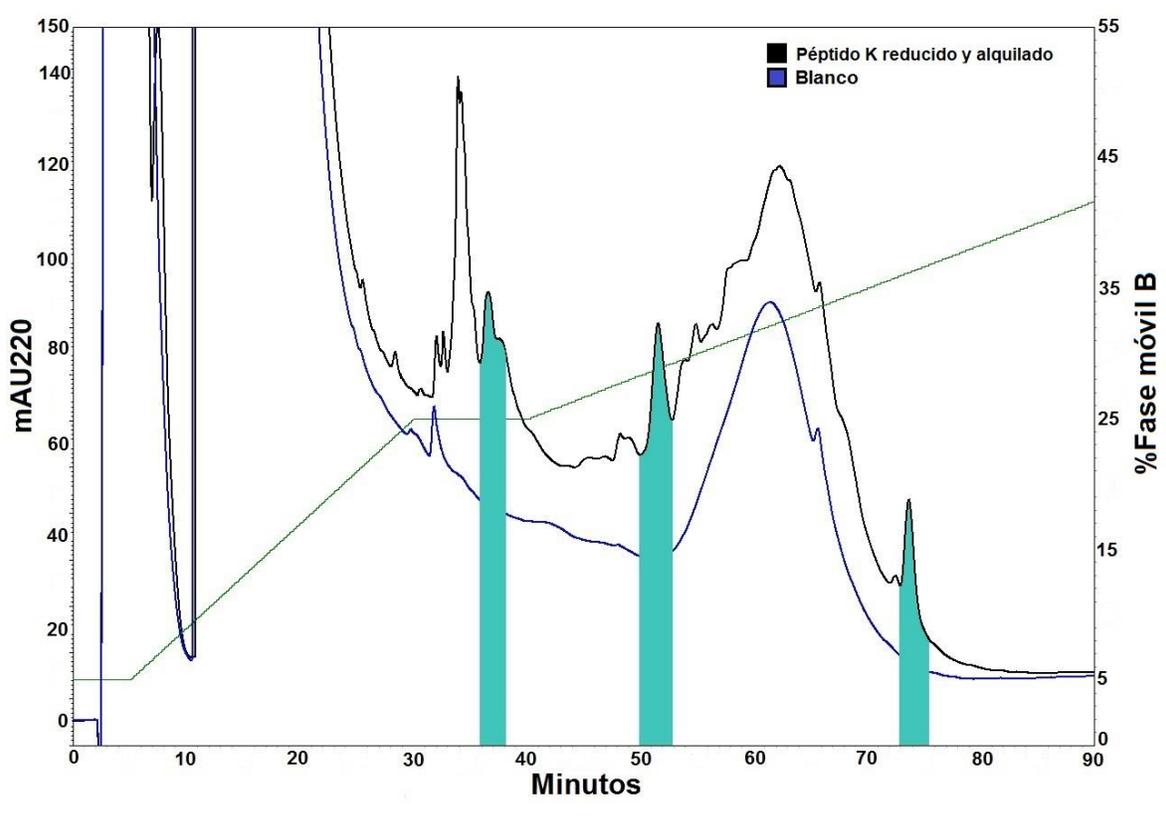


Figura 31. Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación parcial de 10 nmol del péptido K. Gradiente lineal de 5 a 25% de fase móvil B en 25 minutos, 10 minutos de elusión isocrática en 25% y, un gradiente lineal de 25-50% de B en 75 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. En color azul se muestra el blanco de la reacción y en color negro de la reducción y alquilación parcial de 10 nmol del péptido; en colores se indica cómo fue la colecta de las señales mayoritarias.

Tabla 8. Pesos moleculares (m/z) obtenidos por MALDI-ToF de las muestras reducidas y alquiladas parcialmente del péptido K por el método usado por Aguilar et al., 2006.

Muestra	Pesos moleculares (m/z)					
P9	2,864.217*	3,680.454	3,857.722	5,804.227		
P15	3,602.926	4,371.075	5,845.135	6,518.711	7,207.805*	11,598.174
P26	2,863.962*	4,367.036				

Nota: El asterisco (*) indica el ión molecular más abundante en cada una de las muestras.

7.10. Reducción y alquilación total de cisteínas.

7.10.1. Método usado por Aguilar *et al.*, 2006

Se utilizaron 4 nmol del péptido K para la reducción y alquilación total de cisteínas con el método utilizado por Aguilar *et al.*, 2006. En la Figura 32 se muestra el cromatograma del blanco (azul) y del resultado de la purificación de la reacción (negro).

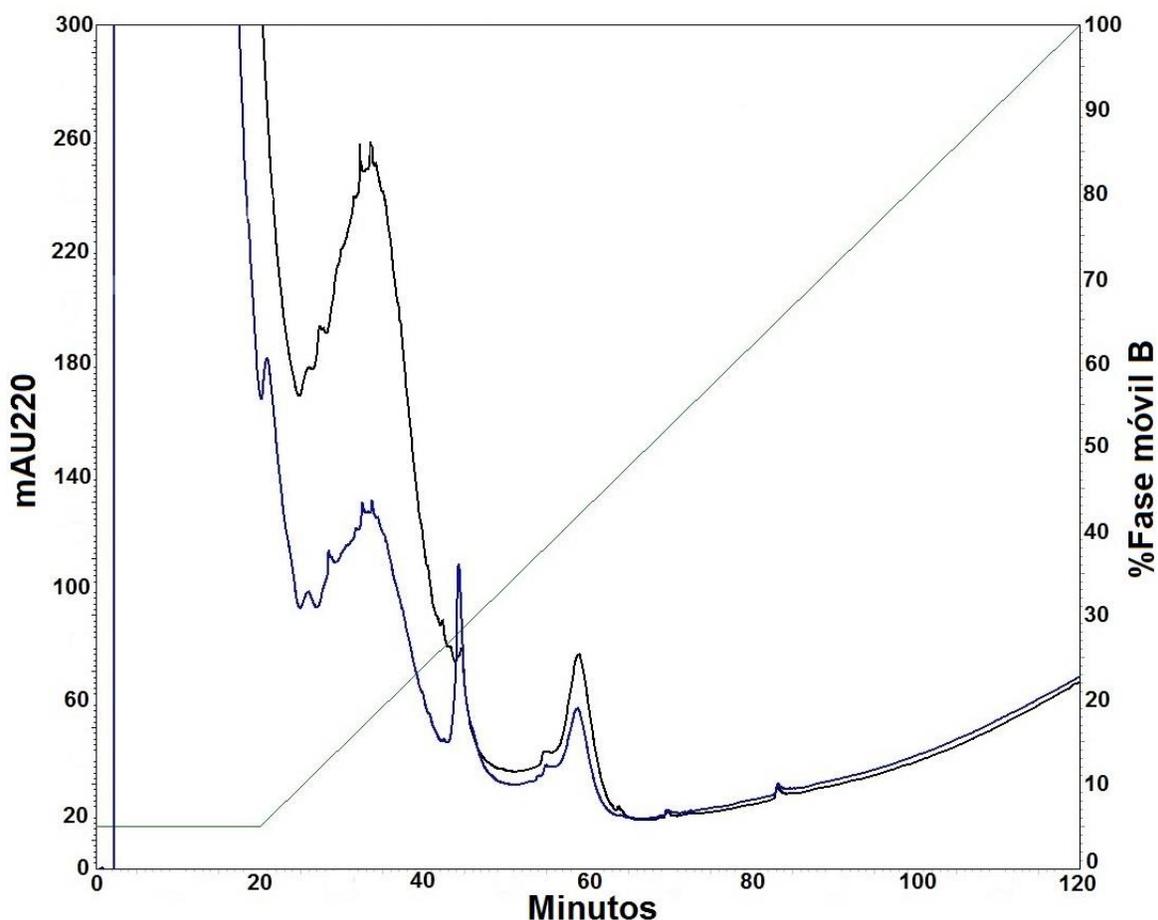


Figura 32. Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación total de 4 nmol del péptido K. Elusión isocrática de 20 minutos a 5% de fase móvil B seguido por un gradiente lineal de 5 a 100% de fase móvil B en 100 minutos con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. En color azul se muestra el blanco de la reacción y en color negro de la reducción y alquilación parcial de 4 nmol del péptido.

7.10.2. Método obtenido por la revisión de artículos

Se realizó un blanco con un método isocrático para identificar únicamente el tiempo que tardaron en eluir los reactivos utilizados en la reducción y alquilación total; estos tardaron aproximadamente 60 minutos en eluir en su totalidad (imagen no mostrada), por lo cual se decidió que el método isocrático debiera seguir hasta el minuto 70.

Se realizó un segundo blanco utilizando esta vez el gradiente elegido a partir de la revisión; este se observa en el cromatograma de la Figura 33(A) y un aumento en el área correspondiente a la absorbancia del blanco de reacción en la Figura 33(B).

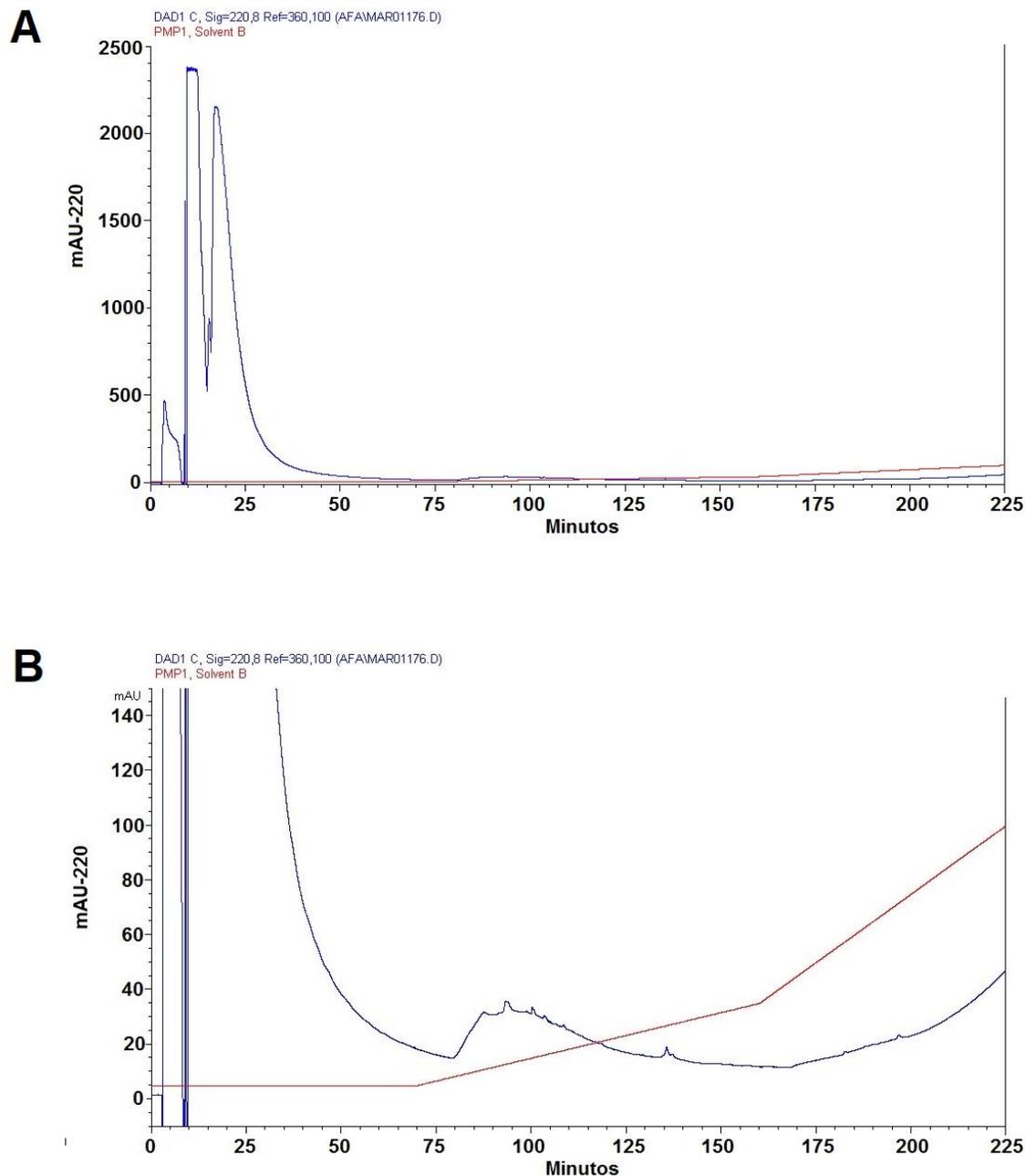


Figura 33. Perfiles cromatográficos del blanco la reducción y alquilación total. Elución isocrática de 5% fase móvil B por 70 minutos, seguido de un gradiente de 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Cromatograma completo del blanco de la reacción. (B) Aumento en el eje de las Y hasta una absorbancia de 150 mAU en el blanco de reacción.

La reducción total y alquilación de cisteínas se realizó con tres muestras de *C. fergusonii*. La primera fue la muestra K, que es con la que se había trabajado anteriormente. Se realizó también la reacción con las muestras I y J por ser contiguas a esta y por también presentar inhibición sobre RnACh.

7.10.3. Reducción y alquilación total. Péptido K

Se utilizaron 5.5 nmol del péptido K. En la Figura 34 se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción; se marcan con flechas las dos señales que fueron enviadas para obtener su secuencia por la técnica de degradación de Edman.

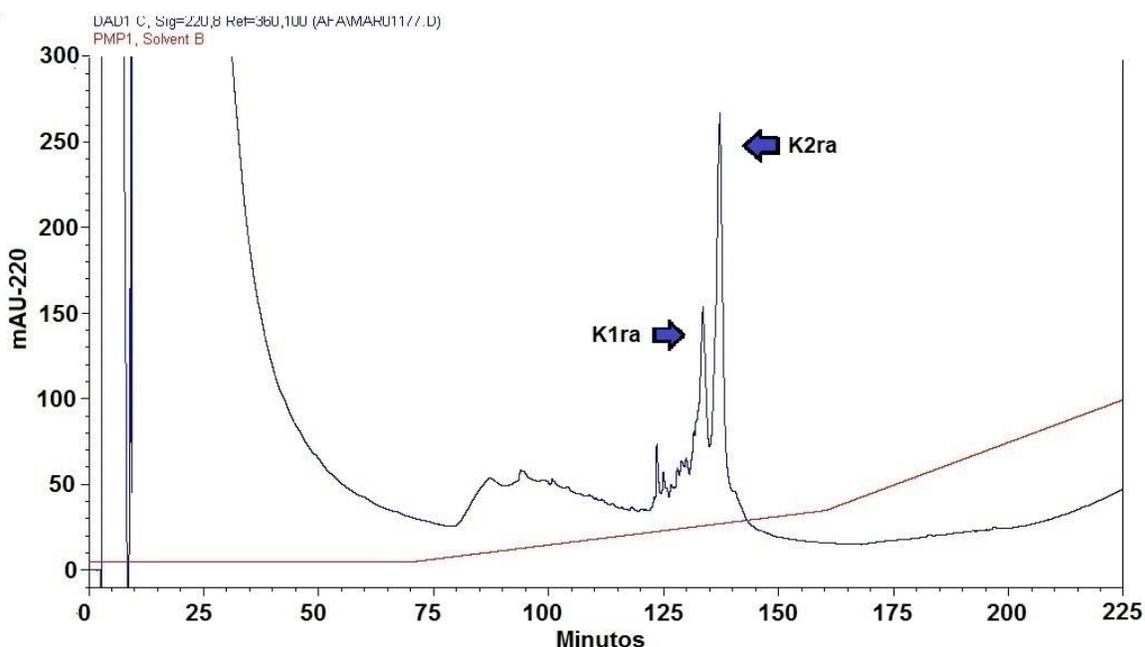


Figura 33. Perfil cromatográfico de la reducción y alquilación total de 5.5 nmol del péptido K. Elusión isocrática de 5% por 70 minutos, seguido de un gradiente de 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. Con flechas se señalan las señales mayoritarias K1ra y K2ra.

7.10.4. Reducción y alquilación total. Péptido I

Se utilizaron 4.28 nmol del péptido I. En la Figura 35(A) se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción; sin embargo, como se aprecia la presencia de muchos componentes (posible contaminación con J), por ello, se realizó una repurificación del péptido I y posteriormente se utilizaron 4.25 nmol de este para realizar la reducción y alquilación total de cisteínas. En la Figura 35(B) se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción.

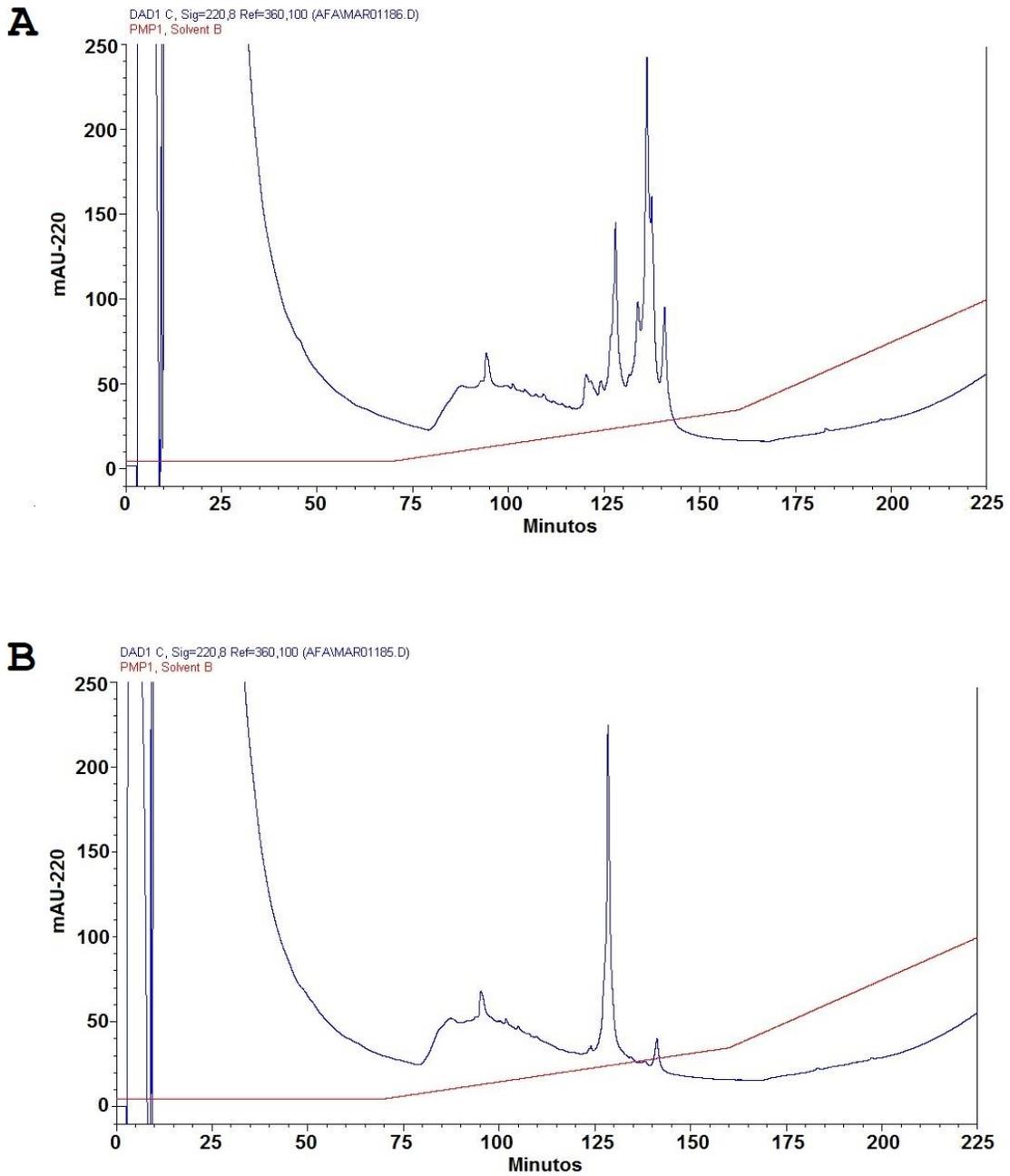


Figura 35. Perfiles cromatográficos de la reducción y alquilación total del péptido I. Elución isocrática de 5% por 70 minutos, 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Cromatograma de la reacción de 4.28 nmol del péptido I de veneno crudo; (B) Cromatograma de la reacción de 4.25 nmol del péptido I repurificado.

7.10.5. Reducción y alquilación total. Péptido J

Se utilizaron 4.13 nmol del péptido J. En la Figura 36(A) se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción; sin embargo, igual que con I, se aprecian muchos componentes (posible contaminación con I); por ello, se realizó una repurificación del péptido J y posteriormente se utilizaron 2.14 nmol de este para realizar la reducción y alquilación total de cisteínas. En la Figura 36(B) se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción.

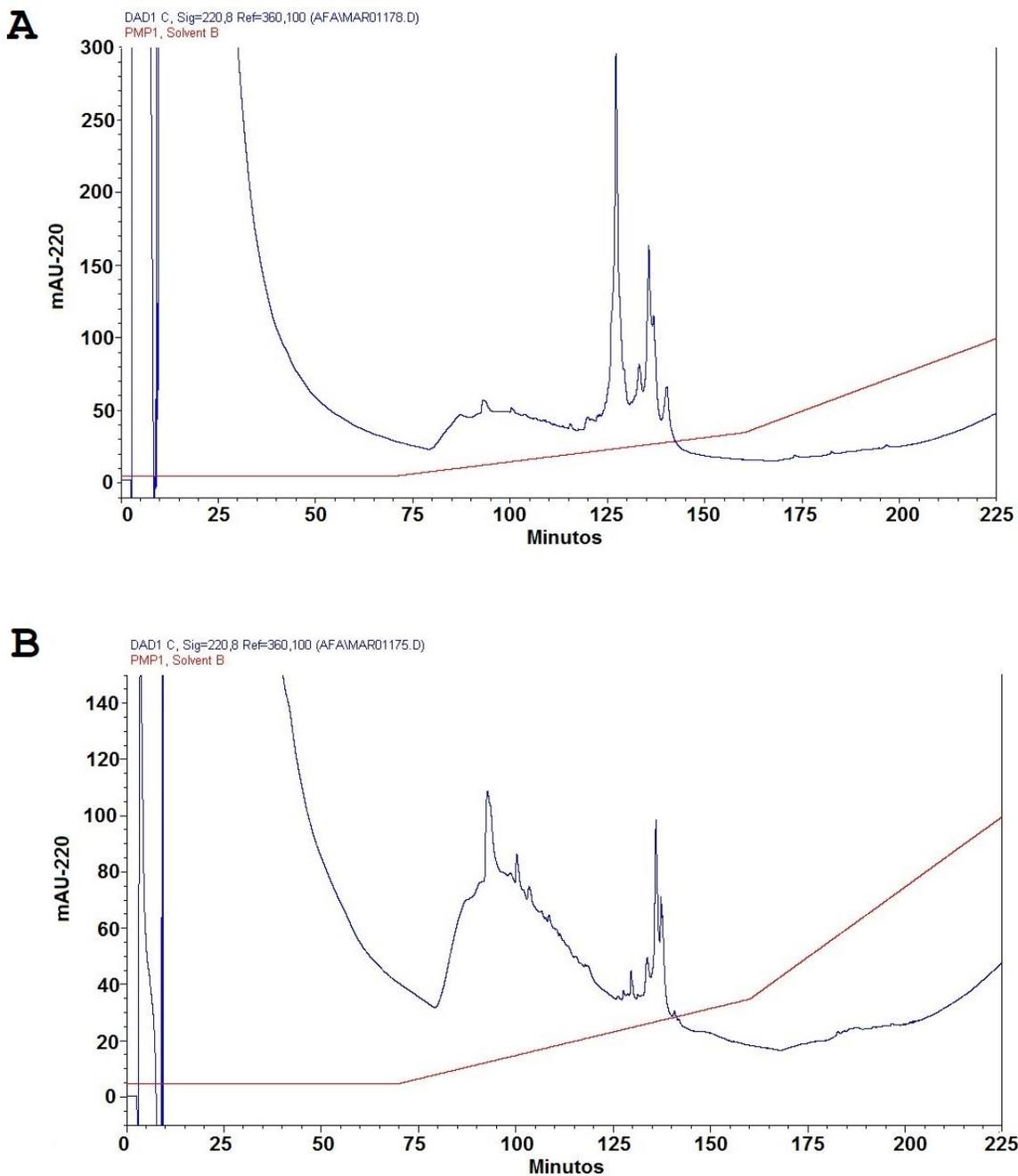


Figura 36. Perfiles cromatográficos de la reducción y alquilación total del péptido J. Elución isocrática de 5% por 70 minutos, 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Cromatograma de la reacción de 4.13 nmol del péptido J de veneno crudo; (B) Cromatograma de la reacción de 2.14 nmol del péptido J repurificado.

7.11. Reducción total de cisteínas (Método obtenido por la revisión de artículos)

Con la finalidad de tener una comparación entre la reacción completa (reducción y alquilación total) y la reacción parcial, se llevó a cabo la reducción de cisteínas de los péptidos I, J y K.

Se realizó un análisis cromatográfico con los reactivos utilizados para la reducción total de cisteínas (blanco) utilizando el gradiente de elusión de la reducción y alquilación total de cisteínas (Figura 37).

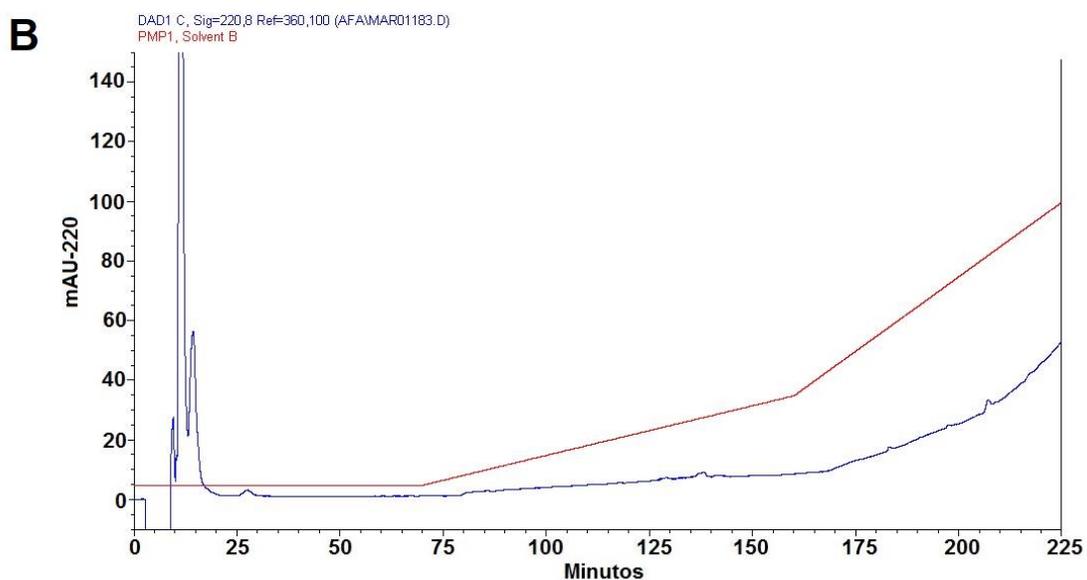
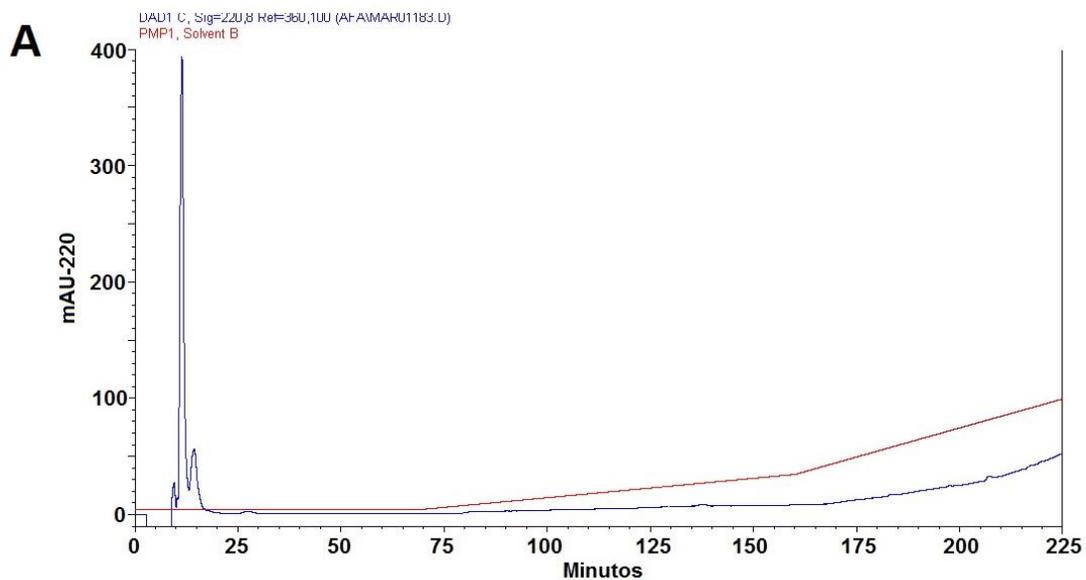


Figura 37. Perfiles cromatográficos del blanco de la reducción total. Elución isocrática de 5% por 70 minutos, 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm. (A) Cromatograma completo del blanco de la reacción. (B) Aumento en el eje de las Y hasta una absorbancia de 150 mAU.

7.11.1. Reducción de cisteínas. Péptido K

Se utilizaron 2.89 nmol del péptido K. En la Figura 38 se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción.

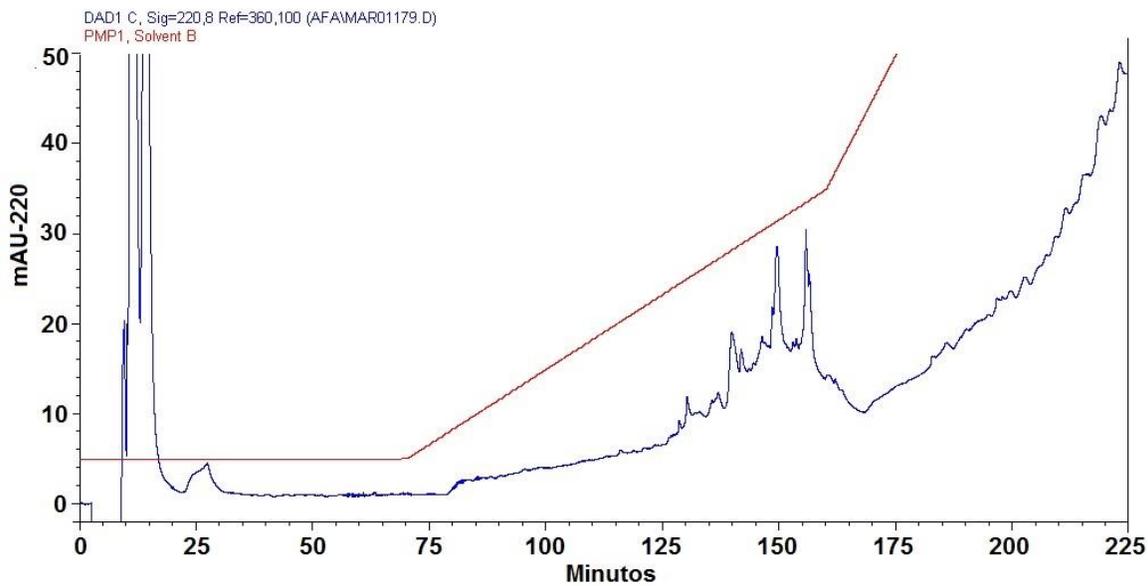


Figura 38. Perfil cromatográfico de la reducción total de 2.89 nmol del péptido K. Elución isocrática de 5% por 70 minutos, 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm.

7.11.2. Reducción de cisteínas. Péptido I

Se utilizaron 3.95 nmol del péptido I. En la Figura 39 se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción.

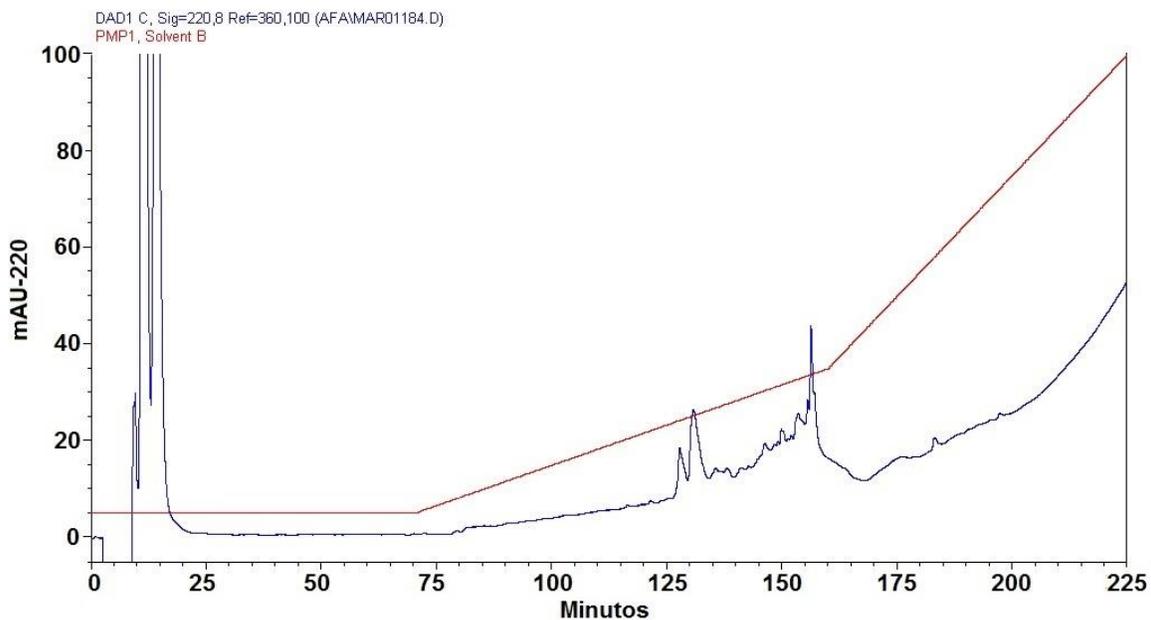


Figura 39. Perfil cromatográfico de la reducción total de 3.95 nmol del péptido I. Elución isocrática de 5% por 70 minutos, 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm.

7.11.3. Reducción de cisteínas. Péptido J

Se utilizaron 3.78 nmol del péptido J. En la Figura 40 se muestra el cromatograma resultado de la purificación de la reacción.

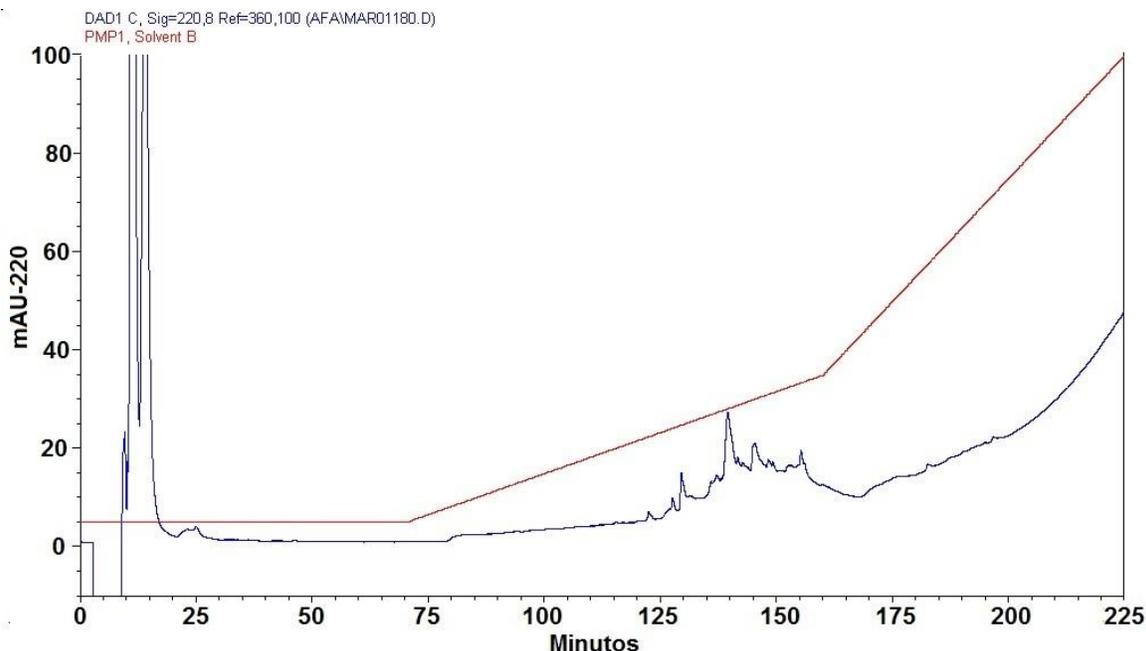


Figura 40. Perfil cromatográfico de la reducción total de 3.78 nmol del péptido J. Elución isocrática de 5% por 70 minutos, 5 a 35% fase móvil B en 90 minutos, 35 a 100% fase móvil B en 65 min con un flujo de 1 mL/min, utilizando el detector de UV-VIS a una λ de 220 nm.

7.12. Curva dosis-respuesta

Para determinar la afinidad del péptido K, se evaluó probó en los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$, y $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ del RnACh. Para generar curvas concentración-respuesta, se evaluaron a las concentraciones que se indican en la Tabla 9.

La curva concentración-respuesta del péptido K sobre los diferentes subtipos de RnACh se ilustra en la Figura 41. La IC_{50} se encontró en un rango del orden de nM para todos los subtipos de RnACh, con una afinidad ligeramente superior para el subtipo $\alpha 7$. La afinidad se encontró de la siguiente manera: $\alpha 7$ (125 nM) > $\alpha 3\beta 2$ (282 nM) > $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ (351 nM) > $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ (447 nM) > $\alpha 4\beta 2$ (697 nM).

Tabla 9. Concentraciones del péptido K utilizadas para obtener la IC₅₀ de cada subtipo de RnACh.

Receptor	Concentración						
$\alpha 7$	100 nM	125 nM	150 nM	200 nM	300 nM	600 nM	1 μ M
$\alpha 4\beta 2$	100 nM	300 nM	600 nM	1 μ M	2.5 μ M		
$\alpha 3\beta 2$	100 nM	200 nM	300 nM	600 nM	1 μ M		
$(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$	100 nM	300 nM	375 nM	450 nM	600 nM	1 μ M	
$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$	100 nM	150 nM	300 nM	600 nM	1 μ M		

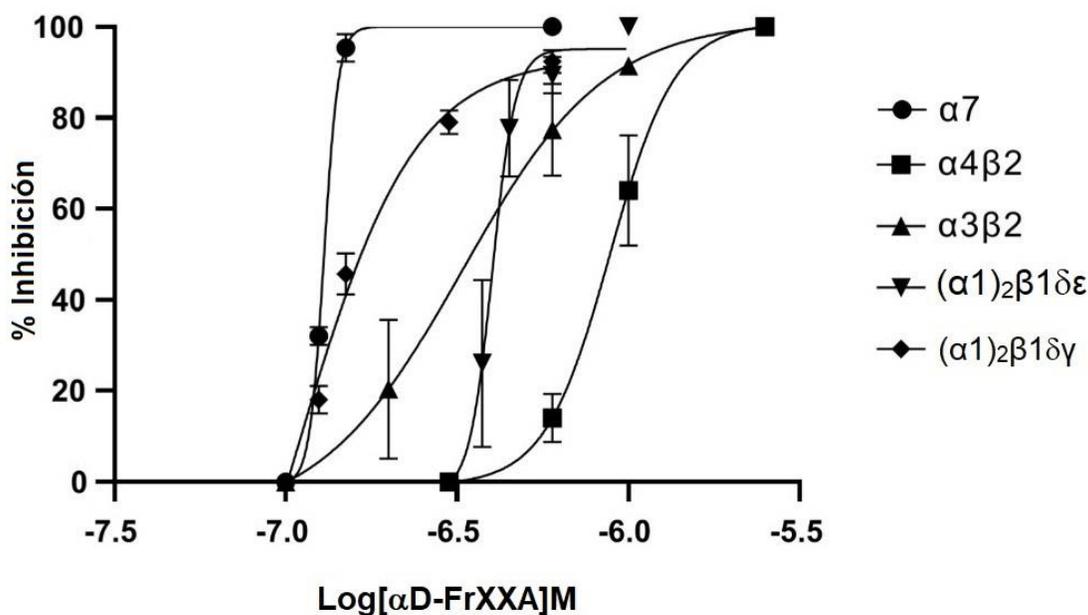


Figura 41. Curva dosis-respuesta del péptido K sobre el RnACh. Subtipos: $\alpha 7$ (IC₅₀ = 125 nM), $\alpha 4\beta 2$ (IC₅₀ = 697 nM), $\alpha 3\beta 2$ (IC₅₀ = 282 nM), $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ (IC₅₀ = 351 nM) y $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ (IC₅₀ = 447 nM) (n = 3 para cada concentración; Barras de error = error estándar de \bar{X}).

Para demostrar las distintas tasas de disociación en los diferentes subtipos de RnACh, evaluamos una concentración de 600 nM del péptido K (a partir de ahora

denominado α D-FrXXA) que está cerca de los valores más altos de IC_{50} . α D-FrXXA demostró diferentes tasas de disociación, la más lenta fue para el subtipo $h\alpha 7$ (casi irreversible) mientras que la más rápida fue para el subtipo $h\alpha 4\beta 2$ (Figura 42).

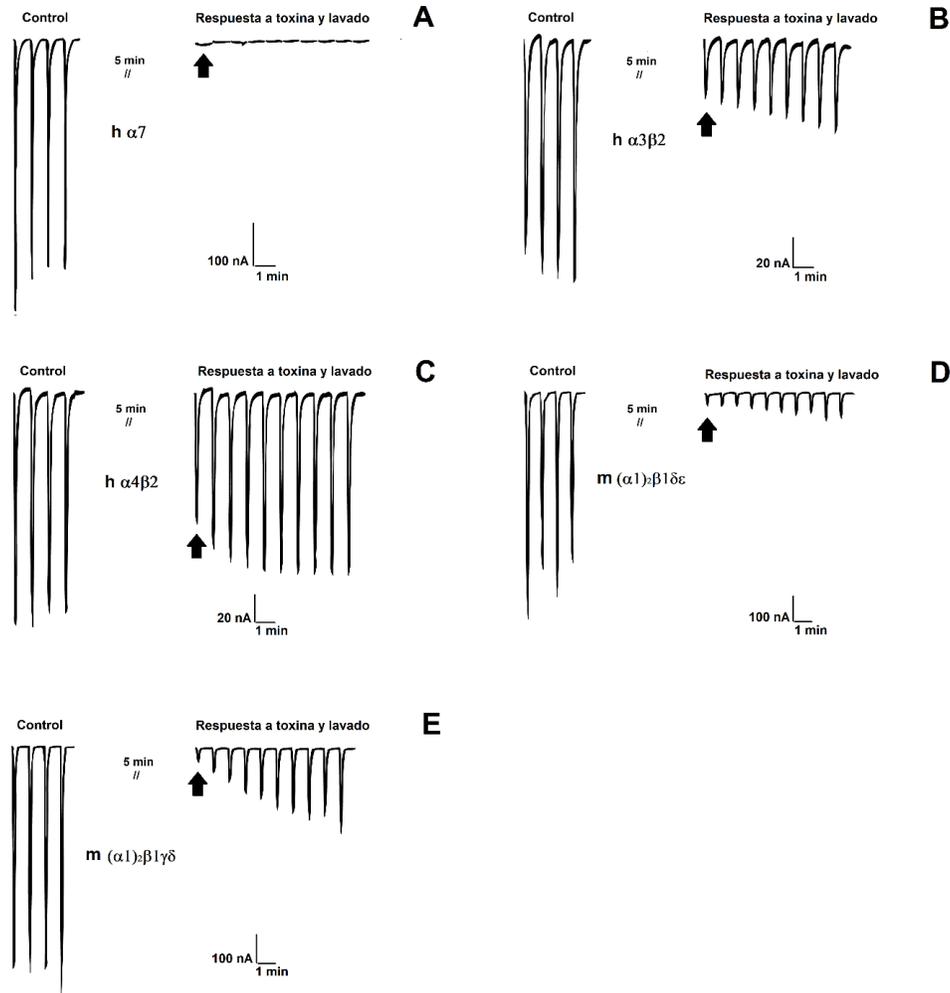


Figura 42. Registro de corrientes de diferentes subtipos de RnACh antes y después de su incubación con [600 nM] del péptido α D-FrXXA. (A) $h\alpha 7$, (B) $h\alpha 3\beta 2$, (C) $h\alpha 4\beta 2$, (D) $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$, y (E) $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$; a la izquierda, corrientes control generadas por pulsos de 1 s de 200 mM (A), 100 mM (B y C), 10 mM (D) y 1 mM (E) de acetilcolina previo a la adición del péptido. A la derecha amplitud de las corrientes al término de los 5 minutos de incubación con el péptido, seguido del lavado de la toxina con estimulaciones del agonista por intervalos de 1 min. // indica que el flujo de ND96 se paró por 5 minutos y se dio la incubación con el péptido.

8. DISCUSIÓN

Durante estudios previos (Rodriguez-Ruiz, 2017) se observó que la fracción F5 del veneno de *C. fergusonii* presentó actividad inhibitoria irreversible sobre el subtipo $\alpha 7$ del RnACh. Por ello, este proyecto se orientó en la caracterización bioquímica del componente(s) que causaba esta actividad, además de identificar la selectividad que podía presentar sobre los diferentes subtipos de RnACh.

Lo primero que se realizó fue el fraccionamiento del veneno total y posteriormente el subfraccionamiento de la fracción. Toda colecta de veneno se realizó de manera manual para evitar la contaminación con las fracciones y/o señales adyacentes. Las cuatro señales que resultaron de ello (7A, 7B, 8A y 8B) tuvieron actividad inhibitoria sobre el RnACh $\alpha 7$ de forma irreversible; en todas ellas se encontraron pesos moleculares en común, los cuales fueron de $\pm 5,500$ y $\pm 11,100$ Da, como se observó en la Tabla 3. Debido a que los pesos se obtuvieron por medio de la técnica de MALDI-ToF, es factible que el ion molecular con peso de $\pm 5,500$ Da corresponda a una proteína o compuesto con carga +2 mientras que el ion molecular con peso de $\pm 11,100$ Da sea el mismo compuesto o proteína con carga +1. Considerando esto, mediante la técnica de desconvolución (ajuste de peso molecular en función el número de cargas), los valores desconvolucionados para estas muestras se señalan en la Tabla 10:

Tabla 10. Pesos moleculares desconvolucionados de 7A, 7B, 8A y 8B.

Muestra	Peso molecular (Da)		Muestra	Peso molecular (Da)	
	Carga +2	Carga +1		Carga +2	Carga +1
7A	11,071.726	11,077.365	8A	11,133.980	11,136.035
7B	11,069.002	11,071.749	8B	11,185.158	11,131.280

Como se puede observar, las fracciones 7A, 7B y 8A, presentan una diferencia de menos 10 Da entre los valores desconvolucionados de carga +1 y +2, lo cual corrobora el hecho que, en efecto, el peso de $\pm 5,500$ sea para el compuesto o proteína carga +2. Para el caso de 8B, la diferencia es de 53.8 Da, el cual podría explicarse por la presencia de dos

aductos de sodio que darían nuevamente una diferencia menor a 10 Da, estando en todos los casos, en el 0.1% del porcentaje de error obtenido con la técnica de MALDI-TOF.

La mayoría de las conotoxinas que tienen actividad sobre RnACh pertenecen a la Superfamilia A; sin embargo, estos son péptidos pequeños (12 a 20 aminoácidos), por consiguiente, sus pesos moleculares oscilan los 1,000 a 2,000 Da (Nicke *et al.*, 2004). El hecho que la conotoxina de interés tenga un peso de ± 11 kDa, el cual es tan diferente al encontrado en la superfamilia A, fue la causa de pensar que podía pertenecer a esta superfamilia, pero contaba con características nuevas a las reportadas o bien, pertenecía a otra superfamilia de conotoxinas con actividad sobre RnACh. Esto hizo aún más importante la caracterización de la conotoxina de estudio.

Para poder caracterizarla, fue necesario obtener más veneno; sin embargo, el 2do lote presentó una cantidad de veneno menor (150 mg totales) respecto al lote previo (240 mg totales) pese a ocupar organismos de tamaño similar.

Debido a la menor cantidad de veneno total obtenida, se decidió cambiar la forma de colectar el veneno; previamente había sido en fracciones, y a partir del lote 2 fue por señales individuales. Esto evitó, al menos, un paso de repurificación respecto a cuándo se colectó por fracciones y tuvo la finalidad de perder el mínimo de material.

El lote 2 de veneno fue dividido en 2 partes: una parte se liofilizó para su uso posterior, mientras que la otra (disuelta en solución de extracción), fue usada para el fraccionamiento tal y como se había usado previamente y como se reporta en la mayoría de los protocolos para el fraccionamiento del veneno total de conotoxinas. Sin embargo, la cantidad recuperada después de la separación para obtener la fracción F5 del veneno fue muy pobre; la señal más alta del cromatograma, correspondiente al péptido K, no sobrepasó los 220 mAU de absorbancia (Figura 24) mientras que para el primer lote se habían observado más de 1,000 mAU para esta señal (Figura 20).

Por esta razón, se decidió modificar el protocolo y el veneno liofilizado fue disuelto en fase móvil A. Si bien se ocuparon 2 mg de veneno crudo más en cada corrida cromatográfica, y por ende ya se esperaba un incremento en la absorbancia registrada para cada señal, la cantidad de veneno recuperada fue, al menos, 5 veces mayor. Por ejemplo, Péptido C: Sol. Extracción 50 mAU – fase móvil A 600 mAU; Péptido I: Sol. Extracción 100

mAU – fase móvil A 800 mAU; Péptido K: Sol. Extracción 200 mAU – fase móvil A 1100 mAU.

Este aumento en la recuperación de la muestra puede deberse a que los péptidos de la fracción F5 de veneno de *C. fergusonii* corresponden a la parte hidrofílica del veneno y, al utilizar fase móvil A, se disolvieron de mejor forma ayudando a recuperar mayor cantidad de material, dado que la cantidad de acetonitrilo es de 5% comparado con el 40% de ACN utilizado en la solución de extracción. Durante el fraccionamiento del veneno total de *C. fergusonii* a diferentes porcentajes de ACN en la solución de extracción, es muy notoria la variación en la cantidad de material recuperado respecto al porcentaje de ACN utilizado, en especial en los componentes presentes en la primera mitad del cromatograma del veneno, los cuales corresponden a los componentes más polares (Baéz-Cruz, 2022).

Una vez que se obtuvieron los pesos moleculares de las señales colectadas individualmente y con los registros electrofisiológicos sobre el RnACh $\alpha 7$, se observó que los péptidos I, J y K son los que presentaron actividad inhibitoria y pesos de $\pm 5,500$ y $\pm 11,000$ Da. Sin embargo, al comparar los tiempos de retención de F5.Sub7 y F5.Sub8 con los tres péptidos, fue el péptido K el equivalente al péptido de interés (aunque los péptidos I y J fueron utilizados para otras pruebas posteriores).

Por medio de la técnica de degradación de Edman, se obtuvo una secuencia de 26 aminoácidos, con posibles cambios de aminoácidos en las posiciones 8 y 9 [S8P], [T9R] y cuyos pesos calculados fueron a 2,949.36 Da o de 2,929.38 Da respectivamente. Sin embargo, ninguno de estos dos pesos coincidió con los pesos experimentales de ± 11 kDa, lo que indicó que se contaba con una secuencia parcial.

Con base en el patrón de cisteínas encontrado en esta secuencia parcial (C-CC-C), el cual corresponde al arreglo tipo XXIV, se encontró que está presente en las superfamilias B3 y L (ConoServer, 2019) sin embargo, también es una forma parcial del arreglo tipo XX que se observa en la superfamilia D, la cual es una familia compuesta por dímeros (ConoServer, 2019).

Se realizó la comparación de las conotoxinas que presentan este patrón (Tabla 11) y se observó que el péptido K presentó mayor similitud con las conotoxinas de la Superfamilia D. Primero, por la cantidad de aminoácidos inter-cisteínas; segundo, el blanco molecular, ya que las cuatro conotoxinas de la superfamilia D tiene actividad sobre el RnACh; tercero, por su peso molecular que, en forma dimérica oscila cerca de los 11 kDa

(los monómeros pesan entre los 5,100 a 5,700 Da); y finalmente, que esta superfamilia incluye un motivo conservado “WGRCC”, que Loughnan *et al.*, (2006) menciona siempre está presente en las conotoxinas de la superfamilia D y es el mismo que se encuentra en los aminoácidos 14 a 18 de la secuencia a estudiar.

Tabla 11. Conotoxinas que presentan el arreglo de cisteínas tipo XXIV

Conotoxina	SF	PM (Da)	Secuencia
Mi041	L	1,064.22	---SSCPPACCPTC
VxXXIVA	B	4,625.31	---VR C LEKSGAQPNKLF R PP CC QKGPSFARHS R CVYYTQSRE
	3		
GeXXA	D	5,117.01	---- P C QSVRPGRVWGK CC LTRL C STM CC ARAD CT CVYHTWRG HGC SCVM
VxXXA	D	5,127.80	-DVQD C QVSTOGSKWGR CC LN R VC G PM CC PASH CY CVYHRGR HGC SC
VxXXB	D	5,735.35	DDY S Y CI INTRDSPWGR CC TR M CGSM CC PRNG CT CVYHWRRG HGC SC PG
VxXXC	D	5,276.01	-DLRQ CT RNAPGSTWGR CC LN P MGNF CC PRSG CT CAYNWRRGI Y CS C
Pep. K	-	5,567.99	EARIT C QSTGRSKWGR CC LT Q MGNY

Nota: Se marcan en negritas las cisteínas de las secuencias.

Sería imposible obtener la secuencia total del péptido K únicamente por medio de degradación de Edman, por ser un péptido muy largo (aproximadamente 50 aminoácidos) sin realizar cortes en la secuencia y sin la separación previa del dímero. Es por ello que se realizó el estudio por transcriptómica con el que se obtuvo que *C. fergusonii* presenta dos secuencias de toxinas maduras pertenecientes a la Superfamilia D, con un total de 47 aminoácidos cada una, que varían entre ellas únicamente por 6 aminoácidos [F26Y], [P29Y], [R30K], [Y31H], [R38H], [G40W] como se observa en la Figura 28.

Con ayuda del programa IonSource, considerando cisteínas oxidadas y el C-terminal libre para ambos casos, se obtuvo un peso de 5,297.18 Da para la secuencia 1 y de 5,435.30 Da para la secuencia 2, que corresponden al monómero del péptido. Al calcular el peso del dímero, los valores fueron de 10,594.36 para la secuencia 1 y 10,870.60 para la secuencia 2; en ambos casos los pesos calculados fueron menores al peso experimental.

Es de mencionar que las conotoxinas de la superfamilia D se pueden formar por heterodímeros (ambas cadenas son diferentes), homodímeros (ambas cadenas son iguales), y pseudohomodímeros (ambas cadenas son iguales, pero varían por las modificaciones postraduccionales que presentan) (Loughnan *et al.*, 2006), lo cual explicaría el por qué no coinciden los pesos experimentales con los calculados.

Conociendo la secuencia y que la toxina presenta actividad sobre los RnACh, es posible nombrarla correctamente. Siguiendo la nomenclatura de conotoxinas, su nombre es α D-FrXXA. α por su actividad sobre RnACh, D por pertenecer a la superfamilia D; Fr por la especie *C. fergusonii*; XX por el arreglo de cisteínas y A por ser la primera conotoxina reportada con estas características para esta especie.

Para conocer la conformación del dímero, era necesario romper los puentes disulfuro que unían ambas cadenas, por ello, durante el proyecto se realizaron diferentes técnicas para la reducción y alquilación parcial o total de cisteínas.

La primera prueba se realizó siguiendo el protocolo usado por Loughnan *et al.*, (2006), con el que separó los dímeros de *C. vexillum*. Se esperaba tener en la purificación dos señales mayoritarias (una por cada monómero en caso de que fueran diferentes secuencias) o una sola señal (en caso de ser la misma secuencia); sin embargo, se obtuvieron 4 señales (Figura 29). Es probable que se deba al uso de la maleimida ya que, diversos estudios han demostrado que, al alquilar péptidos con N-etil maleimida, se obtiene un mayor número de derivados; se cree también que reflejan los diastereoisómeros al introducir un nuevo centro quiral en el anillo de la NEM después de la formación de los enlaces C-S durante la alquilación (Young *et al.*, 1999; López-Vera *et al.*, 2007).

Los pesos moleculares que se obtuvieron a partir de estas muestras van de los 5,377 hasta los 8,380 Da, los cuales, en caso de que se hubieran roto los puentes disulfuro, tendrían ya añadido el peso molecular de la N-etilmaleimida (125.15 Da cada una). Sin embargo, la suma de ninguno de estos valores se acercó al de 11 kDa que tiene el dímero o a valores que duplicados se acercaran a este valor; esto porque las conotoxinas de la superfamilia D reportadas hasta el momento, están constituidas por cadenas con el mismo número de aminoácidos y las diferencias que existen entre sus cadenas se deben a la presencia de modificaciones postraduccionales (pseudo-homodímeros), o bien a cambios en algunos aminoácidos (heterodímeros) pero no a diferencias en la longitud de los monómeros.

Se realizó una segunda reducción y alquilación parcial, utilizando esta vez la técnica usada por Aguilar *et al.*, (2006), modificando el gradiente de elusión respecto a la primera reacción. Se obtuvieron dos señales mayoritarias que eluyeron muy cerca del tiempo de retención del péptido nativo y seis más que ya se alejaron un poco de este tiempo; originalmente se consideró que fueran las dos cadenas y sus derivados; sin embargo, los pesos moleculares de las ocho muestras que se analizaron tuvieron pesos muy variables que fueron de los 2,692 hasta los 11,025 Da y en donde las señales mayoritarias tenían pesos de ± 3 kDa.

Aun así, debido a que se encontraron pesos de 5 y 6 kDa, se realizaron diversos ejercicios (que se muestran en el Anexo V) con los cuales se buscó la coincidencia con el peso experimental. Para ello, se usaron los valores cercanos a los 5.5 kDa y se les restó el peso de la NEM considerando diferentes cantidades de puentes disulfuro rotos.

Xu *et al.*, (2015) demostraron con estudios de rayos X, que para la conotoxina GeXXA de *C. generalis*, las dos cadenas que conforman al dímero, se unen a partir de los puentes que se forman entre las cisteínas encontradas en las posiciones 6 y 18, formando dos puentes en posición Cys6-Cys18* y Cys6*-Cys18 (el * indica el aminoácido correspondiente a la segunda cadena); mientras que las otras 8 cisteínas restantes para cada cadena se unen entre ellas formando 4 puentes intra-cadena (cys19-cys28, cys24-cys36, cys29-cys46 y cys34-cys48). Es por ello que los ejercicios comenzaron considerando la ruptura de 2 puentes disulfuro, sin embargo, los pesos más cercanos al dímero fueron 10.2 y 11.7 kDa que tampoco fueron lo esperado. Se siguió probando con la ruptura de más puentes disulfuro y no fue hasta que se hicieron los cálculos con 5 puentes disulfuro rotos que se encontraron valores de 11 kDa.

Lamentablemente, el material restante no fue suficiente para poder secuenciarse, y por se recurrió a una tercera reacción de reducción y alquilación parcial; se usó nuevamente la técnica de Aguilar *et al.*, (2006) y se modificó el gradiente esperando tener una mejor separación entre los derivados obtenidos. Sin embargo, como se observó en la Figura 43 (azul), en el minuto 35 de la corrida cromatográfica hay una señal de mayor absorbancia que no se había visto en la reacción anterior y que, al momento de empalmar la imagen con el péptido nativo Figura 43 (rojo) coinciden perfectamente. Esto mostró que parte del dímero estaba intacto sin haber sido afectado por la reacción y que, probablemente, las señales de la derecha pudieran ser derivados que sí hubieran sido reducidos y alquilados.

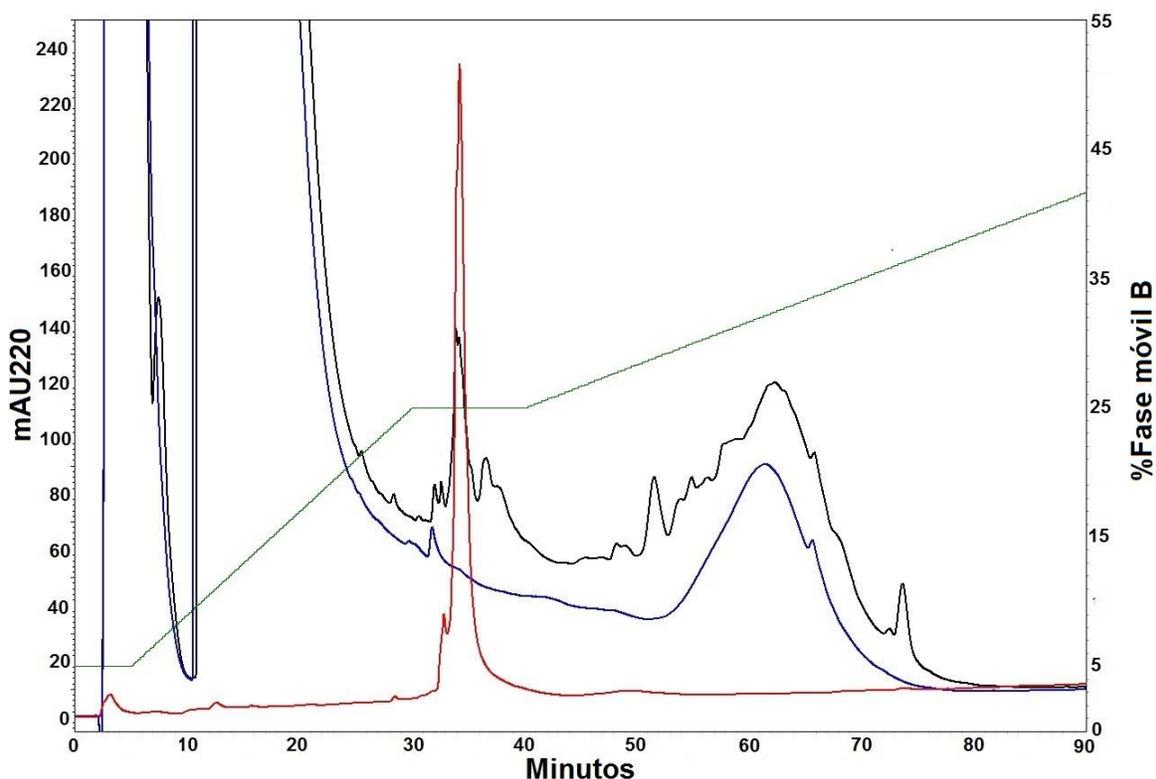


Figura 43. Comparación de los perfiles cromatográficos del péptido reducido y alquilado. (rojo) péptido nativo sin reducir y alquilar, (negro) péptido reducido y alquilado, (azul) blanco de la reacción.

Con los espectros de masas, cuyos valores fueron de los 2.8 a 11.5 kDa se apreció que en efecto existía parte del dímero nativo sin haber sido separado. Se realizaron nuevamente los ejercicios previos (Anexo VI) y, con la ruptura de dos puentes disulfuro, se encontraron dos valores que fueron muy cercanos al peso experimental (unión de P9 con P15 o bien, P15 con P26 (Figura 31). Sin embargo, nuevamente, fue imposible determinar si la ruptura era inter-cadena o intra-cadena, en especial al observar parte del dímero sin separar.

Habiendo realizado las tres reacciones de reducción y alquilación parcial y, con los resultados obtenidos, lo más probable es que los puentes que unían las dos cadenas no se hubieran separado en ninguno de los casos. Dado que las conotoxinas de la superfamilia D tienen un total de 20 cisteínas (10 por cadena) y por consiguiente 10 puentes disulfuro (2

de ellos inter-cadena), es posible que solo se haya logrado separar alguno de estos o bien únicamente puentes intra-cadena. Por ello, se decidió realizar la reducción y alquilación total de cisteínas, para evitar tantos derivados y tener solo los monómeros.

La primera reacción de reducción y alquilación total de cisteínas no presentó los resultados esperados, debido a que los reactivos eluyeron aun en el tiempo de elusión de los productos haciendo que estos fueran enmascarados.

Para la segunda reacción, con el fin de evitar mayor gasto de material y poder eficientizar la técnica, se decidió hacer una revisión de diferentes metodologías usadas para la reducción y alquilación total en conotoxinas. Una vez identificados los reactivos y concentraciones, se realizaron blancos para calcular los gradientes a utilizar.

Se trabajó con las muestras I, J y α D-FrXXA. Al realizar solo la reducción se observó que las tres muestras eluyeron con un porcentaje mayor de fase móvil B (aproximadamente 6 o 7%) en relación con las muestras reducidas y alquiladas. Esto quiere decir que, los posibles monómeros al estar alquilados, son más hidrofílicos al haber una variación en el tiempo de retención de las muestras.

La reducción y alquilación de I y J, se realizó con dos muestras diferentes, una del fraccionamiento del veneno crudo y otra a partir de un subfraccionamiento. En el caso de I presentó en ambos casos una señal mayoritaria con un pequeño hombro a la izquierda, lo que podría ser la secuencias más una modificación postraduccional. Para el caso de J se presentaron cuatro señales mayoritarias que también podría ser la secuencia más modificaciones post-traduccionales, o bien la variación de algunos aminoácidos. Sin embargo, la secuenciación de estas muestras quedó pendiente para estudios futuros.

Es de mencionar que el haber usado las muestras I y J crudas y repurificadas, mostró que es posible usar el veneno crudo sin afectar el resultado de la reducción y alquilación total evitando así, realizar una repurificación y tener la pérdida del material que esta conlleva.

La reducción y alquilación total de α D-FrXXA, tuvo dos señales mayoritarias, que indicaban la posible separación del dímero y la altura en la absorbancia mostró la abundancia de cada una. Sin embargo, al ser secuenciadas, no se pudo comprobar la presencia de cisteínas ni que se tuviera al dímero separado.

Respecto a la problemática en cuanto a la separación de las cadenas del dímero, Loughnan *et al.*, (2006) menciona que cuando trató de realizar la separación, este no se separaba incluso usando diferentes condiciones como lo eran el aumento de temperatura a 65 °C, pH 5, uso de urea, guanidina HCl o TFA, lo que demuestra lo complicado que puede ser romper puentes disulfuro, en especial en las conotoxinas de la superfamilia D ya que cuentan con más puentes que la mayoría de las conotoxinas (2 o 3 puentes). Con esto se muestra que las diferentes técnicas para la reducción y alquilación parcial o total usadas en el proyecto para tratar de separar el veneno de *C. fergusonii* no fueron las óptimas y se deberá hacer un estudio más exhaustivo si se quiere realizar la separación de los dímeros.

Pese a no haber logrado la separación del dímero por la reducción y alquilación, fue posible determinar la posible composición de este con la información ya obtenida. El análisis de transcriptómica indicó la presencia de dos secuencias, cuyas masas teóricas fueron de: 5,297.18 Da para la Secuencia 1 y de 5,435.30 Da para la Secuencia 2, considerando 10 cisteínas oxidadas y los extremos -C y N- libres.

A partir de ellas, se calculó el peso molecular para diferentes combinaciones de las secuencias ya fuera como homodímeros (1-1 o 2-2) o heterodímeros (1-2) además de la considerar la variación de los dos aminoácidos presentados en la secuencia de Edman ([S8P] y [T9R]) y las posibles modificaciones postraduccionales; estas últimas debido a que en las α D-conotoxinas reportadas, las tres de *C. vexillium* presentan oxidación de prolina y gamma carboxilación de glutamato (Loughnan *et al.*, 2006) y la de *C. princeps* también presenta oxidación de prolina (Hernández-Sámano *et al.*, 2019), lo que haría de la oxidación una modificación postraduccional común en las conotoxinas diméricas.

Posteriormente, los valores calculados fueron comparados con las masas experimentales obtenidas. Como resultado, se tuvo que el dímero con masa experimental de 11,025.046 Da podría estar formado por un homodímero de la secuencia 2 con dos aductos de TFA y un aducto de potasio, resultando una masa molecular de 11,023.71 Da; o podría estar formado por un homodímero de la secuencia 2 con la variación ([S8P] y [T9R]), con dos aductos de TFA, un aducto de potasio y un oxígeno, resultando una masa molecular de 11,022.49 Da.

La masa experimental de 11,073.164 Da podría estar formada por un homodímero de la secuencia 2, con un aducto de TFA, un aducto de potasio, un aducto de sodio y dos de oxígeno resultando una masa calculada de 11,077.69 Da. El dímero con una masa

experimental de 10,961.190 Da puede estar formado por un homodímero de la secuencia 2 con la variación de ([S8P] y [T9R]), también tiene dos aductos TFA, resultando en una masa calculada de 10,968.40 Da. Finalmente, el dímero con masa experimental de 11,114.118 Da podría estar formado por el homodímero de la secuencia 2, con dos aductos TFA y un oxígeno resultando en una masa calculada de 11,113.576 Da.

Comparando las masas experimentales y las masas calculadas del dímero dieron una diferencia de +1.336 Da, +2.556 Da, -4.526 Da, -7.210 Da y +0.532 Da, respectivamente. La diferencia de los cinco valores se encuentra dentro del margen de error del 0.1% calculado para un péptido de esta longitud.

La formación de aductos, ya sea con moléculas de disolvente, iones alcalinos u otros metales, o con otros componentes contaminantes, se observa con frecuencia en los espectros de masas de los análisis ESI y MALDI (Keller *et al.*, 2008). La aparición de aductos catiónicos y aniónicos en los espectros MALDI varía según el número y la polaridad de los grupos cargados del analito (Krüger y Karas, 2002).

En particular, la mayoría de los iones observados en espectrometría de masas moderna son iones de aductos o iones pseudomoleculares como $[M + H]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$ o $[M + K]^+$ (Keller *et al.*, 2008); los aductos de Na^+ son uno de los más comunes en las muestras biológicas (Petkovic *et al.*, 2009). Además, los aductos de TFA se reportan como parte de las unidades de repetición comúnmente observadas en las interferencias de fondo (Keller *et al.*, 2008); estos aductos ya han sido reportados por Loughnan *et al.*, (2006) durante el análisis de las α D-conotoxinas de *C. vexillum* y también por Hernández-Sámamo *et al.*, (2019) para la α D-conotoxina de *C. prínceps*.

Para los dos pesos experimentales encontrados (11,025.046 Da y 11,07.164 Da), se explicó que el dímero está formado a partir de la Secuencia 2. Sin embargo, hubo variaciones en la cantidad de aductos; esto significa que α D-FrXXA es un pseudo-homodímero formado por dos cadenas de la Secuencia 2. También, en menor medida se encontró un homodímero formado por dos cadenas de la Secuencia 2 con la variación de aminoácidos que se encontraron por la secuencia de degradación Edman ([S8P] y [T9R]). Esto podría deberse a variaciones intraespecíficas en el veneno, ya que la transcriptómica se obtuvo del conducto del veneno de un solo organismo, pero el veneno utilizado para el análisis bioquímico y los ensayos electrofisiológicos es resultado de una mezcla del veneno de diferentes organismos.

Además, es posible que una misma especie tenga varias secuencias de aminoácidos de la misma superfamilia de conotoxinas. En el caso de la superfamilia D se encontró que *C. capitaneus*, *C. miles*, *C. mustellinus* y *C. vexillum* tienen al menos tres monómeros diferentes reportados en ConoServer. Sin embargo, sólo para *C. vexillum* se describió su conformación y actividad de dímero. Por lo tanto, a pesar de tener dos monómeros en el veneno de *C. fergusonii*, estas cadenas podrían estar acopladas de diferentes maneras y podría haber tres dímeros diferentes, ya que en un inicio se encontró actividad sobre el RnACh en otras señales, además del caso de α D-FrXXA que sería la primera en ser reportada.

Teniendo la caracterización bioquímica de α D-FrXXA, faltaba su caracterización fisiológica. Los estudios iniciales mostraron actividad sobre el RnACh α 7; sin embargo, fue necesario determinar su afinidad hacia otros subtipos. En la Tabla 12 se puede apreciar la IC_{50} que presentó cada subtipo de RnACh; α D-FrXXA presentó mayor afinidad con el RnACh α 7 y además, como se vio en la Figura 42, en este subtipo el bloqueo fue irreversible ya que la amplitud de la corriente no se recuperó al pasar el tiempo y lavados. Los siguientes fueron los subtipos α 3 β 2 y los dos musculares; en estos α D-FrXXA fue ligeramente reversible ya que, aunque la amplitud de la corriente fue incrementándose no logró regresar a sus valores iniciales, lo que indicó que la toxina no se separó del todo del receptor. Finalmente, en el subtipo α 4 β 2 la IC_{50} fue de 697 nM, lo que indicó que α D-FrXXA fue menos afín para este receptor ya que nunca se llegó a tener un bloqueo del 100% aun con concentraciones altas (2.5 μ M), además, que fue reversible casi en su totalidad.

Tabla 12. IC_{50} de α D-FrXXA en diferentes subtipos de RnACh

Blanco	IC_{50}
α 7	125 nM
α 4 β 2	697 nM
α 3 β 2	282 nM
(α 1) ₂ β 1 δ ϵ	351 nM
(α 1) ₂ β 1 γ δ	447 nM

Al observar la relación sigmoide en la IC_{50} en los subtipos $\alpha 7$ y musculares adulto y fetal se puede ver que esta curva es muy pronunciada y, al incrementar la concentración en valores menores de 100 nM la curva va de no tener bloqueo a tener un bloqueo de casi el 100%. Esto pudiera explicarse con el tipo de bloqueo que presentan las conotoxinas de la superfamilia αD , ya que son antagonistas no competitivos y por tal, la toxina no se une al sitio de unión al ligando como ocurre con la mayoría de las α -conotoxinas (familias α , αA , αS y αC) pero se une a otras partes del receptor (Kaufenstein *et al.*, 2009; Kompella *et al.*, 2013).

Yang *et al.*, (2017) mencionan que las αD -conotoxinas presentan un bloqueo diferente a los bloqueadores de poro normales; el de estas últimas es tipo "lid covering" o cubierta de tapa, y se debe a que el dominio N-terminal de la conotoxina se une a la superficie externa del receptor más que al dominio intermembrana. De esta forma, el bloqueo no solo sella la entrada del poro e impide el paso de cationes, sino que también evita el cambio conformacional que ocurre cuando el agonista se une al receptor. Esta actividad explicaría por qué la pendiente de la sigmoide es tan pronunciada. En el caso de GeXXA, se ha observado que la unión tiene preferencia hacia las subunidades β en lugar de las α .

Respecto a las αD -conotoxinas, se tiene el conocimiento sobre el blanco molecular de: GeXXA de *C. generalis*, VxXXA y VxXXB de *C. vexillum*, PiXXA de *C. princeps*, Cp de *C. capitaneus* y Ms de *C. mustelinus* (Loughnan *et al.*, 2006; Kaufenstein *et al.*, 2009; Kompella *et al.*, 2013; Hernández-Sámano *et al.*, 2019). Todas ellas presentan actividad sobre distintos subtipos de RnACh. En la Tabla 13 se resumen estos valores y además se indica el organismo del que proviene el receptor utilizado, ya que en este proyecto se usaron receptores humanos para los subtipos neuronales y de ratón para los musculares. Es de mencionar que Loughnan *et al.*, (2006) hablan sobre la actividad para *C. miles* aunque no se dice su afinidad sobre algún subtipo. Para el caso de *C. capitaneus*, los estudios de Kaufenstein *et al.*, (2009) muestran la IC_{50} que presenta ante diferentes subtipos; sin embargo, la secuencia de la conotoxina Cp no corresponde a las reportadas en Conoserver (Cp20.1-5); existe una, Cp20.1 que es la secuencia más similar. Por lo anterior, estas dos especies no están incluidas en la Tabla 13.

Tabla 13. IC₅₀ de α D-conotoxinas con actividad sobre RnACh.

	Blanco	Organismo	IC ₅₀
GeXXA	$\alpha 7$	<i>H. sapiens</i>	210 nM
VxXXB	$\alpha 7$	<i>R. norvegicus</i>	400 pM
PiXXA	$\alpha 7$	<i>H. sapiens</i>	6.2 μ M
GeXXA	$\alpha 4\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	>3 μ M
VxXXB	$\alpha 4\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	228 nM
GeXXA	$\alpha 3\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	498 nM
VxXXA	$\alpha 3\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	370 nM
VxXXB	$\alpha 3\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	8.4 nM
GeXXA	$\alpha 9\alpha 10$	<i>H. sapiens</i>	28 nM
GeXXA	$\alpha 9\alpha 10$	<i>R. norvegicus</i>	1.2 nM
GeXXA	$\alpha 3\beta 4$	<i>R. norvegicus</i>	614 nM
GeXXA	$\alpha 4\beta 4$	<i>R. norvegicus</i>	>3 μ M
GeXXA	$(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$	<i>R. norvegicus</i>	743 nM
VxXXB	$(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$	<i>R. norvegicus</i>	3.5 μ M

En el caso de las α D-conotoxinas evaluadas en receptores humanos, GeXXA tiene afinidad por el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ con una IC₅₀ de 28 nM mientras que para el subtipo $\alpha 7$ es de 210 nM (Yang *et al.*, 2017); un valor similar al obtenido para α D-FrXXA (125 nM). En el caso de PiXXA, tiene actividad sobre el RnACh $\alpha 7$ pero con una concentración micromolar que es mayor que la presentada para α D-FrXXA (Hernández-Sámano *et al.*, 2019); es de resaltar que esta especie también habita el Pacífico mexicano siendo las únicas dos α D-conotoxinas reportadas que provienen de caracoles que no pertenecen al Indo-Pacífico.

Cabe mencionar que la IC₅₀ para α D-FrXXA sugiere que puede tener una mayor afinidad sobre RnACh de rata con valores picomolares; este fue el caso de VxXXB sobre el subtipo $\alpha 7$ y la evidencia de GeXXA, donde el residuo de histidina 7 en la superficie del receptor del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ da mayor afinidad sobre este nAChR sobre el subtipo humano, apoyan esta idea (Xu *et al.*, 2015).

9. CONCLUSIÓN

La conotoxina α D-FrXXA obtenida a partir del veneno de la especie *Conus fergusonii* es un pseudo-homodímero perteneciente a la superfamilia D de conotoxinas. Presenta 47 aminoácidos por cadena y pesos moleculares experimentales de 11,025.046 y 11,023.71 Da. Su blanco molecular son los receptores nicotínicos de acetilcolina y su afinidad (IC_{50}) se encontró a diferentes concentraciones nanomolares de la siguiente manera: $\alpha 7$ (125 nM) > $\alpha 3\beta 2$ (282 nM) > $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ (351 nM) > $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ (447 nM) > $\alpha 4\beta 2$ (697 nM).

10. PERSPECTIVAS

Evaluar α D-FrXXA en otros subtipos de RnACh para ampliar el conocimiento sobre la afinidad sobre estos tipos de receptores.

Realizar la caracterización de los péptidos I y J para identificar si son variantes del dímero α D-FrXXA o bien corresponden a dímeros que contienen las otras secuencias de la superfamilia D reportadas.

Realizar estudios de cristalografía sobre α D-FrXXA, para poder determinar la conectividad de la conotoxina α D-FrXXA.

11. BIBLIOGRAFÍA

-  Abraham, N. y Lewis, R. J. (2018). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulators from Cone snails. *Marine Drugs*. 16(6): 208. DOI: 10.3390/md16060208.
-  Aguilar, M., Lezama-Monfil, L., Maillo, M., Pedraza-Lara, H., López-Vera, E., y Heimer de la Coter, E. (2006). A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides*. 27(3): 500-505. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.07.020
-  Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J. y Alewood, P. F. (2014). Discovery, synthesis, and structure–activity relationships of conotoxins. *Chemical Reviews*. 11;114(11): 5815-5847. DOI: 10.1021/cr400401e
-  Arias, H. R. y Blanton, M. P. (2000). Alpha-conotoxins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 32(10): 1017-1028. DOI: 10.1016/s1357-2725(00)00051-0.
-  Báez-Cruz, C. K. (2022). Optimización del método para la purificación de componentes hidrofílicos en el veneno de *Conus fergusonii* (Mollusca; Gastropoda). [Reporte de Investigación para Título de Pregrado, Universidad Nacional Autónoma de México] UNAM.
-  Buczek, O., Bulaj, G. y Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(24): 3067-3079. DOI: 10.1007/s00018-005-5283-0.
-  Cartier, G. E., Yoshikami, D., Gray, W. R., Luo, S., Olivera, B. M., McIntosh, J. M. (1996). A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry* 271(13): 7522-7528. DOI: 10.1074/jbc.271.13.7522.
-  Casewell, N., Wüster, W., Vonk, F., Harrison, R. y Fry, B. (2013). Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(4): 219-229. DOI: 10.1016/j.tree.2012.10.020.
-  Changeux, J. P. y Pass, Y. (2009). Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Encyclopedia of Neuroscience, Academic Press*. 1129-1133. DOI: 10.1016/B978-008045046-9.01127-X.
-  Christensen, S. B., Bandyopadhyay, P. K., Olivera, B. M. y McIntosh, J. M. (2015). α S-conotoxin GVIIIB potently and selectively blocks α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*. 96: 349-356. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.06.007
-  Cifuentes, J. L., Torres-García, P., y Frías, M. (1987). El océano y sus recursos. IV Las ciencias del mar: Oceanografía Biológica. Fondo de Cultura Económica
-  Cottrell, G. A. y Twarog, B. M. (1972). Active factors in the venom duct of *Conus californicus*. *British Journal of Pharmacology*. 44(2): 365-366.
-  Dang, N., Meng, X. y Song, H. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors and cancer. *Biomedical Reports*. 4(5): 515-518. DOI: 10.3892/br.2016.625.

-  Dani, J. A. y Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47: 699–729. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214
-  Dias, D. A., Urban, S. y Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2: 303–336. DOI: 10.3390/metabo2020303.
-  Dineley, K. T., Pandya, A. A. y Yakel, J. L. (2015). Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*. 36(2): 96–108. DOI: 10.1016/j.tips.2014.12.002
-  Dutertre, S., Jin, A. H., Kaas, Q., Jones, A., Alewood, P. F. y Lewis, R. J. (2013). Deep venomics reveals the mechanism for expanded peptide diversity in cone snail venom. *Molecular & Cellular Proteomics*. 12: 312–329. DOI: 10.1074/mcp.M112.021469
-  Dutertre, S., Jin, A. H., Vetter, I., Hamilton, B., Sunagar, K., Lavergne, V., Dutertre, V., Fry, B. G., Antunes, A., Venter, D. J., Alewood, P. F. y Lewis, R. J. (2014). Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature Communications*. 24(5): 3521. DOI: 10.1038/ncomms4521.
-  Endean, R., Parrish, G. y Gyr, P. (1974). Pharmacology of the venom of *Conus geographus*. *Toxicon*. 12: 131–38. DOI: 10.1016/0041-0101(74)90236-0
-  Fallon, P. J. (2016). Taxonomic review of tropical western Atlantic shallow water Drilliidae (Mollusca: Gastropoda: Conoidea) including descriptions of 100 new species. *Zootaxa*. 4090: 1–363. DOI: 10.11646/zootaxa.4090.1.1
-  Favreau, P., Benoit, E., Hocking, H. G., Carlier, L., D'hoedt, D., Leipold, E., Markgraf, R., Schlumberger, S., Córdova, M. A., Gaertner, H., Paolini-Bertrand, M., Hartley, O., Tytgat, J., Heinemann, S.H., Bertrand, D., Boelens, R., Stöcklin, R. y Molgó, J. (2012). A novel μ -conopeptide, CnIIIc, exerts potent and preferential inhibition of NaV1.2/1.4 channels and blocks neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology*. 166(5): 1654-1668. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01837.x.
-  Gao, B., Peng, C., Yang, J., Yi, Y., Zhang, J. y Shi, Q. (2017). Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery. *Toxins*. 9(12): 397. DOI: 10.3390/toxins9120397.
-  Gehrman, J., Alewood, P. F. y Craik, D. J. (1998). Structure determination of the three disulfide bond isomers of alpha- conotoxin GI. a model for the role of disulfide bonds in structural stability. *Journal of Molecular Biology*. 278(2): 401–415. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1701
-  Gotti, C., Zoli, M. y Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27(9): 482-491. DOI: 10.1016/j.tips.2006.07.004.
-  Gray, W. R., Luque, A., Olivera, B. M., Barret, J. y Cruz, L. J. (1981). Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *The Journal of Biological Chemistry*. 256: 4734–4740. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)69313-0
-  Hernández-Sámano, A. C., Falcón, A., Zamudio, F., Batista, C. V. F., Michel-Morfín, J. E., Landa-Jaime, V., López-Vera, E., Jeziorski, M. C. y Aguilar M. B.

- (2019). α D-Conotoxins in species of the Eastern Pacific: The case of *Conus princeps* from Mexico. *Toxins*. 11(7): 405. DOI: 10.3390/toxins11070405.
-  Himaya, S. W., Jin, A. H., Dutertre, S., Giacomotto, J., Mohialdeen, H., Vetter, I., Alewood, P. F. y Lewis, R. J. (2015). Comparative venomomics reveals the complex prey capture strategy of the piscivorous cone snail *Conus catus*. *Journal of Proteome Research*. 14: 4372–4381. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00630
-  Horiuchi, Y., Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., Seki, M., Endo, T., Kato, T., Kawashima, K. Evolutional study on acetylcholine expression. (2003). *Life Sciences*. 72(15): 1745-1756. DOI: 10.1016/s0024-3205(02)02478-5.
-  Hurst, R., Rollema, H. y Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*. 137: 22–54. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.012
-  Imperial, J. S., Bansal, P. S., Alewood, P. F., Daly, N. L., Craik, D. J., Sporning, A., Terlau, H., López-Vera, E., Bandyopadhyay, P. K. y Olivera, B. M. (2006). A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry*. 45: 8331–8340. DOI: 10.1021/bi060263r
-  Jimenez, E. C. y Cruz, L. J. (2017). Conotoxins as tools in research on nicotinic receptors. In: Gopalakrishnakone, P., Cruz, L. y Luo, S. (Eds.) *Toxins and Drug Discovery. Toxinology. Springer*. DOI: 10.1007/978-94-007-6452-1_1
-  Jimenez, E. C., Olivera, B. M. y Teichert, R.W. (2007). α C-Conotoxin PrXA: a new family of nicotinic acetylcholine receptor antagonists. *Biochemistry*. 46: 8717–8724. DOI: 10.1021/bi700582m
-  Jin, A. H., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Himaya, S. W. A., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J. y Alewood, P. F. (2019). Conotoxins: Chemistry and biology. *Chemical Reviews*. 119(21): 11510-11549. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00207.
-  Jin, A., Vetter, I. Dutertre, S., Abraham, N. Emidio, N. B., Inserra, M., Murali, S. S., Christie, M. J., Alewood, P. F. y Lewis, R. J. (2014). MrIC, a novel α -conotoxin agonist in the presence of PNU at endogenous α 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*, 53: 1-3. DOI: 10.1021/bi400882s.
-  Kaas, Q., Westermann, J. C. y Craik, D. J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon*. 55: 1491–1509. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.03.002
-  Kaas, Q., Westermann, J. C., Halai, R., Wang, C. K. L. y Craik, D. J. (2008). ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics* 24(3): 445–446. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm596
-  Kaas, Q., Yu, R., Jin, A. H., Dutertre, S. y Craik, D. J. (2012). ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research* 40: D325–330. DOI: 10.1093/nar/gkr886
-  Kaufenstein, S., Kendel, Y., Nicke, A., Coronas, F. I. V., Possani, L., Favreau, P., Križaj, I., Wunder, C., Kauert, G. y Mebs, D. (2009). New conopeptides of the D-superfamily selectively inhibiting neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*. 54(3): 295-301. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.04.016.

-  Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B., Whittall, R. M. (2008). Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 627(1): 71-81. DOI: 10.1016/j.aca.2008.04.043.
-  Kohn, A. J. (1959). The ecology of *Conus* in Hawaii. *Ecological Monographs*. 29: 47–90. DOI: 10.2307/1948541
-  Kohn, A. J. (1966). Food Specialization in *Conus* in Hawaii and California. *Ecology*. 47(6): 1041–1043. DOI: 10.2307/1935652
-  Kohn, A. J. (1985). Evolutionary ecology of *Conus* on Indo-Pacific coral reefs. *Proceedings of the Fifth International Coral Reef Congress*. 4: 139–44.
-  Kohn, A. J. (1998). Superfamily Conoidea. In *Mollusca: The Southern Synthesis. Fauna of Australia*; Beesley, P. L., Ross, G. J. B. y Wells, A., Eds.; *CSIRO Publishing*. 5: 846–854.
-  Kohn, A. J. y Nybakken, J. W. (1975). Ecology of *Conus* on eastern Indian Ocean fringing reefs: Diversity of species and resource utilization. *Marine Biology*. 29: 211–234.
-  Kohn, A. J., Omori, M., Yamakawa, H. y Koike, Y. (2001). Maximal species richness in *Conus*: diversity, diet and habitat on reefs of northeast Papua New Guinea. *Coral Reefs*. 20: 25– 38. DOI: 10.1007/s003380100141
-  Kompella, S., Xu, S., Zhang, T., Yan, M., Shao, X., Chi, C., Ding, J., Wang, C., Adams, D. (2013). Novel strategy of blocking nAChR revealed by dissecting a dimeric conotoxin α D-GeXXA. *Biochemical Pharmacology*. 86(8): 1229. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.08.041.
-  Krüger, R., Karas, M. (2002). Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 13(10): 1218-1226. DOI: 10.1016/S1044-0305(02)00450-6.
-  Lewis, R. J. (2009). Conotoxins: molecular and therapeutic targets. *Progress in molecular and subcellular biology*. 46: 45-65. DOI: 10.1007/978-3-540-87895-7_2. PMID: 19184584
-  Lewis, R. J. y García, M. L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*., 2: 790–802. DOI: 10.1038/nrd1197
-  Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I. y Christie, M. J. (2012). *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 64: 259–298. DOI: 10.1124/pr.111.005322
-  Lievano-Beltrán, L. A. (2017). Caracterización bioquímica de péptidos presentes en el veneno de un caracol marino (*Conus fergusonii*). [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Autónoma de México] UNAM, archivo digital. <http://132.248.9.195/ptd2017/mayo/0758928/Index.html>
-  López-Vera, E. (2010). Los receptores nicotínicos de acetilcolina y las α -conotoxinas. *REB* 29(1): 8-12.
-  López-Vera, E., Aguilar, M. B., Schiavon, E., Marínzi, C., Ortiz, E., Restano Cassulini R., Batista, C., Possani, L., Heimer de la Cotera, E., Peri, F., Becerril, B. y Wanke, E. (2007). Novel alpha-conotoxins from *Conus spurius* and the alpha-conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic

acetylcholine receptors. *FEBS J.*, 274:3972-3985. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05931.x

-  López-Vera, E., Aguilar-Ramírez, M. B. y Heimer de la Cotera, E. (2006). Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. *Ciencia* 3: 47-51.
-  Loughnan, M., Nicke, A., Jones, A., Schroeder, C., Nevin, S., Adams, D. J., Alewood, P. F., y Lewis, R. J. (2006). Identification of a novel class of nicotinic receptor antagonists: dimeric conotoxins VxXIIA, VxXIIB, and VxXIIC from *Conus vexillum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(34): 24745-24755. DOI: 10.1974/jbc.M603703200.
-  Loughnan, M. L., Nicke, A., Lawrence, N., Lewis, R.J. (2009). Novel alpha D-conopeptides and their precursors identified by cDNA cloning define the D-conotoxin superfamily. *Biochemistry*. 48(17): 3717-3729. DOI: 10.1021/bi9000326.
-  Lukas, R. J., Changeux. J. P., Le Novere, N., Albuquerque, E. X., Balfour, D. J., Berg, D. K., Bertrand, D., Chiappinelli, V., Clarke, P. B., Collins, A., Dani, J. A., Grady, S., Kellar, K., Lindstrom, J. M., Marks, Mi., Quik, M., Taylor, P. W. y Wonnacott, S. (1999). Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological Reviews* 51: 397–401.
-  Luo, S., Christensen, S., Zhangsun, D., Wu, Y., Hu, Y., Zhu, X., Chhabra, S., Norton, R. S. y McIntosh, J. M. (2013) A novel inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors from *Conus vexillum* delineates a new conotoxin superfamily. *PLoS ONE*. 8(1): e54648. DOI: 10.1371/journal.pone.0054648
-  Luo, S., Kulak, J. M., Cartier, G. E., Jacobsen, R. B., Yoshikami, D., Olivera, B. M., y McIntosh, J. M. (1998). Alpha-conotoxin AulB selectively blocks alpha3 beta4 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *Journal of Neuroscience*. 18(21): 8571–8579. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-21-08571.1998
-  Luo, S., Zhangsun, D., Harvey, P. J., Kaas, Q., Wu, Y., Zhu, X., Hu, Y., Li, X., Tsetlin, V. I., Christensen, S., Romero, H. K., McIntyre, M., Dowell, C., Baxter, J. C., Elmslie, K. S., Craik, D. J. y McIntosh, J. M. (2015). Cloning, synthesis, and characterization of αO -conotoxin GeXIVA, a potent $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112: E4026–35. DOI: 10.1073/pnas.1503617112
-  Mansbach, R. A., Travers, T., McMahon, B. H., Fair, J. M. y Gnanakaran, S. (2019). Snails *In Silico*: A review of computational studies on the conopeptides. *Marine Drugs*. 17(3): 145. DOI: 10.3390/md17030145.
-  Mari, F. y Tytgat, J. (2010). Natural Peptide Toxins. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. 2: 511-538. DOI: 10.1016/B978-008045382-8.00638-9.
-  Marshall, J., Kelley, W. P., Rubakhin, S. S., Bingham, J. P., Sweedler, J. V. y Gilly, W. F. (2002). Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. *Biology Bulletin*. 203: 27–41. DOI: 10.2307/1543455
-  Martínez-Hernández, L. A. (2016). *Drosophila melanogaster* como modelo in vivo para evaluar conotoxinas con actividad antagónica sobre canales de potasio.

[Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México] UNAM, archivo digital. <http://132.248.9.195/ptd2016/abril/0744016/Index.html>

-  McLean, J., y J. Nybakken. (1979). On the growth stages of *C. fergusoni* Sowerby, 1873, the reinstatement of *C. xanthicus* Dall, 1910, and a new species of *Conus* from the Galapagos Islands. *The Veliger*. 22: 135-144.
-  Montiel-Reyes, L. E. (2021). Estudio toxinológico de *C. fergusoni*: un aspecto ecológico y bioinformático para el estudio de canales iónicos. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México] UNAM, archivo digital. <http://132.248.9.195/ptd2021/noviembre/0819987/Index.html>
-  Nicke, A., Wonnacott, S., Lewis, R. J. (2004). α -Conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *European Journal of Biochemistry*. 271: 2305–2319. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04145.x
-  Olivera, B. M. (2002). *Conus* venom peptides: Reflections from the biology of clades and species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 33: 25–47. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150424
-  Olivera, B. M. y Cruz, L. J. (2001). Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*. 39: 7–14. DOI: 10.1016/s0041-0101(00)00157-4
-  Olivera, B. M., Seger, J., Horvath, M. P. y Fedosov, A. E. (2015). Prey-capture strategies of fish-hunting cone snails: Behavior, neurobiology and evolution. *Brain, Behavior and Evolution*. 86: 58–74. DOI: 10.1159/000438449
-  Olivera, B., Gray, W. R., Zeikus, R. D., McIntosh, M., Varga, J., Rivier, J., de Santos, V y Cruz, L. (1986). Peptide neurotoxins from fish hunting snails. *Science* (New York, N.Y.), 230: 1338-43. DOI:10.1126/science.4071055
-  Ortiz-Arellano, M. A. (2014). Diversidad, ecología y anatomía de los gasterópodos marinos de interés neurotóxico de la Costa de Sinaloa, México. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Nayarit].
-  Paredes, C., F. Cardoso, K. Altamirano, P. Baltazar y Romero, L. (2010). La familia Conidae en el mar peruano. The family Conidae from Peruvian Sea. *Revista Peruana de Biología*, 17(1): 65-73.
-  Peters, H., O'Leary, B. C., Hawkins, J. P., Carpenter, K. E. y Roberts, C. M. (2013). *Conus*: First comprehensive conservation red list assessment of a marine gastropod mollusc genus. *PLOS ONE*. 8(12): e83353. DOI: 10.1371/journal.pone.0083353
-  Petković, M., Schiller, J., Müller, M., Süß, R., Arnold, K., Arnhold, J. (2009). Detection of adducts with matrix clusters in the positive and negative ion mode MALDI-TOF mass spectra of phospholipids. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 64(3): 331-334. DOI: 10.1515/znb-2009-0314.
-  Prashanth, J. R., Dutertre, S., Jin, A. H., Lavergne, V., Hamilton, B., Cardoso, F. C., Griffin, J., Venter, D. J., Alewood, P. F. y Lewis, R. J. (2016). The role of defensive ecological interactions in the evolution of conotoxins. *Mol Ecol*, 25: 598-615. DOI:10.1111/mec.13504.
-  Prashanth, J. R., Dutertre, S., Jin, A. H., Lavergne, V., Hamilton, B., Cardoso, F. C., Griffin, J., Venter, D. J., Alewood, P. F., y Lewis, R. J. (2016). The role of

defensive ecological interactions in the evolution of conotoxins. *Molecular Ecology*. 25: 598–615. DOI: 10.1111/mec.13504

-  Robinson, S. D. y Norton, R. S. (2014). Conotoxin gene superfamilies. *Marine Drugs*. 12: 6058–6101. DOI: 10.3390/md12126058
-  Rodríguez-Ruiz, X. C. (2017). Caracterización bioquímica y funcional de conotoxinas con efecto sobre receptores nicotínicos de acetilcolina. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México] UNAM, archivo digital. <http://132.248.9.195/ptd2017/febrero/0755814/Index.html>
-  Rollema, H., Bertrand, D. y Hurst, R. S. (2015). Nicotinic Agonists and Antagonists. In: Stolerman I. P. y Price L.H. (Eds.) *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-36172-2_304
-  Schroeder, C. I. y Craik, D. J. (2012). Therapeutic potential of conopeptides. *Future Medicinal Chemistry*. 4(10): 1243-55. DOI: 10.4155/fmc.12.70
-  Teichert, R. W., Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Bulaj, G. y Horvath, M. P. (2015). The molecular diversity of conoidean venom peptides and their targets: From basic research to therapeutic applications. *Venom to Drugs*. Pp. 163–203. DOI: 10.1039/9781849737876-00163
-  Tenorio, M. J., Tucker, J. K., y Chaney, H. W. (2012). The Families Conolithidae and conidae - The cones of the Eastern Pacific. ConchBooks, Hackenheim.
-  Terlau, H. y Olivera, B. M. (2004). *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*. 84: 41–68. DOI: 10.1152/physrev.00020.2003
-  Terlau, H., Shon, K. J., Grilley, M., Stocker, M., Stühmer, W. y Olivera, B. M. (1996). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting cone snail. *Nature*. 381: 148–151. DOI: 10.1038/381148a0
-  Tuček, S. (1982), The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *The Journal of Physiology*. 322: 53-69. DOI: 10.1113/jphysiol.1982.sp014022
- Tuček, S. (1988) Choline acetyltransferase and the synthesis of acetylcholine. In: Whittaker V.P. (Eds.) *The Cholinergic Synapse*. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-73220-1_7
-  Wang, S., Du, T., Liu, Z., Wang, S., Wu, Y., Ding, J., Jiang, L. y Dai, Q. (2014), Characterization of a T-superfamily conotoxin TxVC from *Conus textile* that selectively targets neuronal nAChR subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 454: 151-156. DOI: /10.1016/j.bbrc.2014.10.055
-  Wu, J. y Lukas, J. R. (2011). Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochemical Pharmacology*. 82(8): 800–807 DOI: 10.1016/j.bcp.2011.07.067
-  Xu, S., Zhang, T., Kompella, S. N., Yan, M., Lu, A., Wang, Y., Shao, X., Chi, C., Adams, D. J., Ding, J., Wang, C. (2015). Conotoxin α D-GeXXA utilizes a novel strategy to antagonize nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific reports*. 5: 14261. DOI: 10.1038/srep14261.
-  Yang, L., Tae, H. S., Fan, Z., Shao, X., Xu, S., Zhao, S., Adams, D. J. y Wang, C. (2017). A novel lid-covering peptide inhibitor of nicotinic acetylcholine receptors

derived from α D-Conotoxin GeXXA. *Marine drugs*. 15(6): 164. DOI: 10.3390/md15060164.



Young, Y., Zeni, L., Rosenfeld, R., Stark, K., Rohde, M. y Haniu, M. (1999). Disulfide assignment of the C-terminal cysteine knot of agouti-related protein (AGRP) by direct sequencing analysis. *The Journal of Peptide Research*. 54: 514–521. DOI: 10.1034/j.1399-3011.1999.00126.x

URL

-  Biography.com (2019). <https://www.biography.com/people/jacques-cousteau-9259496>.
-  Blastp <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>
-  ConoServer <https://www.conoserver.org/>
-  IonSource <https://www.ionsource.com/programs/PEPCALC.HTM>
-  News Medical net <https://www.news-medical.net/whitepaper/20200413/An-Introduction-to-Nicotinic-ACh-Receptors.aspx>
-  Science Friday Educate <https://www.sciencefriday.com/educational-resources/how-do-killer-snails-kill-their-victims/>
-  UICN (2013) <http://www.iucnredlist.org>.

12. ANEXOS

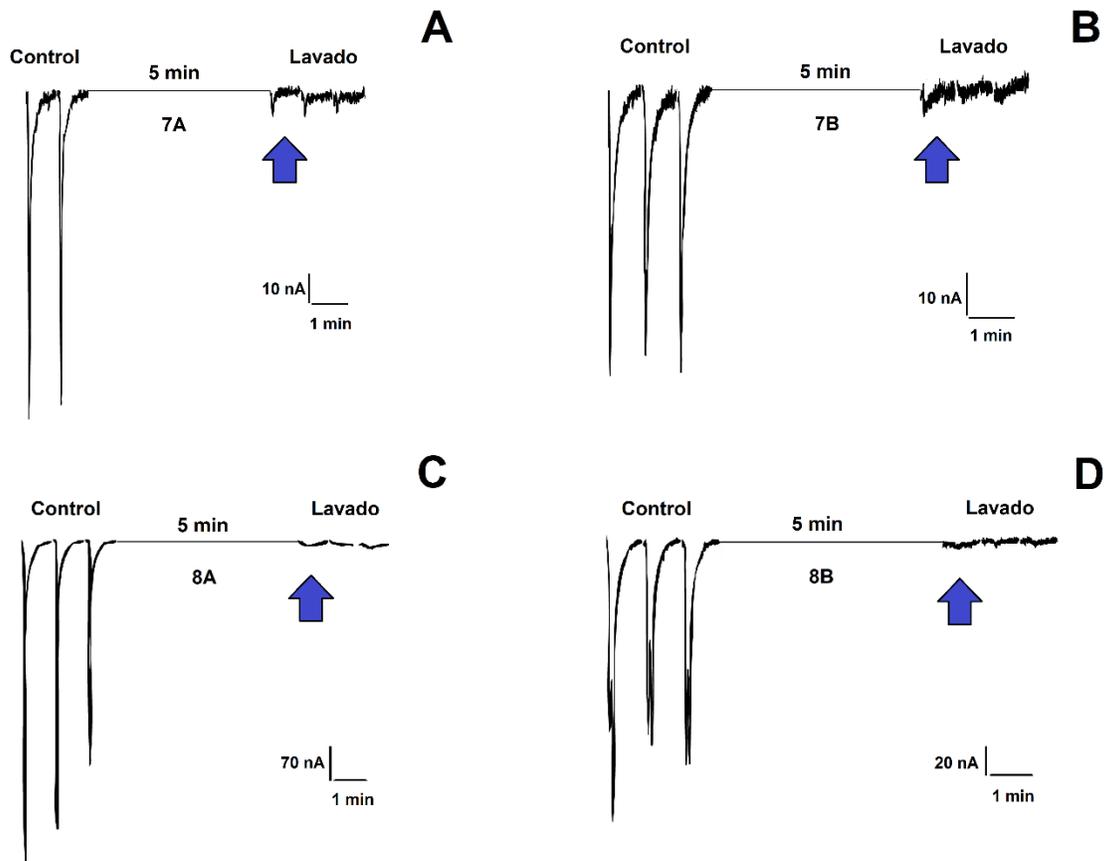
12.1. Anexo I

Artículos utilizados para hacer la síntesis de las técnicas de reducción y alquilación total de cisteínas.

Artículos	
	Aguilar, M. B., Zugasti-Cruz, A., Falcón, A., Batista, C. V., Olivera, B. M., and Heimer de la Cotera, E. (2013). A novel arrangement of Cys residues in a paralytic peptide of <i>Conus cancellatus</i> (jr. syn.: <i>Conus austini</i>), a worm-hunting snail from the Gulf of Mexico. <i>Peptides</i> . 41. 38–44. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.02.016
	Aguilar, M. B., Flores-Torres, A., Batista, C., Falcón, A., López-Vera, E. and Heimer de la Cotera, E. (2009). Structural characterization of five post-translationally modified isophorms of a novel putative δ -conotoxin from the vermivorous snail <i>Conus delessertii</i> from the Mexican Caribbean Sea. <i>Peptides</i> . 30: 458-466. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.12.005.
	Aguilar, M. B., Lezama-Monfil, L., Maillo, M., Pedraza-Lara, H., López-Vera, E., and Heimer de la Cotera, E. (2006). A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of <i>Conus spurius</i> . <i>Peptides</i> . 27. 500-505. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.07.020.
	Aguilar, M. B., López-Vera, E., Heimer de la Cotera, E., Falcón, A., Olivera, B. M., and Maillo, M. (2007). I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: Peptide sr11a from <i>Conus spurius</i> . <i>Peptides</i> . 28. 18-23. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.08.024.
	Aguilar, M. B., López-Vera, E., Imperial, J. S., Falcón, A., Olivera, B. M., and Heimer de la Cotera, E. (2005). Putative I-conotoxins in vermivorous cone snails: the case of <i>Conus delessertii</i> . <i>Peptides</i> . 6(1): 23-27. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.10.012
	Aguilar, M. B., López-Vera, E., Ortiz, E., Becerril, B., Possani, L., Olivera, B. M., and Heimer de la Cotera, E. (2005). A novel conotoxin from <i>Conus delessertii</i> with posttranslationally modified lysine residues. <i>Biochemistry</i> . 44: 11130-11136. DOI: 10.1021/bi050518l.
	Lezama-Monfil, L. (2004). Caracterización estructural y biológica de conotoxinas T de la especie <i>Conus spurius</i> (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
	Luna-Ramírez, K., Aguilar, M. B., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E., Olivera, B. M. and Maillo, M. (2007). An O-conotoxin from the vermivorous <i>Conus spurius</i> active on mice and mollusks. <i>Peptides</i> . 28. 24-30. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.08.025.
	Zugasti-Cruz, A., Aguilar, M. B., Falcón, A., Olivera, B. M., and Heimer de la Cotera, E. (2008). Two new 4-Cys conotoxins (framework 14) of the vermivorous snail <i>Conus austini</i> from the Gulf of Mexico with activity in the central nervous system of mice. <i>Peptides</i> . 29(2): 179–185. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.09.021
	Zugasti-Cruz, A., Maillo, M., López-Vera, E., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E., Olivera, B. M., and Aguilar, M. B. (2006). Amino acid sequence and biological activity of a γ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail <i>Conus austini</i> . <i>Peptides</i> . 27.: 506-511. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.07.021.

12.2. Anexo II

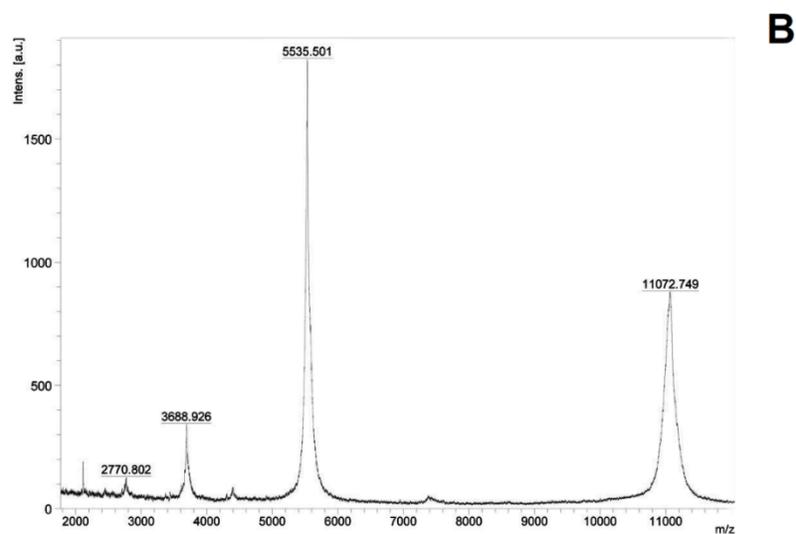
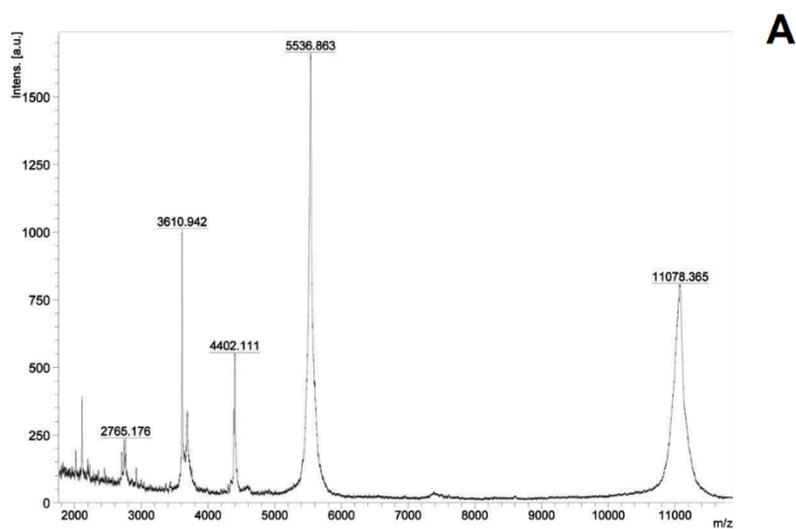
Registro de corrientes sobre el subtipo $\alpha 7$ antes y después de su incubación con $1 \mu\text{g}$ de los péptidos (A) 7A, (B) 7B, (C) 8A y (D) 8B. A la izquierda, pulsos control y a la derecha pulsos después de incubarse 5 minutos con la toxina.



12.3. Anexo III

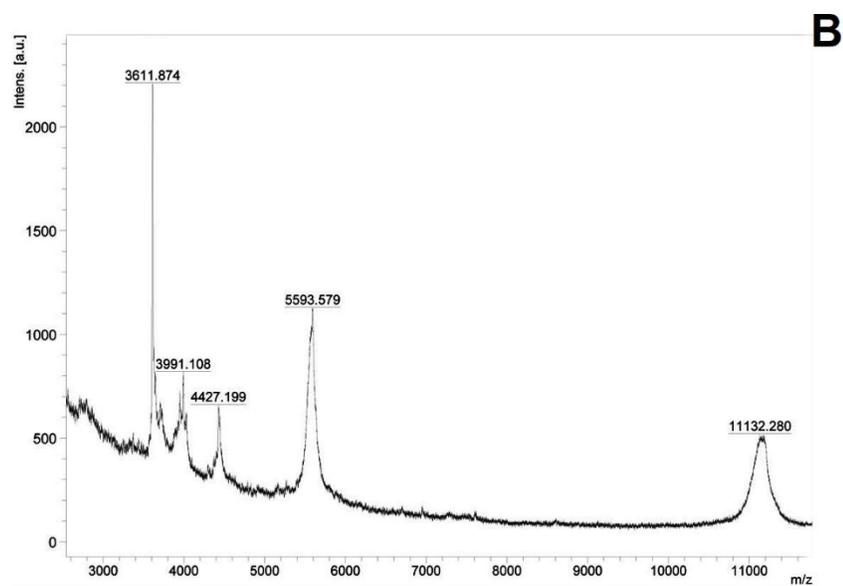
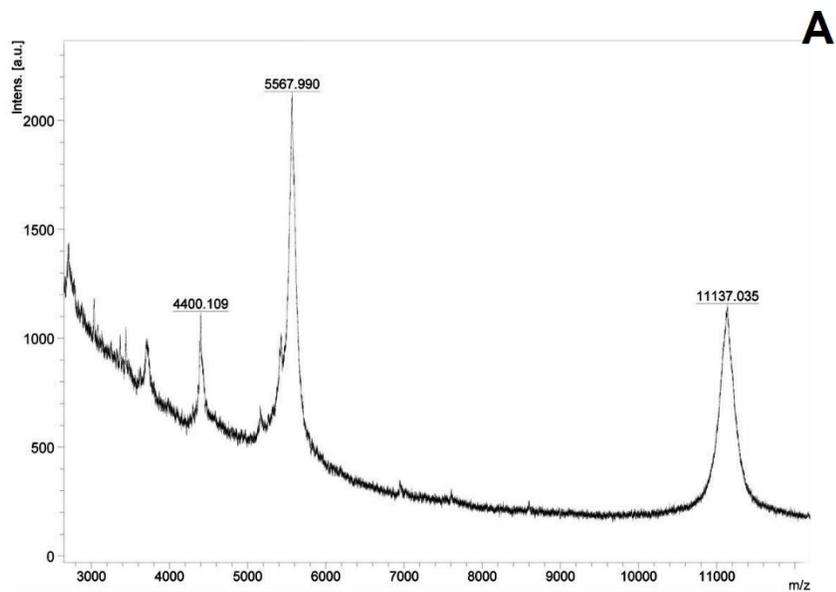
Espectros de masas (MALDI-TOF) de las muestras de los péptidos repurificados.

(A) Péptido 7A; (B) Péptido 7B, en una ventana masa/carga que va de los 2,000 a los 12,000.



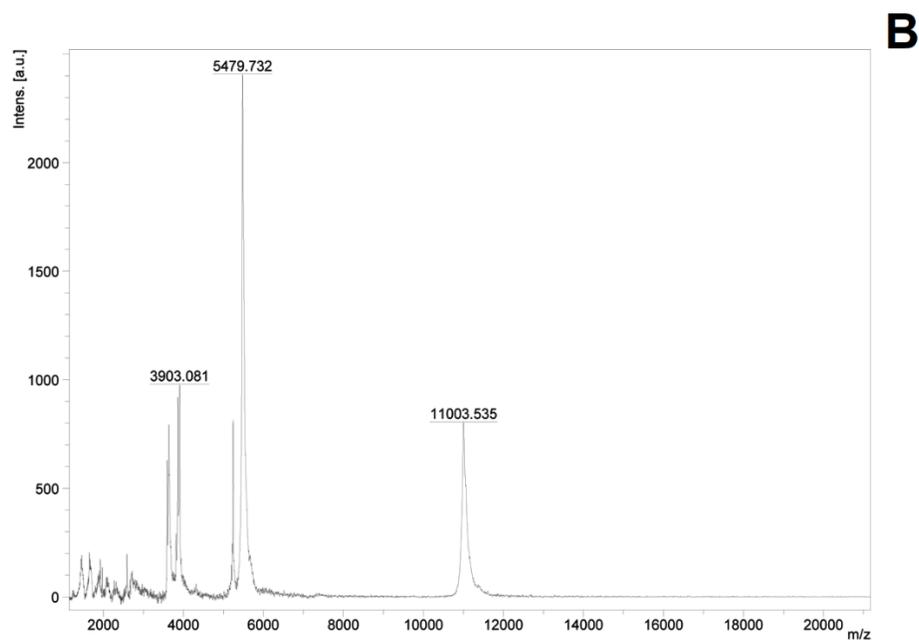
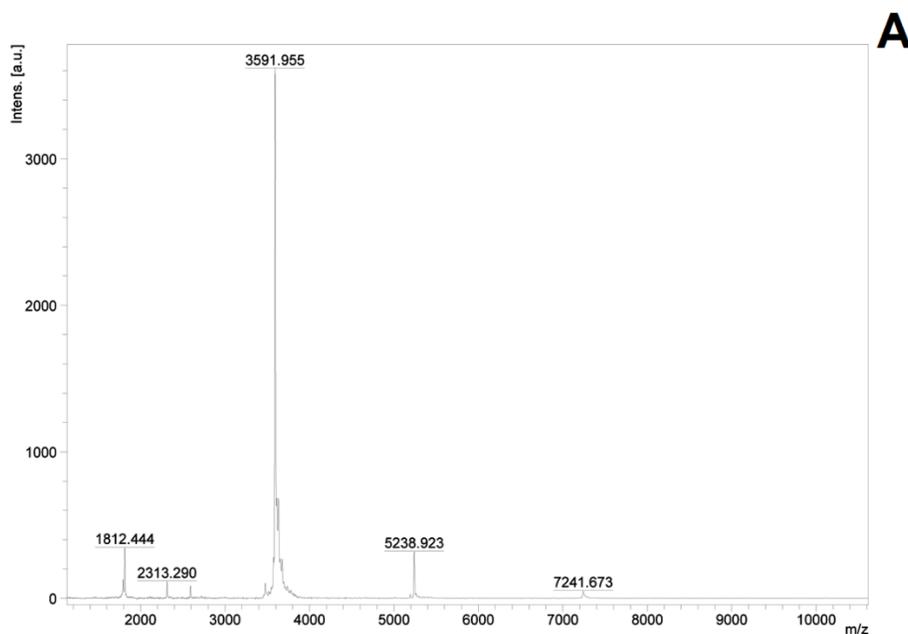
Espectros de masas (MALDI-TOF) de las muestras de los péptidos repurificados.

(A) Péptido 8A; (B) Péptido 8B, en una ventana masa/carga que va de los 2,000 a los 12,000.



12.4. Anexo IV

Espectros de masas (MALDI-TOF) de las muestras de los péptidos subfraccionados. (A) Péptido I en una ventana masa/carga que va de los 2,000 a los 11,000; (B) Péptido J en una ventana masa/carga que va de los 2,000 a los 20,000.



12.5. Anexo V

Calculos para determinar la coincidencia del peso calculado con el peso experimental obtenido de la alquilación y reducción parcial de cisteínas de la Tabla 7, restando el valor del peso de la NEM considerando diferentes puentes disulfuro rotos.

Pesos finales del dímero suponiendo ruptura de 2 puentes disulfuro. Ninguno de los valores coincide con el peso experimental

	K2	K2.1	K3	K4	K5	K5.1	K7	K7.1	K9	K10	K11
K2	10250.90 6	11826.58 0	11793.25 3	10222.67 6	10224.40 3	11798.86 3	10217.43 3	11802.80 9	11804.97 9	11804.73 9	10228.24 4
K2.1	11826.58 0	13402.25 4	13368.92 7	11798.35 0	11800.07 7	13374.53 7	11793.10 7	13378.48 3	13380.65 3	13380.41 3	11803.91 8
K3	11793.25 3	13368.92 7	13335.60 0	11765.02 3	11766.75 0	13341.21 0	11759.78 0	13345.15 6	13347.32 6	13347.08 6	11770.59 1
K4	10222.67 6	11798.35 0	11765.02 3	10194.44 6	10196.17 3	11770.63 3	10189.20 3	11774.57 9	11776.74 9	11776.50 9	10200.01 4
K5	10224.40 3	11800.07 7	11766.75 0	10196.17 3	10197.90 0	11772.36 0	10190.93 0	11776.30 6	11778.47 6	11778.23 6	10201.74 1
K5.1	11798.86 3	13374.53 7	13341.21 0	11770.63 3	11772.36 0	13346.82 0	11765.39 0	13350.76 6	13352.93 6	13352.69 6	11776.20 1
K7	10217.43 3	11793.10 7	11759.78 0	10189.20 3	10190.93 0	11765.39 0	10183.96 0	11769.33 6	11771.50 6	11771.26 6	10194.77 1
K7.1	11802.80 9	13378.48 3	13345.15 6	11774.57 9	11776.30 6	13350.76 6	11769.33 6	13354.71 2	13356.88 2	13356.64 2	11780.14 7
K9	11804.97 9	13380.65 3	13347.32 6	11776.74 9	11778.47 6	13352.93 6	11771.50 6	13356.88 2	13359.05 2	13358.81 2	11782.31 7
K10	11804.73 9	13380.41 3	13347.08 6	11776.50 9	11778.23 6	13352.69 6	11771.26 6	13356.64 2	13358.81 2	13358.57 2	11782.07 7
K11	10228.24 4	11803.91 8	11770.59 1	10200.01 4	10201.74 1	11776.20 1	10194.77 1	11780.14 7	11782.31 7	11782.07 7	10205.58 2

Peso final del dímero suponiendo ruptura de 5 puentes disulfuro. Se muestra en amarillo los valores que están cercanos al peso experimental.

	K2	K2.1	K3	K4	K5	K5.1	K7	K7.1	K9	K10	K11
K2	9500.126	11075.80 0	11042.47 3	9471.896	9473.623	11048.08 3	9466.653	11052.02 9	11054.19 9	11053.95 9	9477.464
K2.1	11075.80 0	12651.47 4	12618.14 7	11047.57 0	11049.29 7	12623.75 7	11042.32 7	12627.70 3	12629.87 3	12629.63 3	11053.13 8
K3	11042.47 3	12618.14 7	12584.82 0	11014.24 3	11015.97 0	12590.43 0	11009.00 0	12594.37 6	12596.54 6	12596.30 6	11019.81 1
K4	9471.896	11047.57 0	11014.24 3	9443.666	9445.393	11019.85 3	9438.423	11023.79 9	11025.96 9	11025.72 9	9449.234
K5	9473.623	11049.29 7	11015.97 0	9445.393	9447.120	11021.58 0	9440.150	11025.52 6	11027.69 6	11027.45 6	9450.961
K5.1	11048.08 3	12623.75 7	12590.43 0	11019.85 3	11021.58 0	12596.04 0	11014.61 0	12599.98 6	12602.15 6	12601.91 6	11025.42 1
K7	9466.653	11042.32 7	11009.00 0	9438.423	9440.150	11014.61 0	9433.180	11018.55 6	11020.72 6	11020.48 6	9443.991
K7.1	11052.02 9	12627.70 3	12594.37 6	11023.79 9	11025.52 6	12599.98 6	11018.55 6	12603.93 2	12606.10 2	12605.86 2	11029.36 7
K9	11054.19 9	12629.87 3	12596.54 6	11025.96 9	11027.69 6	12602.15 6	11020.72 6	12606.10 2	12608.27 2	12608.03 2	11031.53 7
K10	11053.95 9	12629.63 3	12596.30 6	11025.72 9	11027.45 6	12601.91 6	11020.48 6	12605.86 2	12608.03 2	12607.79 2	11031.29 7
K11	9477.464	11053.13 8	11019.81 1	9449.234	9450.961	11025.42 1	9443.991	11029.36 7	11031.53 7	11031.29 7	9454.802

12.6. Anexo VI

Cálculos para determinar la coincidencia del peso calculado con el peso experimental obtenido de la alquilación y reducción parcial de cisteínas de la Tabla 8, restando el valor del peso de la NEM considerando diferentes puentes disulfuro rotos.

Pesos finales del dímero suponiendo ruptura de 2 puentes disulfuro. Ninguno de los valores coincide con el peso experimental. Se muestra en verde los valores que están cercanos al peso experimental.

	K15 4371.075	K15 5845.135	K15 6518.711	K15 7207.805	K26 4367.036
K9 5804.227	9,674.782	11,148.842	11,822.418	12,511.512	9,670.743
K26 4367.036	8,237.591	9,711.651	10,385.227	11,074.321	

Article

A Novel Dimeric Conotoxin, FrXXA, from the Vermivorous Cone Snail *Conus fergusonii*, of the Eastern Pacific, Inhibits Nicotinic Acetylcholine Receptors

Ximena C. Rodríguez-Ruiz¹, Manuel B. Aguilar², Mónica A. Ortiz-Arellano³, Helena Safavi-Hemami^{4,5} 
and Estuardo López-Vera^{6,*}

- ¹ Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; ximena_dark@hotmail.com
- ² Laboratorio de Neurofarmacología Marina, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro 76230, Mexico; maguilar@unam.mx
- ³ Laboratorio de Malacología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán 82000, Mexico; manabel@uas.edu.mx
- ⁴ Department of Biomedical Science, University of Copenhagen, 1172 Copenhagen, Denmark; safavihelena@sund.ku.dk
- ⁵ Department of Biochemistry, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, USA
- ⁶ Laboratorio de Toxinología Marina, Unidad Académica de Ecología y Biodiversidad Acuática, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico
- * Correspondence: vera@cmarl.unam.mx; Tel.: +52-55-56230222 (ext. 45375)



Citation: Rodríguez-Ruiz, X.C.; Aguilar, M.B.; Ortiz-Arellano, M.A.; Safavi-Hemami, H.; López-Vera, E. A Novel Dimeric Conotoxin, FrXXA, from the Vermivorous Cone Snail *Conus fergusonii*, of the Eastern Pacific, Inhibits Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Toxins* **2022**, *14*, 510. <https://doi.org/10.3390/toxins14080510>

Received: 23 June 2022

Accepted: 10 July 2022

Published: 26 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: We isolated a new dimeric conotoxin with inhibitory activity against neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Edman degradation and transcriptomic studies indicate a homodimeric conotoxin composed by two chains of 47 amino acid in length. It has the cysteine framework XX and 10 disulfide bonds. According to conotoxin nomenclature, it has been named as α D-FrXXA. The α D-FrXXA conotoxin inhibited the ACh-induced response on nAChR with a IC_{50} of 125 nM on $\alpha 7$, 282 nM on $\alpha 3\beta 2$, 607 nM on $\alpha 4\beta 2$, 351 nM on mouse adult muscle, and 447 nM on mouse fetal muscle. This is first toxin characterized from *C. fergusonii* and, at the same time, the second α D-conotoxin characterized from a species of the Eastern Pacific.

Keywords: alpha d-conotoxin; dimeric-peptides; nAChR; *Conus* snails; *Conus fergusonii*

Key Contribution: This work contributes to the biochemical characterization and molecular targets identification of α D-conotoxins over distinct subtypes of human nAChR.

1. Introduction

Conus is a genus of carnivore marine snails that has more than 800 species, living mostly in the Indo-Pacific Ocean; in Mexico about 70 species living in the coasts of Pacific Ocean and Gulf of Mexico have been registered [1–3]. As they are slow moving animals, they have developed, as an evolutionary strategy, the use of venom for defense against their predators and as a weapon to capture prey, which involves worms, mollusks, and fishes. To administrate the venom, they have an innovative structure, the radula teeth modified as harpoon-like hypodermic needles that allow them to inject the venom that is synthesized in the venom duct [4,5].

The venom from each *Conus* species could have more than 100 active components that are known as conotoxins. Most of them are small peptides composed of 10 to 40 amino acids, which makes their characterization and synthesis relatively easy. In addition, they are stable peptides due to disulfide bonds, resulting from different

cysteine frameworks [6,7]. Conotoxins have been classified into genetic superfamilies according to the signal peptide of their precursors and in pharmacological families for every molecular target on which they act [8]. The great affinity towards their molecular target allows them to discriminate between the different subunits that form distinct subtypes of membrane receptors [9].

Alpha-conotoxins can modulate the muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). These are one of the most studied families of conotoxins because they can distinguish between the numerous subtypes of nAChRs, expressed along the central and peripheral nervous systems. These receptors have different pharmacological and electrophysiological properties; there is evidence that nAChRs are involved in pain processes and human diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, schizophrenia, and autism [8,10,11]. These features make α -conotoxins suitable candidates for therapeutic agents for human diseases. Each *Conus* snail has at least one α -conotoxin in its venom. There are more than 64 conotoxins belonging to several gene superfamilies that are reported to act as antagonists for the different nAChR subtypes and that are classified as: α -, α A-, ψ -, α S-, α B-, α C-, and α D-conotoxins [12–14].

α -Conotoxins belonging to the D superfamily were first described by Loughnan et al. [15]. They are large conotoxins whose main characteristic is to form dimers with varying levels of sequence and posttranslational heterogeneity. Each chain has almost 50 amino acid residues, including 10 cysteines that form disulfide bonds [15,16]. To the present, 25 α D-conotoxins have been reported from vermivorous species found in the Indo-Pacific [17]. However, in 2019 the first α D-conotoxin from a species that inhabits the Mexican Pacific Coast in the Eastern Pacific, *C. princeps*, was reported [18].

In this work, we report the identification, characterization, and activity of a novel conotoxin, α D-FrXXA, isolated from the venom of the vermivorous cone snail *C. fergusonii*, collected off the Coast of Mazatlán, Sinaloa, México. Peptide α D-FrXXA has a slightly inhibitory activity preference against neuronal rather than muscular nAChRs. The biochemical characterization indicates that it belongs to the α D-superfamily. Conotoxins with activity against nAChRs can act as new molecular tools for cellular and molecular studies in mammals' nervous systems in addition to their pharmacological potential use. This work provides more evidence that this type of dimeric conotoxins are synthesized not only by vermivorous species of the Indo-Pacific, but also by several vermivorous species of the Eastern Pacific, as has been shown for *C. princeps*. Finally, it opens the opportunity to discover more dimeric toxins in species inhabiting Mexican coasts, because it seems that α D-conotoxins could be abundant in *Conus* venoms from Eastern Pacific species.

2. Results

2.1. Fractionation of *C. Fergusonii* Venom

Fractionation of *C. fergusonii* venom by RP-HPLC gave 52 fractions. All of them were tested in the electrophysiology assay and four fractions had inhibitory activity over 90% against α 7 nAChRs (marked with an * in Figure 1A). The fourth fraction was the most active and was chosen for further experiments. After sub-fractionation by RP-HPLC a double signal was detected and manually collected in two 1.5 mL Eppendorf tubes (Figure 1B).

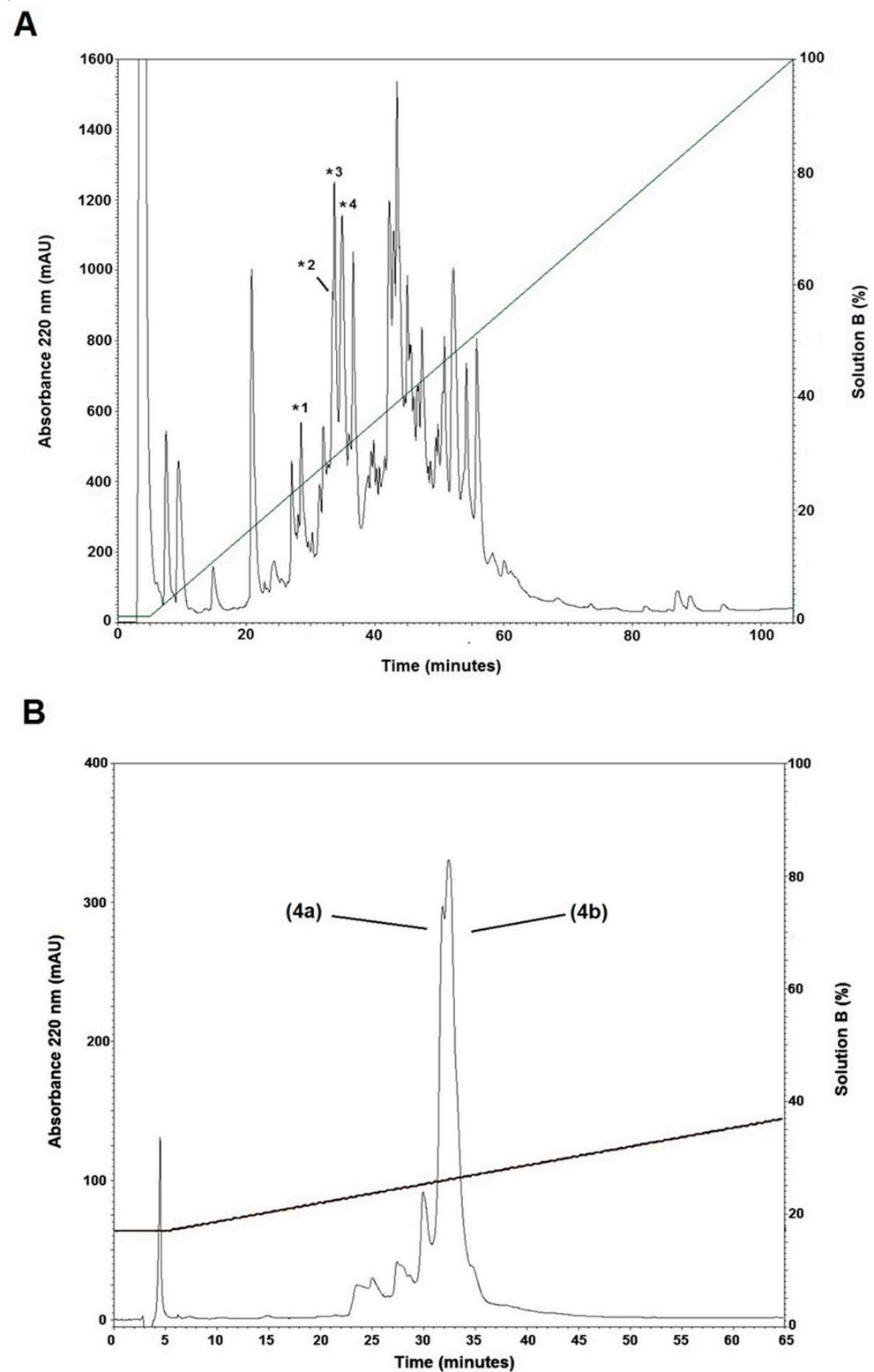


Figure 1. (A) Chromatogram profile of the fractionation of the crude venom from *C. fergusonii*. After 5 min at 5% Solution B, a linear gradient of 5 to 100% Solution B in 100 min was applied at a flow rate of 1 mL/min. Numbers *1–*4 indicate those fractions that presented activity over 90% on $\alpha 7$ nAChR. (B) The peak of the fourth active fraction, *4 in A, was subfractionated using an isocratic step at 17% Solution B for 5 min, followed by an elution gradient of 17 to 37% Solution B in 60 min at a flow rate of 1 mL/min. This procedure yielded two major fractions, 4a and 4b.

2.2. Molecular Mass and Amino Acid Sequence Analysis

The mass spectra of the two subfractions obtained from the fourth active fraction (without reduction and alkylation) are shown in Figure 2 and named 4a and 4b. The spectrum of subfraction 4a displays minor ($z = +1$) and major m/z ($z = +2$) signals 11,074.174 and 5513.533 (Figure 2A), that correspond to average masses of 11,073.164 Da and 11,025.046 Da, respectively; these masses differ by 48.118 Da, which might correspond to a γ -carboxylation. For subfraction 4b, the minor ($z = +1$) and major m/z ($z = +2$) average signals of 11,115.118 and 5481.605 correspond to average masses of 11,114.108 Da and 10,961.190, respectively (Figure 2B); in this case, the difference (152.918 Da) is more difficult to explain and will be dealt with in the Discussion section.

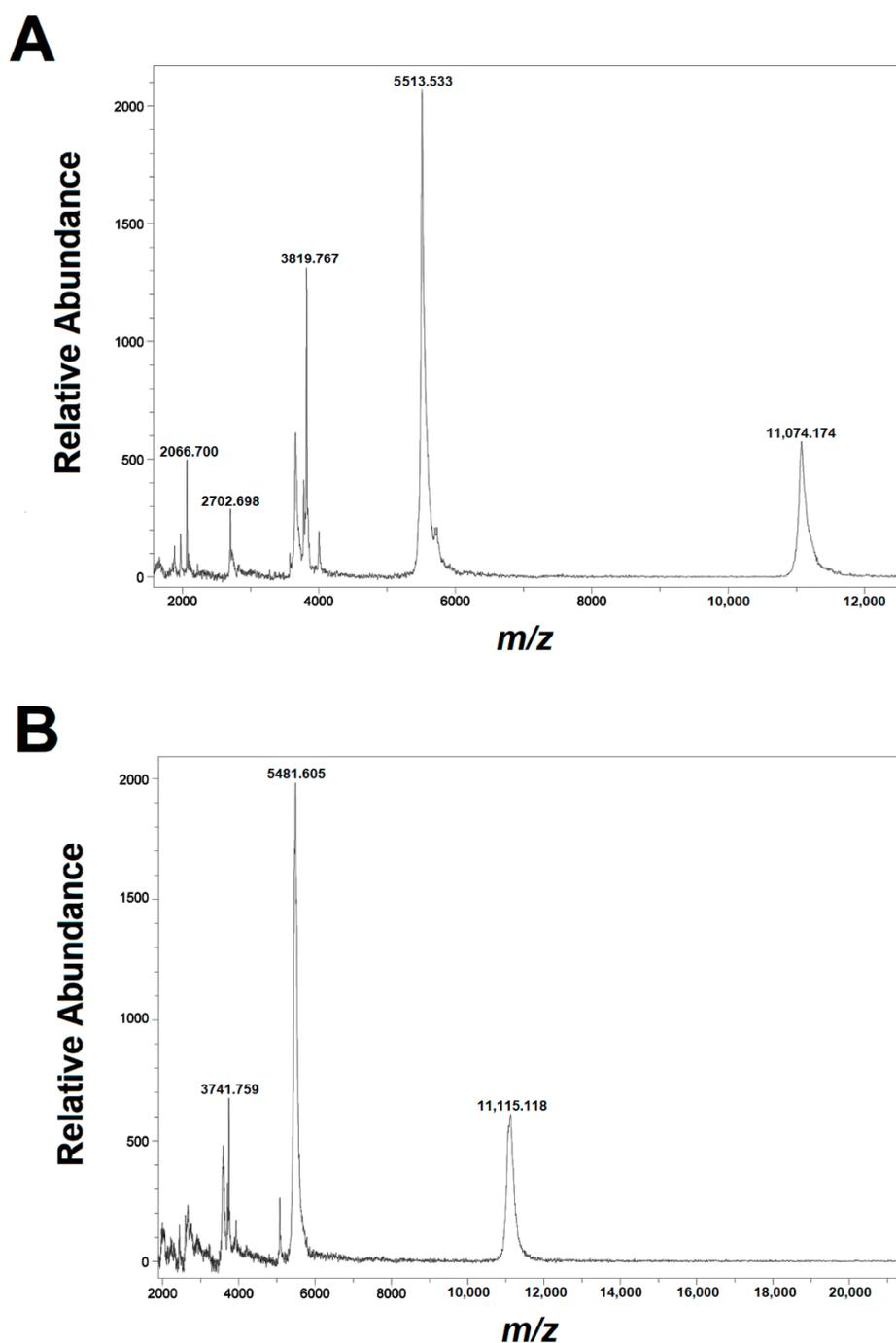


Figure 2. Mass spectra of the native semi-purified peptides obtained from the fourth active fraction from *C. fergusonii* venom. (A) Subfraction 4a; (B) Subfraction 4b.

2.4. Electrophysiology Assay

Component 4b, which was the most abundant, was tested as a first approximation on h α 7 nAChR expressed in *Xenopus* oocytes at 1 μ M. Component 4b showed an 100% inhibitory activity on the currents elicited by ACh. Hence, we tested component 4b on several subtypes of nAChRs (h α 4 β 2, h α 3 β 2, m(α 1)₂ β 1 δ γ , and m(α 1)₂ β 1 δ ϵ). Toxin concentration-response curves were generated for all the nAChRs subtypes. Notably, the IC₅₀ range was in the order of nM for all subtypes of nAChRs, with a slightly higher affinity for α 7 nAChR (Figure 5). In order to demonstrate distinct dissociation rates on the different subtypes of nAChR, we evaluated 600 nM concentration of component 4b (from now on referred to as α D-FrXXA) which is close to the highest IC₅₀ values. α D-FrXXA demonstrated different dissociation rates; the slower dissociation was for h α 7 subtype (almost irreversible) meanwhile the fastest was for h α 4 β 2 subtype (Figure 6).

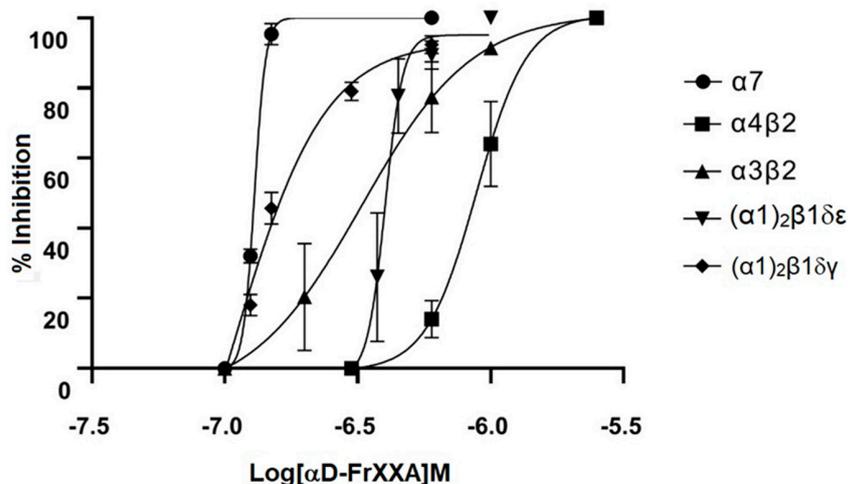


Figure 5. Dose-response curves of α D-FrXXA over different nAChR subtypes. α D-FrXXA inhibits all subtypes with an IC₅₀ for h α 7 = 125 nM, h α 4 β 2 = 697 nM, h α 3 β 2 = 282 nM, m(α 1)₂ β 1 δ ϵ 351 nM and m(α 1)₂ β 1 δ γ 447 nM.

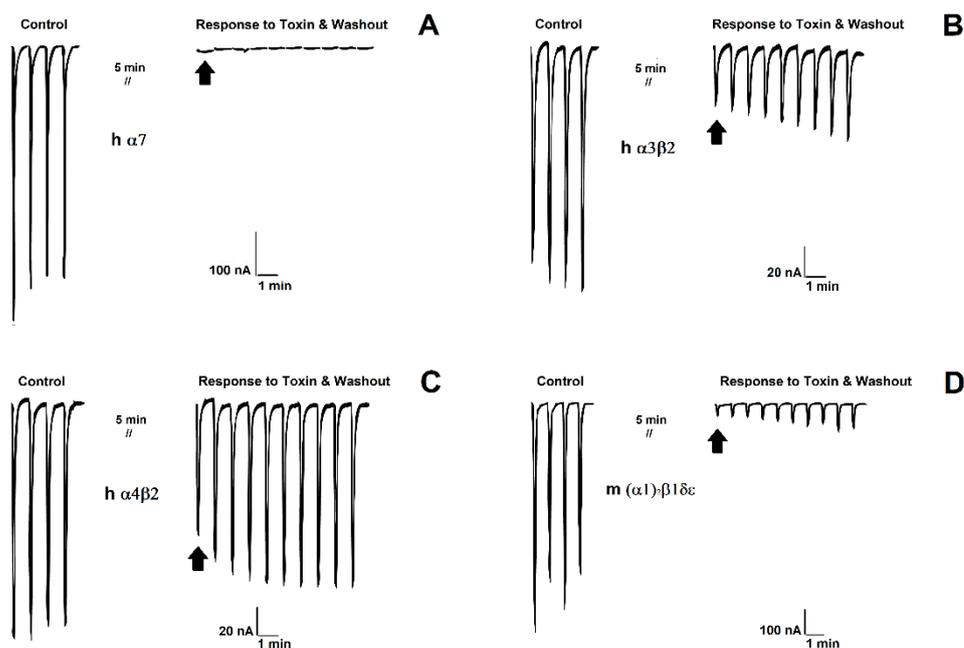


Figure 6. Cont.

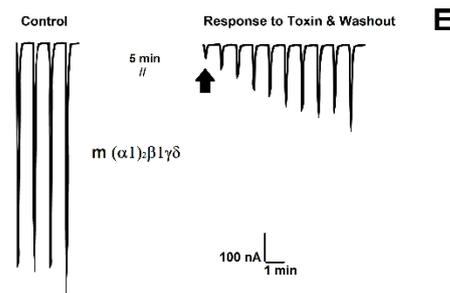


Figure 6. *Xenopus laevis* current recordings on five different subtypes (A) $\text{h}\alpha 7$, (B) $\text{h}\alpha 3\beta 2$, (C) $\text{h}\alpha 4\beta 2$, (D) $\text{m}(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$, and (E) $\text{m}(\alpha 1)_2\beta\delta\gamma$ of nAChRs. At left, control currents elicited by 1 s pulses of 1 mM acetylcholine prior to toxin addition. At right, peak current amplitudes at the end of five minutes incubation in 600 nM $\alpha\text{D-FrXXA}$ followed by washout of the toxin with agonist stimulation at one-minute intervals. // indicates that ND96 flow was stopped for 5 min.

3. Discussion

In this work, we isolated and characterized a new member of the αD -conotoxins from the venom of the vermivorous marine snail *C. fergusonii*, which inhabits the Mexican Pacific Coast. Within the venom of *C. fergusonii*, four signals with inhibitory activity were found. However, the present study focused on characterizing the fourth signal due to its high inhibitory activity on nAChR, its abundance and apparent purity. The fact that one signal with two peaks was obtained during the repurification process, indicated a compound that due to the similarity of its components, would be difficult to separate by means of polarity difference between them.

To know more about this compound, left and right components of $\alpha\text{D-FrXXA}$ were collected to obtain their molecular weight prior performing more experiments. It should be mentioned the most abundant signals in the mass spectrum correspond to the charge +2 species, whereas the less abundant species have charge +1. The deconvoluted values for both samples were: 11,025.046 Da and 11,073.164 Da for component 4a and 10,961.190 Da and 11,114.108 Da for 4b (Figure 2). These molecular masses indicate it was a conotoxin with a high molecular weight in relation to the common α -conotoxins from the A-superfamily.

Transcriptomics analysis indicated that in the venom of *C. fergusonii* there are two different sequences (derived from three distinct precursors) which matched in part the one obtained by Edman degradation. This shows us two mature toxins with 47 amino acids in length and differing from each other only by six amino acids. Sequence 1 has a theoretical average mass of 5297.18 Da, while Sequence 2 has 5435.30 Da (average), according to Ion Source Peptide Mass Calculator [19], considering 10 cysteines oxidized and free C- and N-termini.

Since only Tyr residues were observed at position 26 during Edman sequencing, we focused on sequence 2, which contains Tyr at that position; we calculated the molecular average mass for the homodimer formed by sequence 2 and the variation of two amino acids of these dimers detected by Edman sequencing. Then, we compared them with the experimental masses obtained. As a result, we found that the compound with experimental mass of 11,025.046 Da might be formed by a homodimer of the sequence 2 with one TFA adduct and one potassium adduct, resulting in a molecular mass of 11,023.70 Da; also, it could be formed by a homodimer of sequence 2 with the variation of P8S and R9T, with two TFA adducts, one potassium adduct and one oxygen and a resulting molecular mass of 11,022.47 Da.

The experimental mass of 11,073.164 Da might be formed by a homodimer of the sequence 2, with one TFA adduct, one potassium adduct, one sodium adduct and two oxygen resulting in a calculated mass of 11,077.68 Da. The compound with an experimental mass of 10,961.190 Da might be formed by a homodimer of the sequence 2 with the variation of P8S and R9T, with two TFA adducts, resulting in a calculated mass of 10,968.38 Da. Finally, the compound with experimental mass of 11,114.108 Da might be a homodimer

of sequence 2, with two TFA adducts and two oxygens resulting in a calculated mass of 11,114.62 Da. These combinations gave a difference of +1.35 Da, +2.58 Da, −4.52 Da, −7.19 Da, and −0.51 Da, respectively, when comparing the experimental masses and the calculated masses of the formed dimer with these modifications (Table 1). The difference of the five values falls within the error range of 0.1% for MALDI-TOF for peptides of this length.

Table 1. Comparison between experimental masses of compounds detected in Fractions 4a and 4b and theoretical masses of sequences determined by transcriptomic analysis, including probable chemical modifications introduced during the purification process.

Compound	tm/em	+ 1 TFA + 1 K	+ 2 TFA + 1 K + 1 O	+ 1 TFA + 1 K + 1 Na + 2 O	+ 2 TFA	+ 2 TFA + 1 O	em-tm
Dimer 2-2	10,872.60	11,023.70 ^a		11,077.68 ^c		11,114.62 ^e	
Dimer 2-2 [P8S, R9T]	10,742.36		11,022.47 ^b		10,968.38 ^d		
4a-11,025.05 ^{a,b}	11,025.05						+1.35 ^a , +2.58 ^b
4a-11,073.16 ^c	11,073.16						−4.52 ^c
4b-10,961.19 ^d	10,961.19						−7.19 ^d
4b-11,114.11 ^e	11,114.11						−0.51 ^e

All values are expressed as Da and are average masses. Some figures have been rounded to two digits compared to the values in the text. Letters in superscript (a–e) indicate correspondence between experimental and theoretical masses and their difference, both calculated taking into account the adducts and oxidations. Trifluoroacetic acid adducts, potassium adducts, and sodium adducts are denoted simply by TFA, K, and Na, respectively. O indicates oxidation, probably of M and/or W residues; tm, theoretical mass; em, experimental mass.

The formation of adducts, either with solvent molecules, alkali ions or other metals, or with other contaminating components, is frequently observed in the mass spectra of both ESI and MALDI analysis [20]. The occurrence of cationic and anionic adducts in MALDI spectra varies according to the number and polarity of the charged groups of the analyte [21].

Particularly, most ions observed in modern mass spectrometry are adduct ions or pseudomolecular ions such as $[M + H]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$ or $[M + K]^+$ [20]; Na^+ adducts are one of the most common in biological samples [22]. In addition, TFA adducts are reported as part of the repeating units commonly observed in background interferences [20]; these adducts have already been reported by Loughnan et al., and Hernández-Sámano et al., during the analysis of the α D-conotoxins from *C. vexillum* and *C. princeps*, respectively [15,18].

When performing the alignment in BLASTp, it indicated the two sequences correspond to the superfamily D of conotoxins. This family was first reported by Loughnan [15] and the main characteristic of the α D-conotoxins is that they are formed by dimers which can be hetero-, homo- or pseudo-homodimers (which vary only by post-translational modifications) [15]. The α D superfamily also included a conserved motif WGRCC, the same motif that can be seen in the amino acids 14–18. Based on that evidence, we decided to use the name α D-FrXXA following the proposed nomenclature for conotoxins [23].

It is known most conotoxins present post-translational modifications. The three α D-conotoxins from *C. vexillum*: VxXXA, VxXXB, and VxXXC have proline hydroxylation and gamma glutamate carboxylation; on the other hand, PiXXA isolated from *C. princeps* shows the hydroxylation of proline [15,18]. This makes hydroxylation a common post-translational modification in α D-conotoxins and it could be that α D-FrXXA is not the exception; it might have oxygens according to the calculated values from the molecular masses mentioned above (fourth paragraph).

Regarding how the dimer is formed, it can be seen in Figure 2 that the most abundant signals are the ones whose experimental weight had +2 charges and, in both cases, correspond to the presence of a homodimer formed by Sequence 2. However, there were variations in the amount of adducts; this indicates α D-FrXXA is a homodimer formed by two chains of Sequence 2.

To a lesser extent, a homodimer was also discovered that might be formed by two chains of Sequence 2 with the variation of amino acids that was found by Edman sequencing (P8S and R9T). This could be due to intraspecific variations in the venom, since the transcriptome was obtained from the venom duct of a single organism, but the venom used for the biochemical analysis and electrophysiological assays was the result of a mixture of the venom from different organisms.

The fact the same species has several amino acid sequences from the same conotoxins superfamily is well known. In the case of the D-superfamily it was found that *C. capitaneus*, *C. miles*, *C. mustelinus*, and *C. vexillum* have at least three different monomers reported in ConoServer. However, their dimer conformations were experimentally demonstrated only for *C. vexillum* [15], *C. capitaneus* [12], *C. generalis* [24], and *C. princeps* [18]. Therefore, despite having two monomers in the *C. fergusonii* venom transcriptome, these chains could be coupled in different ways and there could be five different dimers.

From the marine snail species that have α D-conotoxins, only the pharmacological target of three species have been identified: *C. vexillum* with VxXXA, VxXXB and VxXXC; *C. generalis* with GeXXA, and *C. princeps* with PiXXA. All of them have inhibitory activity against nAChRs, being the neuronal subtypes those with the highest affinity (Table 2) [15,18,24]. Although *C. mustelinus* and *C. capitaneus* have also shown inhibitory activity against nAChRs, the affinity of their toxins has not been studied yet [16].

Table 2. IC₅₀ of α D-conotoxins with pharmacological activity against nAChRs.

Conotoxin	nAChR	Species	IC ₅₀
GeXXA	$\alpha 7$	<i>H. sapiens</i>	210 nM
FrXXA	$\alpha 7$	<i>H. sapiens</i>	123 nM
PiXXA	$\alpha 7$	<i>H. sapiens</i>	6.2 nM
VxXXB	$\alpha 7$	<i>R. norvegicus</i>	400 pM
FrXXA	$\alpha 4\beta 2$	<i>H. sapiens</i>	607 nM
GeXXA	$\alpha 4\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	>3 nM
VxXXB	$\alpha 4\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	228 nM
FrXXA	$\alpha 3\beta 2$	<i>H. sapiens</i>	282 nM
GeXXA	$\alpha 3\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	498 nM
VxXXA	$\alpha 3\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	370 nM
VxXXB	$\alpha 3\beta 2$	<i>R. norvegicus</i>	8.4 nM
GeXXA	$\alpha 9\alpha 10$	<i>H. sapiens</i>	28 nM
GeXXA	$\alpha 9\alpha 10$	<i>R. norvegicus</i>	1.2 nM
FrXXA	$\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$	<i>H. sapiens</i>	351 nM
GeXXA	$\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$	<i>R. norvegicus</i>	743 nM
VxXXB	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$	<i>R. norvegicus</i>	3.5 nM
FrXXA	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$	<i>H. sapiens</i>	447 nM

According to the results obtained, dimer α D-FrXXA has the higher affinity for the neuronal $\alpha 7$ nAChR subtype with an IC₅₀ of 125 nM. However, blockade was observed with an IC₅₀ lower than 500 nM for $\alpha 3\beta 2$ and the muscular subtypes.

It should be mentioned that for $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 2$ nAChR subtypes, blockage presented by the dimer was irreversible since, despite the passage of time and washing, the amplitude of the current does not increase (Figure 6). On the other hand, in muscular subtypes (adult and fetal) the dimer was slightly reversible although the current amplitude could not return to its initial values, which indicates that the toxin was not completely separated from the receptor (Figure 6). Finally, for the $\alpha 4\beta 2$ subtype the dimer was reversible almost entirely within a few minutes of washing which indicates the toxin has less affinity to this receptor. (Figure 6). Reversibility in α D-conotoxins has been observed in *C. vexillum* venom where inhibition on $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 2$ nAChR subtypes was reversible [15]. It is important to mention that α D-conotoxins as well as Ψ -conotoxins are nAChR blockers and that both families

have the characteristic to not be competitive antagonists. In other words these toxins do not bind to the orthosteric agonist binding site as happens with other α -conotoxins (α , α A, α S, and α C) [12,24].

Yang et al. mentioned α D-conotoxins, in particular GeXXA, that binds to the outer surface of the receptor more than to the intermembrane domain, as a “lid-covering” nAChR inhibitor [25]. This blockade not only seals the pore entrance and prevents the passage of cations, but it also prevents the conformational change caused by the opening of the channel when the agonist binds the channel. This type of activity may explain why the sigmoid slope observed is so steep. In the case of GeXXA, it has been observed that the binding has preference towards the β subunits rather than the α [25].

In the case of α D-conotoxins tested on human receptors, GeXXA has affinity for the α 9 α 10 subtype with an IC₅₀ of 28 nM while for α 7 subtype this is 210 nM. For α D-FrXXA a similar value was obtained for α 7 (125 nM) [25]. In the case of PiXXA, it has activity over nAChR α 7 but with a micromolar concentration which is greater than that presented for α D-FrXXA [18].

It is worth mentioning that α D-FrXXA may have a higher affinity for nAChR from rat specimens with picomolar values; this is the case for VxXXB on α 7 subtype. There is similar evidence for GeXXA, whose activity over α 9 α 10 is ten times higher compared to the human subtype [26].

4. Conclusions

In summary, α D-FrXXA adds evidence that these dimeric toxins may play a biological role in the survival of species that inhabit the Eastern Pacific Ocean. Recently, the first α D-conotoxin isolated from a species inhabiting the Eastern Pacific was described from *C. princeps*, by Hernández-Sámano et al. [18].

5. Materials and Methods

5.1. Isolation of Crude Venom Extract from *C. fergusonii*

C. fergusonii specimens were collected in soft substratum off the coasts of Mazatlán, Sinaloa, México and frozen at -70 °C. Five venom ducts were dissected using fine tweezers and homogenized in 10 mL of 40% (*v/v*) acetonitrile (ACN) and 2% (*v/v*) trifluoroacetic acid (TFA) with a tissue homogenizer (Biospec Products, Tissue Tearor, Model 985370). The resulting mix was centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min. The supernatant was collected by decantation and the protein content was quantified with a Nanodrop spectrophotometer at 280 nm wavelength (Implen NanoPhotometer NP80). The venom extract was lyophilized and stored until its use for fractionation.

5.2. Venom Extract Fractionation by RP-HPLC

Aliquots of 8 mg of crude venom were dissolved with 1 mL of Solution A (aqueous solution with 0.1% (*v/v*) TFA) before fractionation by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) (Infinity 1260 Series Agilent Technologies HPLC System; Santa Clara, CA, USA) using a Vydac Reverse-Phase Peptide and Protein C₁₈ column (218TP54, 5 μ m particle size, 4.6 mm, 250 mm) attached to a Vydac Reverse-Phase Peptide and Protein C₁₈ Precolumn (218GK54, 5 μ m particle size, 4.6 mm, 10 mm).

Fractions of the crude venom extract were eluted with an isocratic step of 5% Solution B (90% ACN in water containing 0.085% (*v/v*) TFA) for 5 min, followed by a linear gradient from 5% to 100% (*v/v*) of Solution B in 95 min, at a flow rate of 1 mL/min. Further purification of α D-FrXXA was performed by RP-HPLC using an isocratic step at 17% of Solution B for 5 min, followed by a linear gradient from 17% to 37% (*v/v*) of Solution B, over 65 min at a flow rate of 1.0 mL/min. The elution profiles were monitored at a wavelength of 220 nm. Each signal was collected manually.

5.3. Quantification of α D-FrXXA

The quantification of α D-FrXXA was first performed, by relating the area under the curve obtained by RP-HPLC for 5 nmol of the synthetic conotoxin α -RgIA (16,829,353 units) with respect to the area obtained for α D-FrXXA. The samples sent to obtain molecular mass and sequence were calculated in this way.

When the molecular weight of α D-FrXXA was already available, the weight in milligrams was used to have a more precise value of the total nmol to perform the electrophysiological assays. This was done assuming that 5 nmol of α -RgIA with an area under the curve of 16,829,353 units is equivalent to 7.8 μ g. With this value, we calculated the amount of μ g for α D-FrXXA in relation to its area under the curve; subsequently, this value was divided by the weight (kDa) obtained by the mass spectra.

5.4. Characterization of α D-FrXXA Conotoxin

Molecular mass and amino acid sequence determination.

Two pmol of the active peptide were analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization technique (MALDI-TOF; CDMX, Mexico) with an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix at Chemistry Institute, UNAM, facilities.

For amino acid sequence, one nmol of α D-FrXXA was analyzed by automated Edman degradation using a PPSQ-31A Protein Sequencer (Shimadzu Scientific Instruments; Tokyo, Japan) by Dr. Fernando Zamudio at Biotechnology Institute, UNAM. Transcriptomic studies will be published.

5.5. Data Base Analysis

The Protein BLAST program was used to search the non-redundant protein sequences with organism *Conus* (taxid: 6490), and the algorithm BlastP (protein-protein BLAST) with the default settings for the rest of the parameters.

5.6. Propagation of the Genetic Material for nAChRs Subunits

cDNA clones for neuronal human α 3, α 4, α 7 and β 2, and muscular mouse α 1, β 1, δ , γ , ϵ nAChR subunits were kindly provided by Dr. Michael McIntosh (University of Utah, Salt Lake City, UT, USA).

The plasmids of the nAChRs subunits were inserted in XL-1 Blue competent cells and were purified by kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega; Madison, WI, USA). Only the cDNA of neuronal nAChRs subtypes was linearized using Not I enzyme and purified with EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (Bio Basic; CDMX, Mexico). Transcription was done following the T7 mMessage mMachine Kit (Applied Biosystem; Foster City, CA, USA) protocol and purified with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN; Redwood City, CA, USA).

5.7. Electrophysiology Characterization on nAChRs

5.7.1. Oocytes Isolation

Xenopus laevis frogs were anesthetized with 2% tricaine methanesulfonate (MS-222) for 30 min before performing microsurgery. Oocytes were placed in a 50 mL-Falcon tube with OR-2 solution (82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂·6H₂O and 5 mM HEPES, pH 7.5 adjusted with 10 N NaOH) and washed at least 5 times with 40 mL to eliminate impurities.

To defolliculate the oocytes, 0.75 mg/mL of *Clostridium histolyticum* Collagenase A (Roche, 10103586001) were added into 20 mL OR-2 solution and stirred for half an hour at room temperature. Then, the oocytes were washed at least 5 times with 40 mL of OR-2 solution to eliminate Collagenase A. Stage VI oocytes were manually selected and kept in ND96 extracellular solution (96.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂·6 H₂O, 1.8 mM CaCl₂·2 H₂O, 5 mM HEPES, pH 7.3) added with Penicillin/Streptomycin (100 U/100 μ g)/mL and 100 μ g/mL Gentamicin at 15 °C.

5.7.2. Heterologous Expression

One day after harvesting, 5.2 ng and 2.5 ng of cDNA for the adult and fetal muscle nAChR subtypes, respectively, were injected into oocytes with a Nanoliter 2000 (World Precision Instruments; Guadalajara, Mexico). For the neuronal nAChR subtypes $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$, 32.2, 32.2, and 18 ng (total) of RNA were injected, respectively.

5.7.3. Electrophysiological Assay

Two-electrode voltage clamp technique was used for the recordings of neuronal and muscular nAChRS expression 48 h upon injection. Glass microelectrodes (borosilicate capillaries) were filled with 3 M KCl. Injected oocytes were placed in a 30 μ L recording chamber and membrane potential was clamped at -70 mV. ND96 solution was perfused by gravity. Currents were generated applying pulses of 1 s of acetylcholine (ACh) per min. Concentration of ACh was 1 μ M for the fetal muscle subtype, 10 μ M for the adult muscle, 200 μ M for neuronal $\alpha 7$, and 100 μ M for $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ neuronal subtypes.

To test the toxin, the perfusion of ND96 was stopped for 5 min and different concentrations of α D-FrXXA were directly pipetted into the recording chamber. After 5 min of interaction, the toxin-receptors, perfusion and pulses were started over. Current amplitude was measured before and after toxin administration. The difference between them was converted to an inhibition percentage, taking the amplitude before toxin application as 100%.

Data acquisition was done with the program LabView (National Instruments; Ciudad Juarez, Mexico). An average of three oocytes was used to obtain the percentage for each data. Concentration-response curves were fit to the equation $\% \text{ response} = 100[1 + (\text{toxin concentration}/IC_{50})^{n_H}]^{-1}$, where n_H is the Hill coefficient, and the graphics were obtained with GraphPadPrism Software, Version 9.1.0, San Diego, CA, USA.

Author Contributions: Conceptualization, E.L.-V.; methodology, X.C.R.-R. and M.B.A.; formal analysis, H.S.-H.; investigation, E.L.-V., X.C.R.-R. and M.B.A.; resources, M.A.O.-A.; writing—original draft preparation, X.C.R.-R., M.B.A. and E.L.-V.; writing—review and editing, X.C.R.-R., M.B.A. and E.L.-V.; funding acquisition, E.L.-V. and M.B.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) to E.L.-V. and M.B.A., grant number IG200220, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to E.L.-V., grant number 153915. X.C.R.-R. was supported by fellowship 666534, from CONACYT.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, for all the help given to the student Ximena Cecilia Rodríguez Ruiz. Collaborators: Lourival D. Possani Postay and Fernando Zamudio (Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM) for providing access to the protein sequencer and Roberto Arreguin Espinosa de los Monteros (Instituto de Química-UNAM) for giving us access to mass spectrometry. The UNAM Institutional Budgets to the Laboratorio de Toxinología Marina (615), Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, and Laboratorio de Neurofarmacología Marina (406), Instituto de Neurobiología.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Olivera, B.M. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell* **1997**, *8*, 2101–2109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. López-Vera, E.; Aguilar-Ramírez, M.B.; Heimer, E.P. Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. *Ciencia* **2006**, *3*, 47–51.
3. Fedosov, A.E.; Moshkovskii, S.A.; Kuznetsova, K.G.; Olivera, B.M. Conotoxins: From the biodiversity of gastropods to new drugs. *Biochem. Ser. B Biomed. Chem.* **2012**, *6*, 107–122. [[CrossRef](#)]

4. Terlau, H.; Olivera, B.M. *Conus* venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 41–68. [[CrossRef](#)]
5. Casewell, N.; Wüster, W.; Vonk, F.; Harrison, R.; Fry, B. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* **2013**, *28*, 219–229. [[CrossRef](#)]
6. Olivera, B.; Rivier, J.; Craig, C.; Ramilo, A.C.; Corpuz, P.G.; Abogadie, F.C.; Mena, E.E.; Woodward, R.S.; Hillyard, R.D.; Cruz, J. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* **1990**, *249*, 257–263. [[CrossRef](#)]
7. Olivera, M.B. *Conus* peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31173–31177. [[CrossRef](#)]
8. Nirthanan, S.; Gwee, M.C. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *94*, 1–17. [[CrossRef](#)]
9. Kudryavtsev, D.; Shelukhina, I.; Vulfius, C.; Makarieva, T.; Stonik, V.; Zhmak, M.; Igor, I.; Kasheverov, I.; Utkin, Y.; Tsetlin, V. Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: From low-molecular weight ones to peptides and proteins. *Toxins* **2015**, *7*, 1683–1701. [[CrossRef](#)]
10. López-Vera, E. Los receptores nicotínicos de acetilcolina y las α -conotoxinas. *REB* **2010**, *29*, 8–12.
11. Ashton-Acton, Q. *Central Nervous System Diseases: New Insights for the Healthcare Professional*; Scholarly Editions: Atlanta, GA, USA, 2013.
12. Kaufenstein, S.; Kendel, Y.; Nicke, A.; Coronas, F.I.V.; Possani, L.; Favreau, P.; Križaj, I.; Wunder, C.; Kauert, G.; Mebs, D. New conopeptides of the D-superfamily selectively inhibiting neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon* **2009**, *54*, 295–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Luo, S.; Christensen, S.; Zhangsun, D.; Wu, Y.; Hu, Y.; Zhu, X.; Chhabra, S.; Norton, R.S.; McIntosh, M.J. A novel inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors from *Conus vexillum* delineates a new conotoxin superfamily. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. López-Vera, E.; Flores-Torres, A. Las Conotoxinas Como Herramientas Para el Estudio de Receptores Nicotínicos de Acetilcolina. In *De Componentes Moleculares a Salud Pública y Ambiental*; Pérez-León, J.A., Vázquez, A.C., Eds.; Universidad Autónoma de Ciudad Juárez: Ciudad Juárez, Mexico, 2016; pp. 53–88.
15. Loughnan, M.; Nicke, A.; Jones, A.; Schroeder, C.; Nevin, S.; Adams, D.J.; Alewood, P.F.; Lewis, R.J. Identification of a novel class of nicotinic receptor antagonists: Dimeric conotoxins VxXIIA, VxXIIB, and VxXIIC from *Conus vexillum*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24745–24755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Loughnan, M.L.; Nicke, A.; Lawrence, N.; Lewis, R.J. Novel alpha D-conopeptides and their precursors identified by cDNA cloning define the D-conotoxin superfamily. *Biochemistry* **2009**, *5*, 3717–3729. [[CrossRef](#)]
17. Conoserver. Available online: <http://www.conoserver.org/> (accessed on 22 April 2022).
18. Hernández-Sámamo, A.C.; Falcón, A.; Zamudio, F.; Batista, C.V.F.; Michel-Morfin, J.E.; Landa-Jaime, V.; López-Vera, E.; Jeziorski, M.C.; Aguilar, M.B. α D-Conotoxins in Species of the Eastern Pacific: The Case of *Conus princeps* from Mexico. *Toxins* **2019**, *12*, 405. [[CrossRef](#)]
19. IonSource. Available online: <https://www.ionsource.com/> (accessed on 12 November 2021).
20. Keller, B.O.; Sui, J.; Young, A.B.; Whittall, R.M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627*, 71–81. [[CrossRef](#)]
21. Krüger, R.; Karas, M. Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: Anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 1218–1226. [[CrossRef](#)]
22. Petković, M.; Schiller, J.; Müller, M.; Süß, R.; Arnold, K.; Arnhold, J. Detection of adducts with matrix clusters in the positive and negative ion mode MALDI-TOF mass spectra of phospholipids. *Z. Für Nat. B* **2009**, *64*, 331–334. [[CrossRef](#)]
23. Gray, W.R.; Olivera, B.M.; Cruz, L.J. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 665–700. [[CrossRef](#)]
24. Kompella, S.; Xu, S.; Zhang, T.; Yan, M.; Shao, X.; Chi, C.; Ding, J.; Wang, C.; Adams, D. Novel strategy of blocking nAChR revealed by dissecting a dimeric conotoxin α D-GeXXA. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 1229. [[CrossRef](#)]
25. Yang, L.; Tae, H.S.; Fan, Z.; Shao, X.; Xu, S.; Zhao, S.; Adams, D.J.; Wang, C. A novel lid-covering peptide inhibitor of nicotinic acetylcholine receptors derived from α D-Conotoxin GeXXA. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Xu, S.; Zhang, T.; Kompella, S.N.; Yan, M.; Lu, A.; Wang, Y.; Shao, X.; Chi, C.; Adams, D.J.; Ding, J.; et al. Conotoxin α D-GeXXA utilizes a novel strategy to antagonize nicotinic acetylcholine receptors. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]