



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización bioquímica y electrofisiológica de un
componente hidrofílico del veneno de *Conus archon*

REPORTE DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JAIME MORALES DEMENEGHI

DIRECTOR:

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

Ciudad Universitaria, CDMX, 2024





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

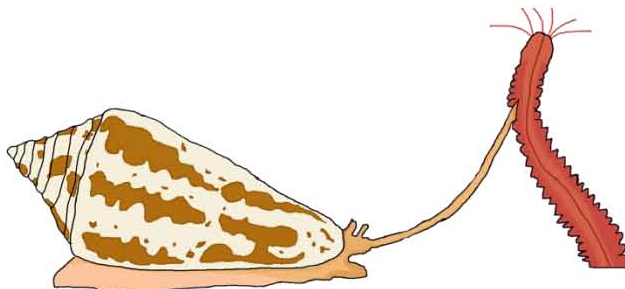
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Morales
Demeneghi
Jaime
2281952780
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
420003461
2. Datos del tutor
Dr.
José Estuardo
López
Vera
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Manuel Benigno
Aguilar
Ramírez
4. Datos del sinodal 2
Dr.
César Noé
Cortés
Rubio
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Ximena Cecilia
Rodríguez
Ruíz
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Mayra Dinorah
Álvarez
Santos
7. Datos del trabajo escrito
Caracterización bioquímica y electrofisiológica de un componente hidrofílico del veneno de *Conus archon*
65 p.
2024

*“Que inapropiado
llamar Tierra a
este planeta
cuando claramente
es un océano”*

-Arthur Clarke



Agradecimientos

Académicos

Al **Dr. Estuardo López Vera**, por proporcionarme un espacio en su laboratorio y aceptar dirigir el presente trabajo, en el que me brindo su conocimiento, paciencia y consejos en todo momento, permitiendome conocer el emocionante mundo de las toxinas.

A los integrantes del comité de sinodales: **Dr. Manuel Aguilar Ramírez, Dr. César Noé Cortés Rubio, Dra. Ximena Rodríguez Ruiz y Dra. Mayra Dinorah Álvarez Santos**. Por sus valiosas observaciones, comentarios y aportaciones al presente trabajo.

A los integrantes del laboratorio de toxinología marina: **Dra. Ximena Rodríguez Ruíz, Dr. Luis Ángel Martínez Hernández, M. en C. Minerva Reynoso, M. en C. Kaori Báez, Biol. Mar. Jesús Alejandro Escudero y Biol. Chema Herrera Cruz**. Por sus valiosos consejos y apoyo durante la etapa experimental de este proyecto y de quienes no solo aprendí sobre toxinas marinas y técnicas de laboratorio sino también consejos de vida. Muchas gracias y mucho éxito a todos.

Al **Laboratorio de Servicios Analíticos** del Instituto de Química de la UNAM y al **Laboratorio de Neurofarmacología Marina** del Instituto de Neurobiología de la UNAM por la aportación en la espectrometría de masas y la degradación de Edman respectivamente.

Al **Dr. Adolfo Gracia Gasca** y al **Dr. Estuardo López Vera**, por permitirme participar en la campaña oceanográfica COBERPES 10, que sin duda fue una de las experiencias más enriquecedoras como biólogo y un momento inolvidable en mi vida personal.

A los diversos profesores que durante la carrera me transmitieron su pasión y conocimiento por la biología, cuyas clases marcaron mi carrera y de quienes aprendí mucho más que lo que marcaba el temario.

A la **Facultad de Ciencias, el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y la Universidad Nacional Autónoma de México**, instituciones en las que me formé profesionalmente.

A cada persona que ha contribuido en mi formación y que ha influido en la persona que soy en este momento.

Personales

A mi padre, **Jaime Morales Romero**, quien no solo es mi principal inspiración en la ciencia y uno de mis modelos a seguir sino también es quien, junto con mi madre, me ha entregado infinitamente su apoyo para llegar hasta aquí.

A mi madre, **Verónica Patricia Demeneghi Marini**, quien me ha apoyado en cada pasión que he tenido en mi vida, desde el fútbol hasta la ciencia. Su cariño e interés han sido mi principal motor en la vida y la razón para perseverar hasta lograr mis objetivos.

A mi tía, **(Eu)Lalia Demeneghi Marini**, quien ha sido como mi segunda madre, cuidándome de mí desde que estaba chico y hasta la actualidad y por la que he aprendido valiosos consejos en la cocina.

A mis abuelas **Margarita y Francisca** y mis abuelos **Gregorio y Tato (QEPD)**, por su interés constante en mi vida así como su cariño invaluable.

A mis hermanos de otras familias: **Silvia Alejandra Domínguez Cervantes** quien me ha acompañado desde la secundaria hasta la universidad y quien me ha ayudado a superar diversos obstáculos; y **Diego Palmeros Morales**, quien a pesar de la distancia siempre me ha demostrado su apoyo y me ha levantado el ánimo en más de una ocasión. Los quiero y admiro infinitamente

A mis roomies con quienes no solo compartí hogar sino también muchos momentos que atesoraré por el resto de mi vida y a quienes quisiera dedicarles unas palabras:

Mary Navarrete (ChAT GTPasa) por acompañarme en tantas noches de desvelo estudiando, por ser la extrovertida en el grupo y por poderle contar cualquier cosa.

Cynthia Arroyo de quien aprendí a hacer recetas de cocina y quien siempre se animó en participar en diversas actividades, desde nadar hasta hacer pan.

Dani Treviño por su calidez y amabilidad así como transmitir su emoción por las ciencias marinas.

Manuelito Rodríguez por sus grandes recomendaciones musicales, el cariño que mostró siempre y las pláticas de diversos temas que teníamos.

A **Danae Orrego, Andrés Genis, Danny Hernández y Betsabé Galindo, Diana Tiburcio y Braulio Herrera** quienes fueron mis primeros amigos durante la carrera y a quienes guardo un especial afecto y la esperanza de volver a coincidir ahora profesionalmente como biólogos y veterinario.

A **Oscar Cárdenas, Nacho Jimenez, Ana Lau Arzate y Tamara Galdós**, a quienes conocí durante las clases virtuales y tuve la fortuna de conocerlos en persona. Excelentes biólogos y amigos a los que les tengo mucha estima.

Al amor de mi vida, **Kimberly Gallardo Romero**, no alcanzan las palabras para expresar el amor, la admiración y el agradecimiento que te tengo a ti. Sólo puedo decir que coincidir contigo en la carrera ha sido probablemente la mejor parte de ella y que cada momento que he pasado contigo han sido mis favoritos. Para ti, mi eterno amor y gratitud.

Nuevamente, a los integrantes del laboratorio de toxicología marina:

A la **Dra. Ximena** y el **Dr. Luis** por sus clases durante el taller y las continuas explicaciones (así como su reiterada paciencia) con los diversos temas, gracias por siempre atender mis dudas con la mejor disposición. Ustedes me han enseñado muchísimo.

A la **M. en C. Minerva** por sus consejos en la parte experimental así como las pláticas que surgían durante los descansos.

A la **Biol.** y próxima **M. en C. Kaori** quien en un principio me recomendó el taller y con su amabilidad llenaba de buena vibra el laboratorio.

A mis amigos tesisistas: **Chema** por todas las risas, pláticas, consejos y experiencia que intercambiamos durante el 2023. y **Jesús**, por todas las risas, pláticas, consejos y experiencia que intercambiamos durante el 2023.

Finalmente, al **Dr. Estuardo** por toda la paciencia, disposición y amistad que mostró en todo momento y por confiar en mí durante la realización de este proyecto.

A todos quienes han tenido un impacto en mi vida, a quienes dedican su vida a estudiar la vida y a quienes se tomen un tiempo para leer este escrito. **GRACIAS... TOTALES.**

Índice

Resumen	1
1 Introducción.....	2
2 Antecedentes.....	3
2.1 Phylum Mollusca	3
2.1.1 Clase Gastropoda.....	5
2.1.2 Orden Neogastropoda.....	5
2.1.3 Familia Conidae.....	5
2.1.4 Género <i>Conus</i>	6
2.1.5 <i>Conus archon</i>	7
2.2 Composición del veneno de <i>Conus</i>	9
2.2.1 Estructura de las conotoxinas	9
2.2.2 Interacción con su blanco molecular	11
2.2.3 Clasificación de las conotoxinas	12
2.3 Receptores nicotínicos de acetilcolina.....	14
2.3.1 Estructura	14
2.3.2 Aspectos fisiológicos relevantes	16
2.3.3 Origen evolutivo de los nAChR	17
2.4 Conotoxinas con efecto sobre los nAChR.....	17
2.4.1 α -conotoxinas	17
2.4.2 Otros tipos de conotoxinas.....	19
2.5 El veneno de <i>Conus archon</i>	19
3 Justificación	19
4 Hipótesis	20
5 Objetivos	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos particulares.....	20
6 Materiales y métodos	20
6.1 Obtención de los conductos venenosos de <i>Conus archon</i>	20
6.2 Extracción y cuantificación del veneno crudo de <i>C. archon</i>	21
6.3 Fraccionamiento del extracto crudo de veneno de <i>C. archon</i> por RP-HPLC	21
6.4 Extracción quirúrgica de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	22
6.5 Expresión heteróloga de los subtipos de nAChR en los ovocitos de <i>X. laevis</i>	23
6.6 Evaluación electrofisiológica de las fracciones seleccionadas del veneno	
proveniente de <i>C. archon</i>	24
6.7 Análisis estadístico.....	25
6.8 Determinación del peso molecular mediante espectrometría de masas	26

6.9	Secuenciación de aminoácidos por degradación de Edman.....	26
7	Resultados	26
7.1	Cuantificación de proteína en los extractos crudos de veneno provenientes de <i>C. archon</i>	26
7.2	Fraccionamiento del veneno de <i>C. archon</i> por RP-HPLC	27
7.3	Estimación de la cantidad de nanomoles en las fracciones F4, F5, F6 y F7	29
7.4	Evaluación funcional de las fracciones seleccionadas del veneno de <i>C. archon</i>	30
7.5	Purificación de la fracción F7	36
7.6	Determinación de la masa molecular de los componentes F7-3 y F7-4.....	37
7.7	Secuenciación del componente F7-4.....	38
7.8	Curva dosis-inhibición de la fracción F7 en los subtipos de nAChR	39
8	Discusión	39
9	Conclusiones	49
10	Perspectivas	50
11	Referencias	50

Lista de Figuras

Figura 1. Cladograma y sinapomorfías de las clases del phylum Mollusca.....	4
Figura 2. Anatomía del aparato venenoso de <i>Conus</i>	7
Figura 3. Distribución de <i>Conus archon</i>	8
Figura 4. Concha de un ejemplar de <i>Conus archon</i>	9
Figura 5. Proceso de síntesis y secreción de las conotoxinas.	10
Figura 6. Clasificación de las conotoxinas..	13
Figura 7. Nomenclatura de las conotoxinas.	14
Figura 8. Estructura representativa de un receptor nicotínico de acetilcolina.	15
Figura 9. Microcirugía realizada en <i>Xenopus laevis</i>	22
Figura 10. Ovocitos extraídos de <i>Xenopus laevis</i>	23
Figura 11. Inyección del material genético de los nAChR a los ovocitos de <i>X. laevis</i>	24
Figura 12. Configuración de la cámara de registro.....	25
Figura 13. Perfil cromatográfico del veneno proveniente de hembras de <i>C. archon</i> a una λ de 220 nm.....	28
Figura 14. Perfil cromatográfico del veneno proveniente de hembras de <i>C. archon</i> con una λ de 280 nm.....	29
Figura 15. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 200 μ M en el nAChR $\alpha 7$ antes y después de la incubación de la fracción F7 [100 μ M].	31
Figura 16. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 200 μ M en el nAChR $\alpha 7$ antes y después de la incubación de la fracción 7 [50 μ M y 10 μ M].	31
Figura 17. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 100 μ M en el nAChR $\alpha 3\beta 2$ antes y después de la incubación con F7 [50 μ M y 10 μ M].	32
Figura 18. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 10 μ M en el nAChR $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta \epsilon$ antes y después de la incubación de la fracción D7 [50 μ M y 10 μ M].	33
Figura 19. Porcentaje de respuesta promedio de los tres subtipos de nAChR evaluados en presencia de la F7 [50 μ M] del veneno de <i>C. archon</i>	33
Figura 20. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 200 μ M en el nAChR $\alpha 7$ antes y después de la incubación de F4, F5 y F6 [10 μ M].	35
Figura 21. Perfil cromatográfico de la fracción F7 del veneno de <i>C. archon</i> a una λ de 220 nm.....	36
Figura 22. Perfil cromatográfico de la fracción F7 del veneno de <i>C. archon</i> a una λ de 280 nm.....	37
Figura 23. Espectros de masas de los componentes F7-3 y F7-4 purificados.	38
Figura 24. Curva dosis-inhibición de F7 sobre los subtipos de nAChR evaluados.	39
Figura 25. Discriminación entre subtipos de nAChR por parte de la fracción F7 proveniente del veneno de <i>C. archon</i>	42
Figura 26. Principales hallazgos del análisis toxinológico realizado y perspectivas futuras.....	47

Lista de tablas

Tabla 1. Cuantificación de proteína y pureza de las muestras de extracto crudo de veneno provenientes de <i>C. archon</i>	27
Tabla 2. Rendimiento estimado en nanomoles en cada fracción seleccionada tomando como referencia la relación a α -RgIA.....	30
Tabla 3. Porcentaje de inhibición promedio debido al efecto de 50 μ M de F7 en los tres subtipos de nAChR que fueron evaluados.....	34
Tabla 4. Efecto de las fracciones con actividad sobre alguno de los nAChR evaluados.	35

Tabla 5. Antagonistas del nAChR $\alpha 7$ que poseen efecto sobre otros subtipos de nAChR.....	46
Tabla 6. Comparación entre los péptidos ArchIIIa y F7 provenientes del veneno de <i>C. archon</i>	48

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
5-HTR	Receptor de 5-Hidroxitriptamina
ACh	Acetilcolina
ACN	Acetonitrilo
C	Cisteína
Ca ²⁺	Ion calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
cDNA	DNA codificante
CHCA	Ácido- α -4-hidroxicinámico
cm	Centímetro
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
e.g.	Por ejemplo (<i>exempli gratia</i>)
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
g	Gallo (<i>Gallus gallus</i>)
GABAR	Receptor de Ácido γ -Aminobutírico (<i>γ-Aminobutyric Acid Receptor</i>)
GlyR	Receptor de glicina (<i>Glycine Receptor</i>)
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G (<i>G Protein Coupled Receptor</i>)
h	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
H ₂ O	Agua
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-etanosulfónico (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
i.e.	Es decir (<i>id est</i>)
IUPHAR	Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (<i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>)
K ⁺	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltons
K _v	Canal de potasio dependiente de voltaje
m	Ratón (<i>Mus musculus</i>)
M	Molar
m/z	Relación masa/carga
MALDI	Desorción-Ionización Láser Asistida por Matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization</i>)
mA	Miliunidades de absorbancia
mda	Millones de años
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
ms	Milisegundos
N-terminal	Extremo amino terminal
nA	Nanoamperio
Na ⁺	Ion sodio
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina (<i>Nicotinic Acetylcholine Receptor</i>)
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na _v	Canal de sodio dependiente de voltaje

nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
°C	Grado Celsius
PDI	Proteína Disulfuro Isomerasa
PITC	Fenilisotiocianato (<i>Phenylisothiocyanate</i>)
r	Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time Of Flying</i>)
W	Triptófano
Y	Tirosina
Z	Piroglutamato
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
ε	Epsilon
θ	Theta
λ	Lamba; Longitud de onda
μ	Mu
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ψ	Psi

Resumen

Los caracoles marinos del género *Conus* (Mollusca: Gastropoda) son un grupo de animales muy estudiados por la toxinología, ya que sus toxinas (denominadas conotoxinas) poseen un potencial biotecnológico notable debido a que interactúan con una alta afinidad y selectividad con su blanco molecular.

Entre los blancos moleculares de las conotoxinas destacan los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), los cuales son canales iónicos activados por ligando y se encuentran localizados en la membrana celular de las neuronas colinérgicas, así como en la unión neuromuscular y en algunas células no excitables. Estos receptores llevan a cabo una gran variedad de procesos fisiológicos.

Conus archon es una especie que se encuentra distribuida desde el Golfo de California, México hasta el Golfo de Guayaquil, Ecuador. Estudios previos mencionan que en el veneno de esta especie pudieran existir hasta 8 conotoxinas con efecto sobre los nAChR. Hasta la fecha solamente se ha descrito una conotoxina de esta especie: ArchIIIA.

El presente trabajo estudió cuatro fracciones hidrofílicas provenientes del veneno de *C. archon* con el objetivo de encontrar otras conotoxinas moduladoras de los nAChR que puedan fungir como herramientas biotecnológicas y/o terapéuticas. Particularmente, se buscaron aquellos componentes que poseían características similares a las conotoxinas $\alpha 4/3$. Se logró identificar un componente (Fracción 7) que posee actividad inhibitoria sobre el subtipo de nAChR $\alpha 7$, por lo que se procedió a purificar y caracterizar a la Fracción 7. Funcionalmente se determinó que existe una interacción entre el receptor $\alpha 7$ y la Fracción 7 (IC_{50} : 32.7 μM), dicha interacción fue selectiva respecto a los subtipos $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta \epsilon$ y $\alpha 3\beta 2$.

Respecto a su caracterización bioquímica, se determinó la presencia de un componente con un peso de 3445.04 Da en la Fracción 7 al cual se intentó obtener su estructura primaria. Sin embargo, ésta no pudo ser obtenida ya que el extremo amino terminal del péptido se encuentra bloqueado.

Este trabajo amplió el estudio toxinológico de *C. archon* y los resultados obtenidos describen a un antagonista del receptor $\alpha 7$, por lo que en futuros estudios se espera completar su caracterización bioquímica así como su evaluación frente a diversos blancos a fin de detallar la selectividad de la Fracción 7.

Palabras clave: *Conus archon*, conotoxina, veneno, receptor nicotínico de acetilcolina, hidrofiliidad, electrofisiología, vermívoro.

1 Introducción

El océano alberga a una amplia variedad de seres vivos, desde bacterias y algas hasta plantas y animales. Esta biodiversidad marina ha sido aprovechada con distintos fines tales como la obtención de alimentos [1], recursos genéticos [2] o productos naturales [3]; estos últimos se refieren a las moléculas sintetizadas y secretadas por un organismo.

Los productos naturales desempeñan una actividad biológica crucial en la supervivencia de los organismos al facilitar ya sea la interacción con el ambiente o con otros seres vivos. Durante décadas se ha aprovechado el potencial biotecnológico de los productos naturales en aplicaciones que van desde el aislamiento de enzimas industriales hasta la producción de fármacos [4, 5].

Según lo reportado por Ramasamy, S. y colaboradores en 2019 [6], se han aislado y caracterizado más de 30,000 productos naturales de origen marino de los que se han obtenido más de 400 patentes. La prospección de organismos marinos con el fin de aislar moléculas bioactivas se ha vuelto un campo de investigación muy amplio y entre los productos naturales de mayor interés biotecnológico encontramos a los venenos y las toxinas.

Los venenos son sustancias producidas por algunos organismos. Éstas tienen la capacidad de dañar o matar a otros seres vivos con fines de depredación o de defensa [7, 8]; es importante distinguirlos de las ponzoñas, que también son sustancias tóxicas, pero los organismos ponzoñosos las adquieren del ambiente y las almacenan [9]. Evolutivamente, los venenos están seleccionados para contener un arsenal de compuestos, conocidos como toxinas [10]. Cada toxina interactúa con una estructura celular específica de la presa, alterando su fisiología (e.g. receptores, canales, fosfolípidos de membrana, etc.) y a esta estructura objetivo se denomina blanco molecular [11].

La toxínología adquirió bastante relevancia a partir de la década de 1980 con la aprobación del fármaco llamado Captopril realizada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) [12]. Este fármaco antihipertensivo, cuyo compuesto activo es un factor potenciador de bradicinina diseñado a partir de un péptido aislado del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* [13], constituye el primer fármaco derivado de una toxina y ha desencadenado líneas de investigación en el campo de venenos con el objetivo de descubrir nuevas toxinas bioactivas en diferentes blancos moleculares de interés biomédico.

Entre los organismos valiosos para la toxínología destacan los caracoles marinos del género *Conus*, debido a que sus toxinas, denominadas conotoxinas, reúnen varias características (discutidas en secciones posteriores) que las convierten en moléculas

atractivas para la farmacología. En 2004, se aprobó el uso de la Ziconotida (Prialt®), un analgésico cuyo compuesto activo es una conotoxina sintética idéntica a un componente presente en el veneno de *Conus magus* [14]. Actualmente, la búsqueda de componentes activos en los venenos de *Conus* continúa siendo una línea de investigación ampliamente establecida en todo el mundo.

2 Antecedentes.

2.1 Phylum Mollusca

Los moluscos constituyen al segundo phylum animal con mayor cantidad de especies entre los metazoarios, ya que se han descrito alrededor de 130,000 especies vivientes y se tiene registro de otras 70,000 especies fósiles [15]. De acuerdo con su plan corporal, los moluscos son animales protostomados celomados (aunque su celoma está restringido a ciertos órganos) y poseen simetría bilateral [16].

Anatómicamente su cuerpo se puede dividir en tres regiones [17, 18]: 1) una región cefálica que posee estructuras sensoriales, 2) un pie muscular utilizado para la locomoción, anclaje al sustrato o una combinación de ambos y 3) una masa visceral que se encuentra rodeada por un epitelio grueso denominado manto y conforma la mayor parte de su cuerpo, albergando estructuras tales como la rádula, glándulas, branquias, etc.

Actualmente se reconocen ocho clases dentro del phylum Mollusca [19], las cuales son: Solenogastres, Caudofoveata (estas dos primeras tradicionalmente agrupadas como Aplacophora), Monoplacophora, Polyplacophora, Scaphopoda, Cephalopoda, Bivalvia y Gastropoda. Cada una de estas clases cuenta con sinapomorfías que las distinguen del resto (**Figura 1**).

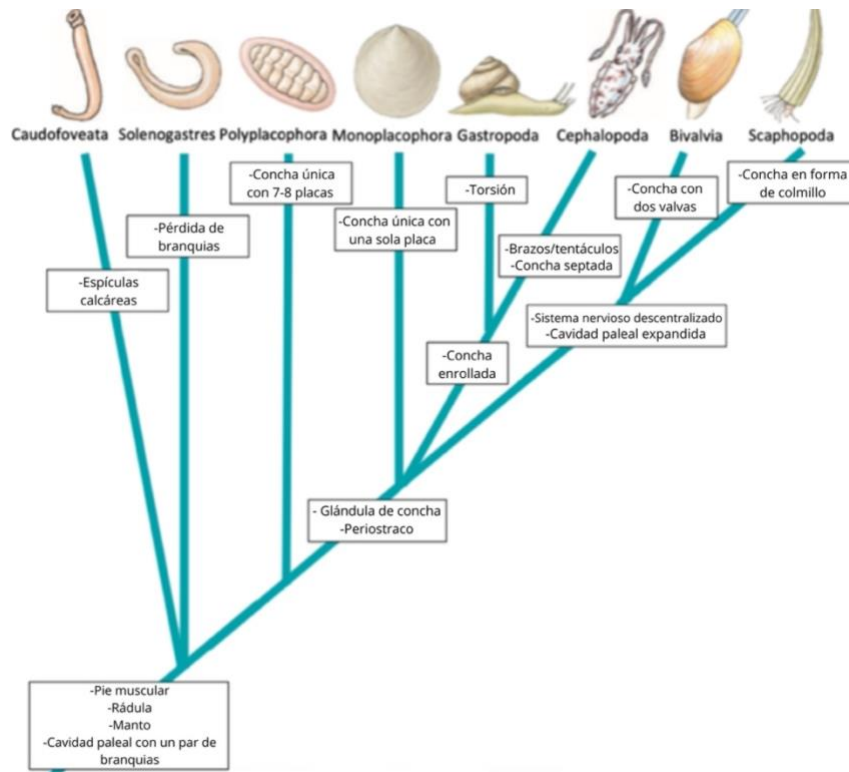


Figura 1. Cladograma y sinapomorfías de las clases del phylum Mollusca. Se muestran las características presentes en todas las clases y que son representativas del phylum Mollusca: el manto, el pie muscular, la rádula, etc; así como las sinapomorfías particulares de cada una de las 8 clases. Modificada de: Hickman, P. *et al.* en 2007 [17].

Los moluscos en su mayoría son organismos marinos y se distribuyen a lo largo de todo el planeta, habitando tanto zonas costeras como aguas someras y profundas. Se pueden encontrar en sustratos como rocas, arena de playa, arrecifes de coral o arena del fondo (especies bentónicas) [20, 21]; también se encuentran en la columna de agua como organismos nadadores (especies nectónicas) o en suspensión (especies planctónicas) [22]. Incluso hay especies de las clases Gastropoda y Bivalvia que habitan ambientes dulceacuícolas.

Uno de los aspectos que ha permitido a los moluscos colonizar esta gran variedad de hábitats es el poseer numerosas estrategias de alimentación, ya que podemos encontrar moluscos suspensívoros, detritívoros, herbívoros y carnívoros [23]. Esta variedad de hábitos alimenticios promueve la síntesis y/o almacenamiento de una gran cantidad de productos naturales [24], tanto metabolitos primarios (e.g. péptidos) como metabolitos secundarios (e.g. terpenos, alcaloides, policétidos, etc.); estos componentes les permiten a los moluscos obtener su alimento o bien defenderse de depredadores [25].

Los componentes bioactivos (productos naturales) de los moluscos han sido explotados por los seres humanos para diversos fines; los reportes recientes [6]

señalan que se han aislado más de 1,145 productos naturales con actividad biológica (incluidos 3 fármacos aprobados por la FDA) provenientes de 270 especies de moluscos, lo que representa alrededor del 0.2 % de las especies totales [15]. En otras palabras, aún no se han explorado los productos naturales provenientes del 99.8% de las especies de moluscos actuales.

De las ocho clases que componen al phylum Mollusca, la clase Gastropoda es en la que se han aislado la mayor cantidad de productos naturales y en la que se centrará el presente trabajo.

2.1.1 Clase Gastropoda

Dentro del phylum Mollusca, la clase Gastropoda posee la mayor cantidad de especies, con más de 70,000 especies registradas (>50% de las especies totales de moluscos) según Brown & Lydeard en 2010 [26]; e incluye a las babosas, nudibranquios, lapas y caracoles. Esta clase a su vez, se divide en tres subclases [27]: Prosobranchia, Opisthobranchia y Pulmonata.

En la subclase Prosobranchia (que engloba a la mayoría de los caracoles marinos) destaca el proceso de torsión [17, 27], un proceso ontogenético en el que la cavidad paleal y la masa visceral giran 180° hacia la parte anterior del organismo [28]. Esto permite tener un espacio en el que la cabeza se retraiga para protección contra depredadores y facilita la entrada de agua hacia las branquias, orientándolas en la dirección de la corriente oceánica [29].

Los prosobranquios se clasifican en cuatro órdenes [27]: Archaeogastropoda, Mesogastropoda, Heterogastropoda y Neogastropoda. Los caracoles *Conus* pertenecen a este último orden.

2.1.2 Orden Neogastropoda

Forma un grupo monofilético y es considerado como el grupo más reciente evolutivamente hablando dentro de la clase Gastropoda. En general, son animales operculados, dioicos y llevan a cabo la fertilización interna [30], anatómicamente presentan un ganglio sifonal, un anillo nervioso posterior a la cavidad oral y varias glándulas tales como: anal, pediosa, salivares y de Leiblein [31, 32].

2.1.3 Familia Conidae

Los caracoles pertenecientes a esta familia presentan cuatro características notables [32-34]:

- Una glándula de Leiblein modificada, denominada ahora bulbo venenoso debido a que adquiere capacidad contráctil.

- Una estructura tubular especializada en la síntesis de veneno, denominada conducto venenoso, el cual sale del bulbo venenoso y desemboca en la rádula.
- La rádula se encuentra modificada en forma de arpón.
- Una concha elongada en forma cónica de la que se deriva el nombre de la familia.

Debido a las dificultades taxonómicas para clasificar a los cónidos en géneros considerando su morfología, existen varias propuestas sobre los linajes de esta familia. Una de las filogenias más aceptadas fue publicada por Pulliandre, N. y colaboradores [35] en la que, basándose en caracteres moleculares, dividen a la familia en cuatro géneros: *Conasprella*, *Californiconus*, *Profundiconus* y *Conus*. No obstante, un estudio filogenético más reciente [36] basado en DNA mitocondrial propone añadir dos géneros más: *Lilliconus* y *Pseudolilliconus* a los cuatro mencionados previamente. El género *Conus* representa el grupo más diverso y es el más estudiado toxinológicamente.

2.1.4 Género *Conus*

Constituye al género más numeroso de todos los invertebrados marinos, contando con 761 especies reconocidas [35]. Si bien alrededor del 60% de éstas se distribuye en la región Indo-Pacífica, también pueden encontrarse en todos los océanos tropicales y subtropicales [37].

Se piensa que las poblaciones actuales de *Conus* descienden de dos linajes, uno de ellos proveniente de la región Indo-Pacífica y el otro de la región Atlántica-Pacífica oriental; la divergencia entre ambos linajes está datada aproximadamente hace 33 millones de años y se tienen registro de al menos cuatro eventos migratorios entre ambos clados [38].

El aparato venenoso encontrado en los *Conus* se ilustra en la **Figura 2** y es muy similar en todos los clados que conforman a la familia Conidae [39] y este aparato es una de las razones por las que estos caracoles pueden llevar una dieta carnívora.

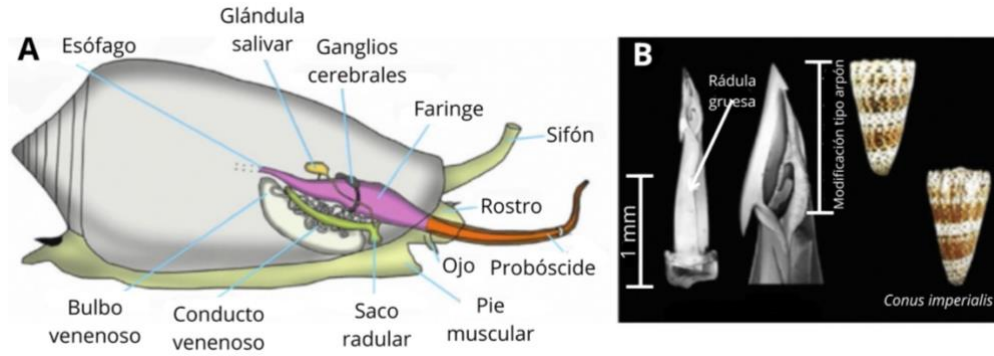


Figura 2. Anatomía del aparato venenoso de *Conus*. Se muestra: **(A)** un esquema general de los componentes del aparato venenoso de *Conus* el cual consta del bulbo venenoso, el conducto venenoso, el saco radular y la probóscide, entre otras estructuras. **(B)** una micrografía electrónica de la rádula tipo arpón corta y gruesa típica de los depredadores vermívoros, la micrografía fue tomada de la especie *Conus imperialis*.

Modificado de: Dutertre, S. *et al.* 2016 [40]

La síntesis y maduración de los péptidos que conforman al veneno se lleva a cabo en el epitelio del conducto venenoso, para luego ser depositados en el lumen de éste. En el lumen, los péptidos son impulsados mediante contracciones del bulbo venenoso hasta la rádula tipo arpón y cuando el sifón (estructura sensorial) detecta a la presa, la rádula se dispara para penetrar el tejido de la presa (o depredador) e inyecta el veneno [40].

Otras estructuras importantes son el saco radular, que es el encargado de formar la rádula; las glándulas salivales, que son encargadas de secretar polisacáridos y otras proteínas al lumen del conducto venenoso; y la probóscide, un órgano extensible que dirige la rádula hacia la presa [40].

Una de las maneras más útiles de clasificar a los caracoles *Conus* es en base a su alimentación, distinguiéndolos en [33]: piscívoros, molusquívoros y vermívoros. Estos últimos no sólo constituyen al grupo más abundante en número de especies sino también al primer grupo en surgir, mientras que los piscívoros y molusquívoros aparecieron hace unos 23 millones de años [41]. Dutertre, S. y colaboradores en 2014 [42] sugirieron que esta diversificación es el resultado de la reconversión de toxinas originalmente empleadas por las especies vermívoras en defensa contra depredadores cefalópodos o peces.

2.1.5 *Conus archon*

Esta especie de *Conus* fue descrita por primera vez en 1833 por el naturalista inglés William Broderip. Pertenece al subgénero *Stephanoconus* y al igual que las especies de éste, su alimentación es vermívora consistiendo en anélidos poliquetos, particularmente anfinómidos.

La especie *Conus archon* habita la zona nerítica y su distribución abarca la costa este del Pacífico, desde Baja California en México hasta el Golfo de Guayaquil en Ecuador (**Figura 3**); generalmente esta especie es somera (10 metros de profundidad), aunque se han encontrado ejemplares en profundidades cercanas a los 400 metros [43].



Figura 3. Distribución de *Conus archon*. Su distribución (línea naranja) abarca gran parte de la costa este del Pacífico, extendiéndose desde el Golfo de California en México hasta el Golfo de Guayaquil en Ecuador. Mapa obtenido de Google maps y modificado en base a: Tenorio 2013 [43].

Los ejemplares de *C. archon* se distinguen morfológicamente en base a su patrón de coloración (**Figura 4**), el cual consta de manchas en forma de flama de color pardo-naranja. Los ejemplares adultos pueden llegar a medir excepcionalmente 10 cm [43]. Una dificultad en la identificación de esta especie, es su similitud con *Conus cedonulli*, lo que ha llevado a confundir ejemplares entre ambas especies [44].

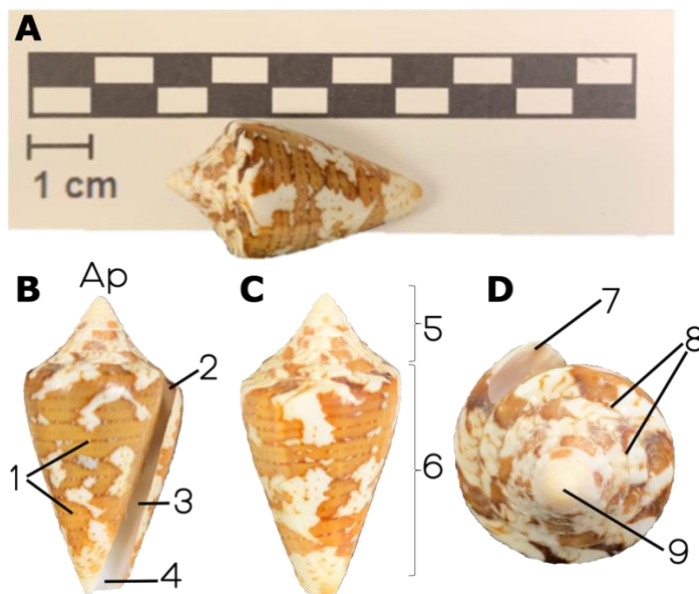


Figura 4. Concha de un ejemplar de *Conus archon*. Se muestra la morfología de la concha de *C. archon*. **(A)** Vista dorsal en la que se aprecia su longitud (4.5 cm aprox.). **(B)** Vista ventral, **(C)** vista dorsal y **(D)** vista superior de la concha. Simbología: 1: Costillas, 2: Muesca anal, 3: Apertura, 4: Canal del sifón, 5: Espira, 6: Última vuelta, 7: Labio interno, 8: Suturas, 9: Protoconcha; Ap: Ápice. Fotografía de elaboración propia.

2.2 Composición del veneno de *Conus*

El veneno de estos organismos se compone de una mezcla de varios péptidos denominados como conopéptidos o conotoxinas, los cuales pueden separarse individualmente mediante técnicas cromatográficas y se estima que cada especie de *Conus* produce entre 50-200 compuestos distintos [45].

Se ha demostrado que esta variedad de péptidos es generada mediante duplicación génica, en la que un gen que origina un péptido se duplica y una de esas copias adquiere una nueva función que permite al organismo sobrevivir a diferentes presiones ambientales [46] como pueden ser depredadores, competencia, hábitos alimenticios y factores biogeográficos.

2.2.1 Estructura de las conotoxinas

Las conotoxinas son traducidas a partir de mRNA como precursores o toxinas inmaduras y constan de tres regiones: una región “pre” localizada en el extremo amino terminal, una región “pro” y el péptido maduro cercano al extremo carboxilo terminal [47].

La región “pre” consta de aproximadamente 20 aminoácidos, en su mayoría hidrofóbicos, altamente conservados entre las conotoxinas ya que esta región corresponde al péptido señal [48].

La región “pro” es más variable que la región “pre” pero más conservada que la región del péptido maduro y su función es promover el plegamiento de la toxina ya que se ha observado que el plegamiento es más eficiente en la región del propéptido que en la región del péptido maduro [49].

Finalmente, durante su proceso de maduración, la región “pre” y la región “pro” son escindidas quedando únicamente un péptido de entre 10 y 40 aminoácidos de longitud correspondiente a la toxina madura, la cual constituye una región hipervariable en su secuencia de aminoácidos [50]. No obstante, dentro de la hipervariabilidad de la región del péptido maduro, se mantiene conservada la presencia de cisteínas [5] (**Figura 5**). Estos aminoácidos cuentan con un grupo sulfhidrilo o tiol en su cadena lateral que puede enlazarse con otro grupo igual presente en otra cisteína del péptido, formando un enlace covalente conocido como puente disulfuro [51]. Estos puentes disulfuro son responsables de formar la estructura terciaria del péptido confiriéndole estabilidad y otorgándole su actividad biológica [52].

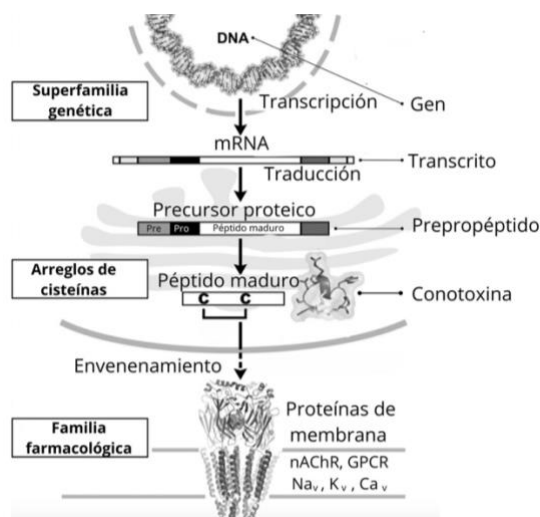


Figura 5. Proceso de síntesis y secreción de las conotoxinas. Se observa la ruta que siguen las conotoxinas desde que son transcritas a partir de un gen presente en su DNA, la traducción de mRNA a un precursor proteico con tres regiones: “pre”, “pro” y “péptido maduro”; posteriormente la escisión de las regiones “pre” y “pro” y la secreción del péptido maduro ahora como una toxina plegada para llevar a cabo una función en el envenenamiento. Modificado de Kaas, Q. *et al.* en 2010 [53]

Entre los componentes del veneno de *Conus*, algunos autores suelen denominar como conotoxinas a aquellos componentes ricos en cisteínas, mientras que aquellos componentes con pocas (o nulas) cisteínas se les denomina como conopéptidos. Sin embargo, dado que ambos tipos de moléculas son sintetizadas en el conducto venenoso y filogenéticamente no hay diferencias relevantes [35], en este trabajo se utilizarán ambos términos de manera indistinta.

Otro aspecto estructural importante para las conotoxinas son las modificaciones post-traduccionales. Además de la formación de puentes disulfuro mencionada previamente, otras modificaciones comunes incluyen la amidación del extremo carboxilo, hidroxilación de prolina y lisina, γ -carboxilación de glutamato, O-glicosilación de treonina y serina, sulfatación de tirosina, ciclación de glutamato amino terminal, entre otras [54]; todas estas modificaciones son relevantes en la actividad biológica de las toxinas.

2.2.2 Interacción con su blanco molecular

La hipervariabilidad dentro de la secuencia de aminoácidos de las conotoxinas les otorga a éstas, una gran variedad de blancos moleculares, entre los más notables encontramos: los receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés), canales iónicos activados por ligando (también llamado receptores ionotrópicos) y canales iónicos activados por voltaje [55]. Esta interacción comúnmente es selectiva, de modo que la secuencia de cada toxina madura presenta una afinidad por algún subtipo de receptor o canal iónico.

La afinidad se cuantifica mediante el parámetro conocido como concentración inhibitoria media (IC_{50}), el cual indica la concentración de toxina necesaria para inhibir el 50% de la actividad sobre su blanco; generalmente la IC_{50} de las conotoxinas suele estar en el orden nanomolar aunque raramente también han sido reportadas en el orden micromolar y picomolar.

Los aminoácidos de las regiones intercisteínas se pliegan y forman asas mediante las cuales interactúan con una secuencia particular (denominada farmacóforo) [56] del blanco, provocando que la actividad de éste disminuya (antagonistas) o bien que se incremente (agonistas) [57]. Los mecanismos de inhibición o potenciación de las conotoxinas son variados.

En el caso de las conotoxinas que interactúan con los canales iónicos activados por voltaje, se han descrito cuatro mecanismos de interacción con su farmacóforo: por un lado pueden antagonizar estos canales interfiriendo el poro iónico (impidiendo el flujo de iones) o bien interactuando con el dominio sensor de voltaje previniendo su activación; por otro lado, las conotoxinas agonistas interactúan con el dominio sensor de voltaje provocando la activación del canal o bien impidiendo su inactivación [58].

Mientras que las conotoxinas que modulan canales iónicos activados por ligando, pueden interactuar como antagonistas competitivos [59], es decir, uniéndose al mismo sitio de unión de ligando en el receptor, o bien como antagonistas no competitivos (también llamados alostéricos) si su unión al receptor es en una región distinta al sitio de unión de ligando [60]. Si bien las conotoxinas antagonistas de receptores ionotrópicos son más comunes, Mueller A. y colaboradores en 2015 [61] caracterizaron un péptido agonista alostérico de un subtipo de receptor nicotínico de acetilcolina procedente de la especie *C. marmoreus*.

A manera de resumen, podemos destacar que las conotoxinas son moléculas cortas, estructuralmente estables y que pueden interactuar con una gran variedad de blancos moleculares, características que las posicionan como péptidos con gran potencial biotecnológico.

2.2.3 Clasificación de las conotoxinas

Existen tres formas distintas de clasificar a las conotoxinas:

- Superfamilias genéticas: basadas en la similitud del péptido señal de los pre-propéptidos. Se reconocen 30 superfamilias, las cuales se denotan con letras mayúsculas: 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 una nombrada como conodipina [47].
- Arreglos de cisteínas: según la cantidad de cisteínas que conforman a la toxina madura y los espaciamentos entre ellas. Podemos distinguir 25 patrones, denotados con números romanos: I-XXV [5].
- Familias farmacológicas: agrupa a las conotoxinas en función de su blanco molecular [55]. Estas familias se nombran con letras griegas y se reconocen 14: α , γ , δ , ϵ , ι , κ , μ , ρ , σ , τ , ϕ , χ , ψ , ω .

Habitualmente, se combinan estas tres clasificaciones para nombrar de manera más precisa a las conotoxinas (**Figura 6**).

Si se conoce el blanco molecular:



Si no se conoce el blanco molecular:



Simbología

- Familia farmacológica
- Especie de la que se aisló
- Arreglo de cisteínas
- Orden de descubrimiento

Figura 7. Nomenclatura de las conotoxinas. Se muestra el sistema de nomenclatura según las normas de la IUPHAR. Este sistema indica la familia farmacológica, la especie de procedencia y el arreglo de cisteínas de las conotoxinas. Figura de elaboración propia.

2.3 Receptores nicotínicos de acetilcolina

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR, por sus siglas en inglés) son proteínas transmembranales que conducen la corriente iónica en presencia de su ligando, la acetilcolina [63]. Dado que la acetilcolina es un neurotransmisor, no es de extrañarse que estos receptores se localicen en ciertas neuronas, formando un subsistema dentro del sistema nervioso (SN) conocido como sistema colinérgico [64] que abarca tanto el sistema nervioso central (SNC) como el sistema nervioso periférico (SNP). Sin embargo, estos receptores también se distribuyen en la placa neuromuscular [65] y en algunas células no excitables [66].

2.3.1 Estructura

Los nAChR constan de cinco subunidades proteicas (*i.e.* son pentámeros) dispuestas en forma circular formando un poro de membrana por el que se permite el flujo de cationes; en ausencia de la acetilcolina. Las cinco subunidades se juntan cerrando el poro y es hasta que el receptor detecta a su ligando que las subunidades se separan y el poro se abre para permitir el flujo iónico [67].

Existen 17 subunidades distintas que pueden interactuar para ensamblar distintos receptores nicotínicos: α (1-10), β (1-4), γ , ϵ y δ [68]. A partir de estas combinaciones podemos distinguir dos tipos de nAChR:

- Musculares: restringidos a la placa neuromuscular y en los que a su vez podemos distinguir los subtipos fetal y adulto. El primero se expresa durante los estadios tempranos de desarrollo y consta de la combinación específica de subunidades $(\alpha 1)_2\beta 1\delta \gamma$ (también llamado nAChR muscular fetal). A medida que el desarrollo del individuo avanza, la subunidad γ se reemplaza por la subunidad ϵ para conformar el subtipo $(\alpha 1)_2\beta 1\delta \epsilon$ o también conocido como nAChR muscular adulto. Este cambio de subunidades ocurre en la semana 31 prenatal en humano y en la semana 2 postnatal en rata [69].

- **Neuronales:** estos receptores se expresan tanto en la terminal presináptica como postsináptica de las neuronas colinérgicas y se ensamblan a partir de combinaciones de las subunidades $\alpha(2-10)$ y $\beta(2-4)$. Se distinguen varios subtipos que pueden ser agrupados como homoméricos cuando se conforman de cinco repeticiones de la misma subunidad (e.g. $\alpha 7$ y $\alpha 9$) o heteroméricos cuando combinan distintas subunidades (e.g. $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 5\alpha 6\beta 2$, $\alpha 9\alpha 10$, entre otros), estos subtipos se distribuyen en varias regiones tanto del SNC como del SNP [70].

Cada una de las subunidades de los nAChR consta de 450-700 aminoácidos repartidos en tres dominios: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (**Figura 8**). La parte extracelular del receptor, en la que se encuentra el extremo amino, se constituye por aminoácidos hidrofílicos dispuestos en láminas β ; la porción transmembrana por su parte, consta de cuatro segmentos (nombrados como M1-M4) hidrofóbicos en configuración α -helicoidal con una longitud aproximada de 20 aminoácidos cada uno y por último, la porción intracelular consta de aminoácidos hidrofílicos dispuestos en α -hélices [71, 72].

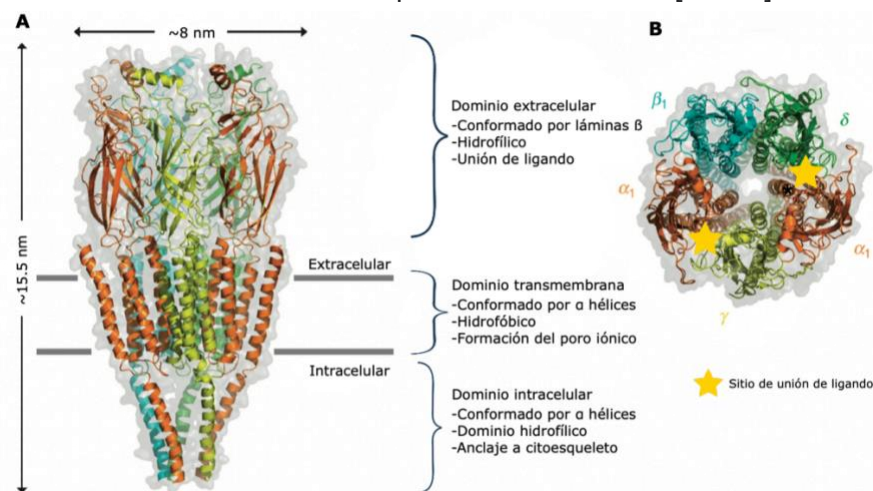


Figura 8. Estructura representativa de un receptor nicotínico de acetilcolina. (A) Vista lateral en la que son apreciables sus 3 dominios (extracelular, transmembrana e intracelular) así como las características principales de cada uno. **(B)** Vista superior que indica la distribución de subunidades en el subtipo $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$ y los sitios de unión del ligando. Modificada de: Changeux, J. & Paas 2009 [72].

La unión de la acetilcolina al nAChR ocurre en la región extracelular, particularmente en la interfaz localizada entre una subunidad α y la subunidad adyacente. El sitio de unión está integrado por 3 asas procedentes de la subunidad α (nombradas como asa o “loop” A-C) y dos procedentes de la otra subunidad (nombradas como D-E) [73].

Una estructura importante que se debe mencionar en este punto es la conocida como asa de cisteína (“*cys-loop*”, en inglés); esta es una asa formada por un enlace disulfuro entre dos láminas β localizadas en la región extracelular de las subunidades α . Se ha observado que es necesaria para estabilizar el sitio de unión de ligando y para que las subunidades se ensamblen de manera adecuada [74].

El asa de cisteína es una estructura muy conservada evolutivamente, de modo que no solo está presente en los nAChR, sino también en otros canales iónicos activados por ligando e.g. los receptores activados por ácido γ -aminobutírico (GABAR, por sus siglas en inglés), serotonina (5-HTR), glicina (GlyR), entre otros [75].

En los nAChR los segmentos M2 del dominio transmembranal de cada subunidad delimitan al poro iónico, de modo que los aminoácidos de este segmento le confieren la selectividad por los iones transportados a través este receptor (entrada de Na^+ , Ca^{2+} y salida de K^+). En ausencia de su ligando, estos segmentos se encuentran inclinados obstruyendo el poro y cuando la acetilcolina se acopla a su sitio de unión en el receptor, los segmentos M2 se retraen y permiten la apertura del canal [76].

2.3.2 Aspectos fisiológicos relevantes

Los nAChR se encuentran en muchos phyla de metazoos, desde anélidos hasta vertebrados y son encargados de muchos procesos fisiológicos, algunos muy especializados.

Los nAChR son fisiológicamente relevantes desde el desarrollo embrionario, ya que el subtipo $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$ juega un papel crucial en la maduración de las fibras musculares al atraer axones del SNP y permitir la correcta innervación de las fibras musculares; este mismo proceso es el detonante de la transición de γ a ϵ [77].

Los nAChR musculares son encargados de iniciar el proceso de contracción muscular; este ocurre cuando la acetilcolina procedente de las motoneuronas (neuronas que inervan al músculo) activa a estos receptores y provoca la entrada de Na^+ y Ca^{2+} al interior de la fibra muscular y ocurre una consecuente despolarización de la membrana [67]. Este cambio en el potencial de membrana activa un canal iónico de calcio dependiente de voltaje, aumentando la concentración intracelular de este ion; posteriormente el calcio se une a los filamentos de miosina y origina su contracción a lo largo de toda la fibra muscular [78].

Entre los receptores neuronales, uno de los más relevantes fisiológicamente es el homomérico $\alpha 7$, el cual se encuentra presente en varias regiones del SNC entre las que destacan el hipocampo, la corteza y las regiones límbicas subcorticales, estando implicado en procesos relacionados a estas áreas del cerebro tales como la cognición, el procesamiento sensorial, la atención, la memoria, entre otras [79]. Este receptor es altamente permeable a Ca^{2+} por lo que también está implicado en la liberación de otros neurotransmisores tales como glutamato o dopamina. Este subtipo particularmente también está presente en tejidos extraneuronales como el sistema respiratorio e inmune [64].

Además del subtipo $\alpha 7$, otros subtipos neuronales importantes de mencionar para el presente trabajo son el $\alpha 3\beta 2$, ya que éste está implicado en la liberación de dopamina en el SNC [68]; y aquellos conformados por subunidades $\alpha 9$ como el homomérico $\alpha 9$ y el heteromérico $\alpha 9\alpha 10$, cuya función presuntamente es la de transducir los estímulos mecanosensitivos y el procesar la información sensorial [80]. Sin embargo, el papel fisiológico de estos subtipos aún no se ha dilucidado por completo.

2.3.3 Origen evolutivo de los nAChR

Filogenéticamente hablando, Tsunoyama, K. & Gojobori en 1998 [81] construyeron una filogenia de los nAChR utilizando el método *Neighbor-Joining* en la que encontraron que las subunidades $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 8$, $\alpha 7$ son las más primitivas y a partir de estas se derivaron el resto de subunidades ($\alpha 1-6$, $\beta 1-4$, γ , ϵ y δ). Algunos autores han sugerido que esta diversidad en las subunidades pudo originarse mediante duplicación génica [82]; sin embargo la evolución de los nAChR ocurre de manera linaje-dependiente, por lo que otros mecanismos pueden estar implicados dependiendo el grupo de organismos que esten siendo estudiados.

2.4 Conotoxinas con efecto sobre los nAChR

Al día de hoy se tiene registro de muchas conotoxinas cuyo blanco molecular son los receptores nicotínicos de acetilcolina. A continuación, se describen algunas clases de conotoxinas con efecto en estos receptores.

2.4.1 α -conotoxinas

Estructuralmente podemos definir a esta familia farmacológica de toxinas, por su corta secuencia de aminoácidos (12-19 aminoácidos), su hidrofiliidad y la presencia de cuatro cisteínas: dos consecutivas y las otras dos separadas mediante una secuencia de aminoácidos distintos (de la forma: $\text{CC-X}_m\text{-C-X}_n\text{-C}$ en donde X_m y X_n son secuencias de aminoácidos diferentes a las cisteínas), es decir, presentan el arreglo de cisteínas tipo I [59].

La mayoría de las α -conotoxinas descritas provienen de *Conus* piscívoros; sin embargo, las especies molusquívoras y vermívoras han tomado protagonismo en los últimos años y se han descrito varias α -conotoxinas en estas especies [83].

2.4.1.1 Subfamilia $\alpha 3/5$

Las conotoxinas pertenecientes a esta subfamilia se caracterizan por antagonizar de manera selectiva a los nAChR musculares [84]. Este tipo de péptidos se encuentran limitados a las especies piscívoras de *Conus* (e.g. *C. geographus*, *C. purpurascens*, *C. achatinus*, etc.) por lo que aparentemente son el resultado de una especialización evolutiva [85].

Como ejemplos representativos de esta subfamilia podemos mencionar las conotoxinas GI [86], MI [87], CnIA [88] y SI [89].

2.4.1.2 Subfamilia $\alpha 4/7$

Es la subfamilia de α -conotoxinas más extendida entre los *Conus* puesto que se han aislado conotoxinas de esta subfamilia en especies de los tres tipos de alimentación [84]. Se caracterizan por antagonizar a una amplia gama de nAChR neuronales, tanto homoméricos como heteroméricos [90].

Como ejemplos de esta subfamilia podemos mencionar a GID [91], SrlA [92], LvIA [93] y MrIC [61].

2.4.1.3 Subfamilia $\alpha 4/3$

Este tipo de conotoxinas son características de los caracoles vermívoros pertenecientes al subgénero *Stephanoconus*. Las conotoxinas de la subfamilia $\alpha 4/3$ presentan dos características principales: funcionalmente, antagonizan a los receptores conformados únicamente por subunidades α (como los homoméricos $\alpha 7$ y $\alpha 9$ o el heteromérico $\alpha 9\alpha 10$) y estructuralmente cuentan con la presencia de residuos aromáticos en su segunda asa intercisteína [94].

Las especies pertenecientes a este subgénero (e.g. *C. imperialis*, *C. regius*, *C. cedonulli*, *C. archon*) son depredadores de gusanos del orden Amphinomida (Annelida: Polychaeta), animales filogenéticamente antiguos, al igual que las subunidades blanco de esta subfamilia [85].

De esta subfamilia solamente se han caracterizado tres conotoxinas: ImI [95], ImII [96] y RglA [97].

2.4.2 Otros tipos de conotoxinas

Además de las α -conotoxinas (con arreglo de cisteínas tipo I), existen otros péptidos con arreglos de cisteínas variados que también tienen efecto sobre los receptores nicotínicos. Podemos encontrar conotoxinas moduladoras de nAChR con arreglo de cisteínas distinto al I en las superfamilias A, B, C, D, J, M, S, O, entre otras [83]. En este caso, estas toxinas se nombran como αA , αB , αC , αD , etc.

Este tipo de conotoxinas se caracterizan por tener una longitud mayor en su secuencia de aminoácidos y es acompañado por un incremento tanto en el número de cisteínas como de puentes disulfuro.

2.5 El veneno de *Conus archon*

Pese a que se describió hace más de 180 años, en la actualidad únicamente se tiene un estudio toxinológico de *Conus archon*. Este estudio fue realizado por Hernández-Sámano A. y colaboradores en 2022 [98] y consistió en la evaluación de cinco fracciones del veneno de esta especie sobre el receptor nicotínico humano $\alpha 7$, de las cuales solamente una fracción mostró un efecto inhibitorio del 44% a una concentración de 36 μM . Esta fracción no tuvo efecto sobre el subtipo $\alpha 3\beta 2$ (humano) y tuvo un efecto inhibitorio menor al 20% en un subtipo heteromérico $\alpha 7\beta 2$; indicando cierta selectividad de esta toxina por la subunidad $\alpha 7$.

Este péptido corresponde a la superfamilia M y al arreglo de cisteínas tipo III por lo que fue nombrado como ArchIIIA. La IC_{50} de ArchIIIA fue reportada en 45.7 μM para el subtipo $h\alpha 7$. Ahondando en su caracterización bioquímica, ArchIIIA es un péptido de 15 residuos de aminoácidos y posee un peso molecular de 1654 Da [98].

En una revisión de las α -conotoxinas encontradas en el clado *Stephanoconus*, Ellison M. & Olivera 2007 [94] estimaron que en el veneno de esta especie existen 8 conotoxinas pertenecientes a esta familia y 3 conotoxinas pertenecientes a la subfamilia $\alpha 4/3$. Hasta la fecha no se ha indentificado a ninguna de estas conotoxinas.

3 Justificación

Las toxinas que conforman al veneno de los caracoles del género *Conus* reflejan aspectos ecológicos, bioquímicos y fisiológicos relevantes en la biología de estos organismos; asimismo el caracterizar a estas moléculas, nos permite encontrar posibles aplicaciones biotecnológicas, terapéuticas o farmacológicas.

Ellison M. y Olivera 2007 [94] mencionan que en el veneno de *C. archon* pudieran existir de tres a ocho α -conotoxinas y hasta la fecha solamente se ha descrito una conotoxina proveniente de esta especie, nombrada ArchIIIA [98].

Por esta razón, el explorar a las toxinas presentes en el veneno de *C. archon* puede llevar al descubrimiento de nuevos componentes moduladores de receptores nicotínicos, ya sea que se trate de alguna de las conotoxinas mencionadas por Ellison, M. & Olivera en 2007 [94] o conotoxinas pertenecientes a otra familia. Encontrar y caracterizar a estos componentes nos permitirá ahondar en aspectos ecológicos de esta especie (relacionados e.g. con la importancia de esta toxina en la interacción de *C. archon* con sus presas o depredadores) al tiempo que nos permitirá encontrar posibles aplicaciones farmacológicas para estos componentes.

4 Hipótesis

Las corrientes colinérgicas de los nAChR conformados únicamente por subunidades α será modificada por la interacción con un componente hidrofílico presente en el veneno de *Conus archon*. Este componente presentará características similares a las conotoxinas $\alpha 4/3$.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

- Caracterizar bioquímica y funcionalmente a un componente hidrofílico proveniente del veneno de *Conus archon* que posee actividad moduladora en subtipos de nAChR.

5.2 Objetivos particulares

- Extraer y fraccionar el veneno de *Conus archon*.
- Identificar a una fracción hidrofílica que posee actividad moduladora en alguno de los subtipos de nAChR expresados heterológamente.
- Evaluar tanto la selectividad como la afinidad de la fracción con actividad.
- Purificar la fracción que posee actividad moduladora.
- Identificar el componente que posee la actividad dentro de la fracción.
- Determinar el peso molecular del componente activo.
- Obtener la estructura primaria del componente activo.

6 Materiales y métodos

6.1 Obtención de los conductos venenosos de *Conus archon*

Se trabajó con ejemplares de *C. archon* provenientes de la costa de Mazatlán, Sinaloa colectados en mayo de 2022. Se les extrajo quirúrgicamente el conducto venenoso y las muestras se congelaron a -20 °C hasta su procesamiento.

6.2 Extracción y cuantificación del veneno crudo de *C. archon*

Los conductos venenosos provenientes de 13 de machos y 18 de hembras de *C. archon*, fueron descongelados a 4 °C y colocados por separado en 10 mL de solución de extracción, compuesta por 40 % de acetonitrilo (ACN) y 2 % de ácido trifluoroacético (TFA) disueltos en H₂O. Su homogeneización se realizó en hielo utilizando una homogenizadora de tejido Tissue Tearor 985370, BioSpec Products ©. El homogenado resultante se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

Posteriormente, las muestras homogeneizadas fueron centrifugadas a 12,000 g durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. El sobrenadante fue sometido a un segundo ciclo de centrifugación a 10,000 g durante 5 minutos, recolectando nuevamente el sobrenadante en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Este último constituyó al extracto crudo del veneno.

La cuantificación de proteína de los lotes del extracto crudo se realizó colocando 1 µL de cada lote de veneno en un espectrofotómetro (NP80 Implen ©). La lectura se realizó a una longitud de onda de 280 nm y se utilizó 1 µL de solución de extracción como blanco.

6.3 Fraccionamiento del extracto crudo de veneno de *C. archon* por RP-HPLC

Los componentes peptídicos del veneno de *C. archon* se separaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando un cromatógrafo 1260 Infinity de Agilent technologies equipado con una columna analítica C18 (Vydac, dimensiones: 4.6 mm x 250 mm; tamaño de poro: 5 µm), provista de una precolumna de sílice (218TP54; dimensiones: 4.6 X 10 mm; tamaño de poro: 5 µm).

Las soluciones empleadas para el fraccionamiento del extracto crudo de veneno fueron:

- Solución A (0.01 % de TFA en H₂O)
- Solución B (90 % de ACN, 0.085 % TFA y H₂O).

El gradiente de elución consistió en un paso isocrático de 5 % de solución B durante 5 minutos, seguido de un gradiente lineal desde 5 a 70 % de solución B en 70 minutos con un flujo de 1 mL/min.

Para su separación, se utilizaron 7.5 mg de proteína provenientes de cada lote, considerando la naturaleza peptídica de los componentes de interés, la detección se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro a 220 nm para detectar el enlace peptídico y a 280 nm para detectar los aminoácidos aromáticos. Las fracciones

resultantes se colectaron de manera manual en tubos Eppendorf de 1.5 mL en el orden de aparición en el cromatograma.

Cada una de las fracciones colectadas se llevó a sequedad utilizando un concentrador Thermo SAVANT SpeedVac SPD 1010 y se almacenaron a -20 °C. Paralelamente, utilizando el área bajo la curva registrada para cada fracción, se estimó su respectiva cantidad de nmol; esta estimación se realizó utilizando el valor del área bajo la curva correspondiente a 5 nmol (7.8 µg) de una muestra de la conotoxina sintética α -RglA.

6.4 Extracción quirúrgica de los ovocitos de *Xenopus laevis*

Para obtener los ovocitos de *Xenopus laevis* se anestesió al ejemplar utilizando tricaina metasulfonato (MS-222) al 2% (pH 7-7.3) durante 20-25 minutos o hasta que los movimientos de la rana cesaran por completo; una vez anestesiada la rana, se prosiguió con la microcirugía.

La microcirugía consistió en una pequeña incisión (<1 cm) en la parte inferior de la cavidad abdominal exponiendo el saco ovárico. Posteriormente se extrajeron con pinzas de disección a los ovocitos y se colocaron en un tubo 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). Cuando la extracción de los ovocitos concluyó, se cerró la herida suturando el músculo y la piel mediante 2-3 puntos simples (**Figura 9**).



Figura 9. Microcirugía realizada en *Xenopus laevis*. Se muestra la sutura de punto simple realizada en el músculo de *X. laevis* después de la cirugía de extracción de ovocitos, este mismo punto se aplica en la piel (aún no suturada en la imagen). Fotografía: elaboración propia.

Para eliminar las impurezas presentes en el medio OR-2, se realizaron lavados agitando manualmente el tubo Falcon y descartando el excedente de medio,

posteriormente se aforó a 40 mL añadiendo medio OR-2 nuevamente. Este proceso se repitió al menos cuatro veces hasta que el medio se observara transparente.

Posteriormente, se añadió 1.15 mg/mL de colagenasa de *Clostridium histolyticum* al medio OR-2 y se mantuvo en agitación manual durante 10 minutos y en un agitador de vaivén durante 20 minutos para disgregar el cúmulo de ovocitos. Cuando la agitación finalizó, nuevamente se realizaron cinco lavados utilizando medio OR-2 con el objetivo de eliminar la colagenasa residual.

Los ovocitos fueron examinados utilizando un microscopio estereoscópico y aquellos en estadios de desarrollo V y VI (**Figura 10**) fueron transferidos a una caja Petri que contenía medio ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ y 5 mM HEPES [pH 7.1-7.5 ajustado con 10 N NaOH]) y antibióticos penicilina/estreptomicina (100 U/100 µg) y gentamicina (100 µg/mL). Los ovocitos en el medio ND96 se mantuvieron en incubación a una temperatura de 15 °C.

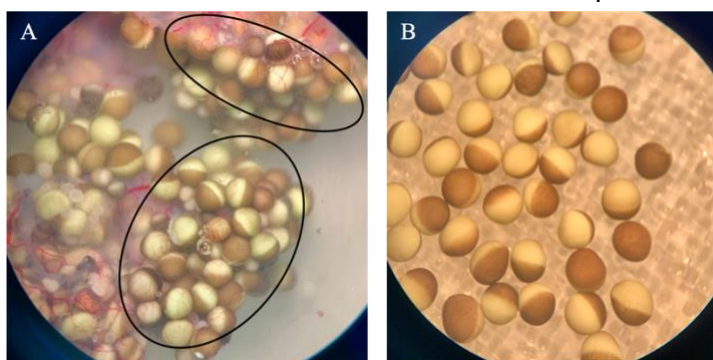


Figura 10. Ovocitos extraídos de *Xenopus laevis*. (A) Ovocitos de *X. laevis* inmediatamente después de haber sido extraídos quirúrgicamente. (B) Ovocitos de *X. laevis* disgregados con colagenasa. En (A) se resaltan a los cúmulos de ovocitos correspondientes al saco folicular, además se observan los vasos sanguíneos que irrigan a estas estructuras. Fotografía: elaboración propia.

6.5 Expresión heteróloga de los subtipos de nAChR en los ovocitos de *X. laevis*

Para lograr obtener la expresión heteróloga de los subtipos neuronales humanos de nAChR y muscular de ratón, se inyectaron 5 ng de cDNA del subtipo ($\alpha 1$)₂ $\beta 1\delta\epsilon$ al núcleo, así como 32.2 ng de mRNA de los subtipos $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$ al citoplasma de los ovocitos (**Figura 11**). La inyección se realizó al día siguiente de la obtención quirúrgica de los ovocitos utilizando un nanoinyector Nanolitter 2000 de WPI ©.

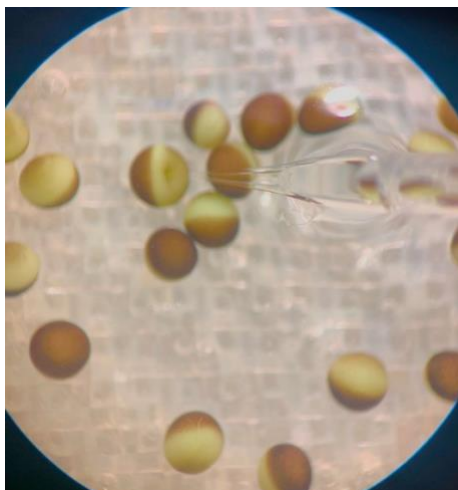


Figura 11. Inyección del material genético de los nAChR a los ovocitos de *X. laevis*. Se muestra la aguja de inyección perforando el polo vegetal de un ovocito para la inyección del material genético (mRNA en este caso) de los subtipos neuronales ($\alpha 3\beta 2$ o $\alpha 7$). Fotografía: elaboración propia.

La expresión heteróloga fue confirmada dos días postinyección mediante un estímulo dosis-específico de acetilcolina (ACh): 10 μM para el subtipo $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$, 100 μM para el subtipo $\alpha 3\beta 2$ y 200 μM para el subtipo $\alpha 7$ acorde con Rodríguez-Ruiz, X. *et al.* en 2022 [99] para generar corrientes colinérgicas. La técnica empleada se describe detalladamente en la **sección 6.6**.

6.6 Evaluación electrofisiológica de las fracciones seleccionadas del veneno proveniente de *C. archon*

Tanto la confirmación de la expresión heteróloga de los subtipos de nAChR inyectados, como la evaluación electrofisiológica de las fracciones del veneno de *C. archon* se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos en célula completa; la técnica se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Guan, B. *et al.* en 2013 [100].

Se utilizó un amplificador de corriente OC-725C de Warner Instruments © y el software LabView (National Instruments ©) para la adquisición de datos. Los microelectrodos de borosilicato (WPI ©) se llenaron con una solución de KCl 3 M y el ovocito se colocó en una cámara de registro de 30 μL de capacidad en la que fueron perfundidos por gravedad utilizando medio ND96 (solución de registro) previamente desgasificado (**Figura 12**). El potencial de membrana del ovocito se fijó en -70 mV para simular a una célula excitable.

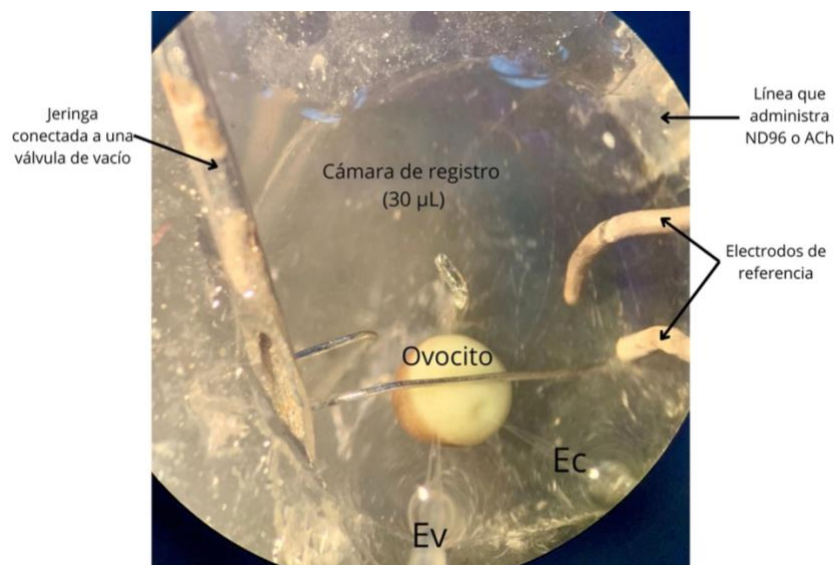


Figura 12. Configuración de la cámara de registro. El ovocito fue colocado dentro de una cámara de registro con capacidad de 30 µL y fue perfundido mediante una válvula con ND96 o acetilcolina (ACh). Una jeringa de vacío succiona el volumen necesario de las soluciones perfundidas para mantener el volumen de la cámara constante. Dos electrodos, uno para monitorear el voltaje (Ev) y otro para detectar corriente (Ec), se colocaron sobre el ovocito para llevar a cabo el registro electrofisiológico.

Para inducir corrientes colinérgicas, se administraron pulsos de ACh con una duración de 1000 ms y un intervalo de 60 segundos entre cada pulso. La concentración de acetilcolina utilizada para obtener los registros fue la misma que se empleó para confirmar la expresión del nAChR inyectado.

Para los ensayos funcionales, se aplicaron directamente 3 µL de medio ND96 (control) o 3 µL de las fracciones seleccionadas del veneno de *C. archon* a diferentes concentraciones en un baño estático; es decir, todas las válvulas se cerraron durante cinco minutos para permitir la interacción de la fracción de veneno con el receptor. Después de este periodo, se reactivó el flujo de medio ND96 y los pulsos de ACh. El efecto de esta interacción se midió comparando la amplitud de corriente del pulso control inicial con respecto a la amplitud de la corriente del primer pulso después de los cinco minutos de interacción de la fracción del veneno con el receptor.

6.7 Análisis estadístico

Las evaluaciones electrofisiológicas se realizaron por triplicado para cada fracción y el porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula: $(1 - \frac{I_{toxina}}{I_{control}}) * 100$ en la que un valor positivo indica inhibición del receptor y un valor negativo indica un incremento en su actividad. Se analizaron los datos de aquellas fracciones con un efecto mayor al 10% (margen de error por parte del equipo).

La normalidad de los datos se confirmó utilizando la prueba de Shapiro-Wilkins y la prueba de hipótesis utilizada fue una prueba T de Student para muestras independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 10.

6.8 Determinación del peso molecular mediante espectrometría de masas

El análisis de masas se realizó en el Laboratorio de Servicios Analíticos del Instituto de Química de la UNAM utilizando 1 nmol (aproximado con la muestra de α -RglA; **sección 6.3**) del componente activo. La técnica utilizada para obtener el peso molecular fue espectrometría de masas mediante Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) utilizando un detector de Tiempo de Vuelo (TOF, por sus siglas en inglés) llevada a cabo en un espectrómetro de la marca Bruker Microflex ©.

Se empleó una matriz de ácido- α -4-hidroxicinámico (CHCA) y la calibración del equipo se realizó utilizando angiotensina II, melitina y citocromo C. La lectura de las muestras se realizó utilizando el software FlexControl mientras que para la adquisición y análisis de los datos se utilizó el software FlexAnalysis.

6.9 Secuenciación de aminoácidos por degradación de Edman

Se realizó la técnica de degradación de Edman para conocer la estructura primaria del componente de la fracción activa. Para ello se utilizó 1 nmol del componente purificado, el cual fue analizado en el Laboratorio de Neurofarmacología Marina a cargo del Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez.

Este proceso se llevó a cabo utilizando fenilisotiocianato (PITC, por sus siglas en inglés), también conocido como reactivo de Edman, el cual se acopla al extremo amino del péptido, es decir al primer aminoácido. La reacción se llevó a cabo en medio alcalino; posterior al corte, en medio ácido, el derivado de anilintiazolinona del aminoácido escindido es convertido a feniltiohidantoin-aminoácido (PTH-aminoácido) y detectado mediante RP-HPLC. Este proceso representa un ciclo, de modo que la secuenciación completa se lleva a cabo repitiendo este ciclo tantas veces como aminoácidos tenga el péptido de interés.

7 Resultados

7.1 Cuantificación de proteína en los extractos crudos de veneno provenientes de *C. archon*

Después de haber colectado el sobrenadante del extracto crudo proveniente de *C. archon*, se obtuvieron en total 23 lotes, de los cuales 10 son lotes de extracto crudo provenientes de machos y 13 son lotes de extracto crudo provenientes de hembras.

La **Tabla 1** muestra la cuantificación de proteína realizada mediante la lectura a 280 nm de longitud de onda, así como la pureza indicada mediante el cociente 260/280.

Tabla 1. Cuantificación de proteína y pureza de las muestras de extracto crudo de veneno provenientes de *C. archon*.

	Machos		Hembras	
	Cantidad de proteína (mg)	Cociente 260/280	Cantidad de proteína (mg)	Cociente 260/280
Muestra 1	8.16	0.87	22.58	0.85
Muestra 2	18.94	0.87	22.06	0.85
Muestra 3	16.55	0.85	22.57	0.83
Muestra 4	17.41	0.86	22.34	0.84
Muestra 5	15.26	0.81	23.83	0.85
Muestra 6	15.26	0.81	22.92	0.86
Muestra 7	15.50	0.82	22.99	0.85
Muestra 8	16.38	0.89	23.43	0.86
Muestra 9	16.19	0.84	22.58	0.85
Muestra 10	16.17	0.84	23.00	0.85
Muestra 11	NA		22.81	0.84
Muestra 12			22.26	0.85
Muestra 13			23.39	0.85

Se realizaron alícuotas de 7.5 mg de proteína de las muestras sombreadas en color azul claro y de 11.17 mg de proteína de la muestra sombreada en verde.

NA: no aplica, puesto que solo se obtuvieron 10 tubos de extracto crudo de veneno de machos.

En promedio se cuantificaron 22.82 ± 0.5 mg de proteína en los extractos crudos provenientes de hembras y 15.58 ± 2.8 mg proteína provenientes de los extractos crudos de macho. De modo que se obtuvo un mayor rendimiento (7.24 mg) en los lotes de veneno de las hembras de *C. archon*.

7.2 Fraccionamiento del veneno de *C. archon* por RP-HPLC

Una vez que se cuantificó la cantidad de proteína presente en cada muestra, se decidió trabajar únicamente con el veneno de hembras debido a su mayor rendimiento. Se realizaron alícuotas con 7.5 mg de proteína de los lotes 2 y 9; y con 11.5 mg de proteína del lote 4 (**Tabla 1**); esta última se realizó para aumentar la disponibilidad de material. En total se realizaron tres corridas cromatográficas.

La **Figura 13** muestra el perfil cromatográfico representativo del veneno proveniente de hembras de *C. archon*, en este podemos apreciar la elución de cuatro fracciones

hidrofílicas entre el minuto 10 y el minuto 15, denotadas como: F4, F5, F6 y F7, siendo esta última una de las fracciones mayoritarias en el perfil.

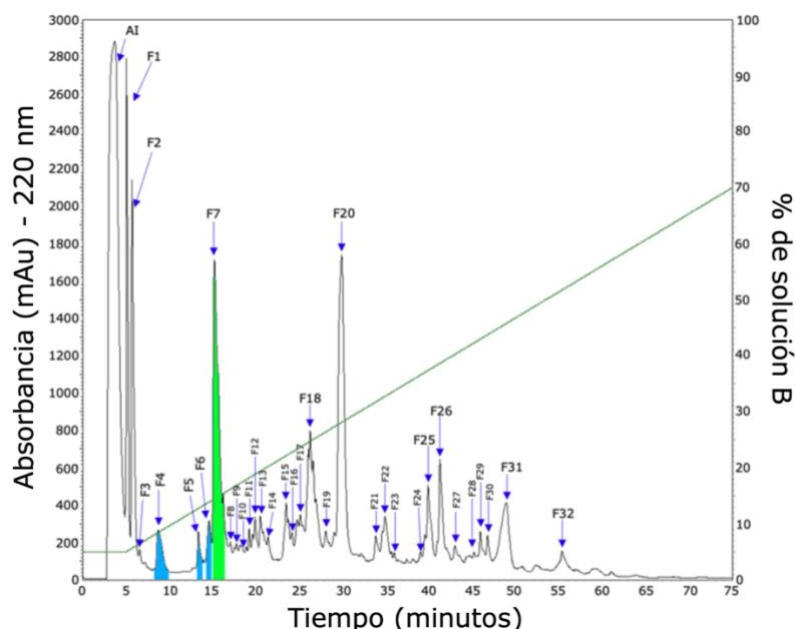


Figura 13. Perfil cromatográfico del veneno proveniente de hembras de *C. archon* a una λ de 220 nm. El gradiente de elución (5-70 % de solución B en 75 minutos), se indica con una línea verde. Utilizando un detector de luz UV a una λ de 220 nm, se colectaron 32 fracciones del veneno. Las fracciones sombreadas eluyeron en el intervalo de tiempo de 10-15 minutos. La fracción denotada como F7 se sombreadó en color verde por su abundancia en el perfil. AI: artefacto de inyección.

Además de la detección a 220 nm, se realizó una lectura simultánea a 280 nm para detectar la presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) en las fracciones colectadas. Dicha lectura se muestra en la **Figura 14** y en ella podemos observar que de las cuatro fracciones que eluyeron entre el minuto 10 y el minuto 15, solamente dos fracciones (F4 y F7) contienen aminoácidos aromáticos en su composición. Particularmente, la presencia de residuos aromáticos es abundante en la fracción F7, puesto que en esta longitud de onda se registró mayor la absorbancia que en otras fracciones mayoritarias tales como F18 y F20.

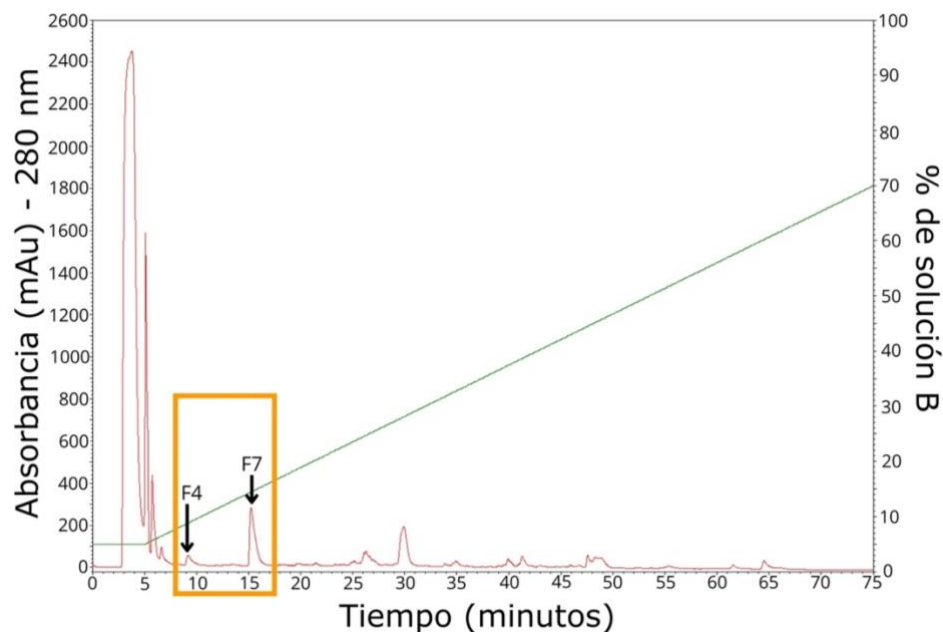


Figura 14. Perfil cromatográfico del veneno proveniente de hembras de *C. archon* con una λ de 280 nm. El gradiente de elución (5-70 % B en 75 minutos), se indica con una línea verde. Utilizando un detector de luz UV a una λ de 280 nm, se identificaron aminoácidos aromáticos en 15 de las fracciones colectadas del veneno. Las fracciones enmarcadas en un cuadro naranja eluyeron en el intervalo de tiempo de 10-15 minutos. Dentro de este intervalo, únicamente se detectaron aminoácidos aromáticos en las fracciones F4 y F7.

7.3 Estimación de la cantidad de nanomoles en las fracciones F4, F5, F6 y F7

La cantidad disponible en cada fracción se estimó utilizando el área bajo la curva registrada en el perfil cromatográfico y tomando como referencia el valor del área bajo la curva reportado para 5 nanomoles de la conotoxina sintética α -RgIA; este valor se ha cuantificado en 16,829,353 unidades de área y a su vez corresponde a 7.8 μ g del péptido.

Los rendimientos calculados de las fracciones seleccionadas se enlistan en la **Tabla 2**; es necesario aclarar que esta es una estimación preeliminar ya que se basa en dos supuestos: 1) las fracciones tienen un solo componente y 2) su masa molecular es igual a la de α -RgIA. Sin embargo, a pesar de que ambos supuestos son improbables, esta estimación es útil para tener una referencia, ya que al buscar conotoxinas del tipo α 4/3 se esperaría una masa similar a α -RgIA.

Tabla 2. Rendimiento estimado en nanomoles en cada fracción seleccionada tomando como referencia la relación a α -RglA

Fracción	Unidades de área	Rendimiento estimado (nmol)
F4	15,573,401	4.62
F5	7,266,634	2.15
F6	6,485,967	1.92
F7	101,892,013	30.27

F7 se muestra en negritas al ser la fracción de interés

Debido a su abundancia en el perfil cromatográfico, su hidrofiliidad y la presencia de aminoácidos aromáticos, F7 constituyó la fracción de interés en el presente trabajo.

7.4 Evaluación funcional de las fracciones seleccionadas del veneno de *C. archon*

Dado el antecedente de la conotoxina ArchIIIA (única conotoxina descrita para esta especie), la cual tiene una IC_{50} de 45.7 μ M sobre el subtipo de nAChR $\alpha 7$, se decidió iniciar la evaluación funcional de la F7 a una concentración superior, de modo que la concentración inicial fue 100 μ M. Esta concentración permitió por un lado descartar a un falso negativo (baja concentración) y además tener un stock para evaluar a concentraciones menores.

La evaluación a una concentración de 100 μ M provocó una inhibición del 83 % $\pm$ 1.41 (n=3) en la amplitud de las corrientes del receptor $\alpha 7$. Después de 10 pulsos de lavado, la corriente se restauró en un 54 %, indicando que el efecto de la F7 en este subtipo fue lentamente reversible; el efecto descrito se muestra en la **Figura 15**.

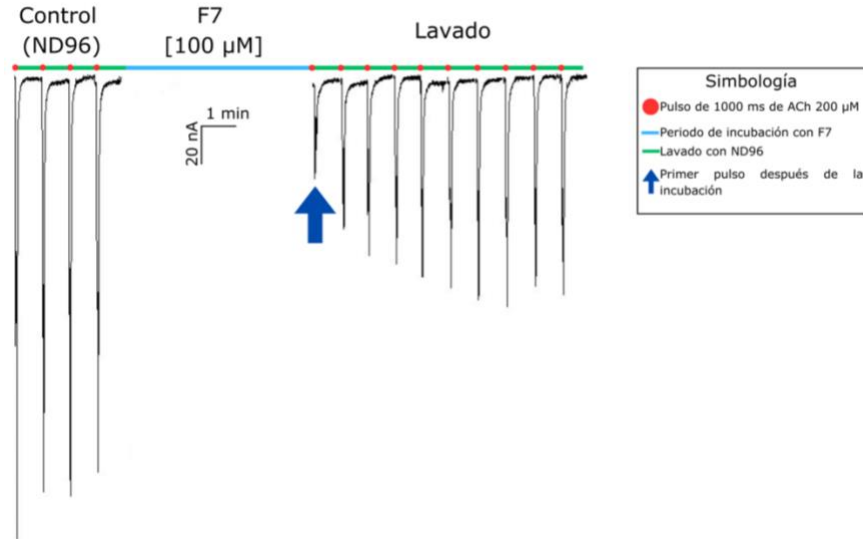


Figura 15. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 200 μ M en el nAChR h α 7 antes y después de la incubación de la fracción F7 [100 μ M]. Trazos representativos de las corrientes control (izquierda) y respuesta a un baño estático de 5 minutos de incubación con la fracción 7 a una concentración de 100 μ M (derecha).

Tras observar un efecto notorio en la disminución de la amplitud de las corrientes a una concentración elevada de la F7 en el subtipo h α 7, se reevaluó la F7 en el mismo receptor ahora a concentraciones menores (50 μ M y 10 μ M). A una concentración de 50 μ M, F7 inhibió el 40 % $\pm$ 7.40 % de la amplitud de la corriente, mientras que a una concentración de 10 μ M su efecto fue menor, inhibiendo el 14 % $\pm$ 5.29 % de la amplitud de la corriente (n=3 para ambas concentraciones). Los trazos representativos de la incubación con estas concentraciones de F7 se observan en la **Figura 16**.

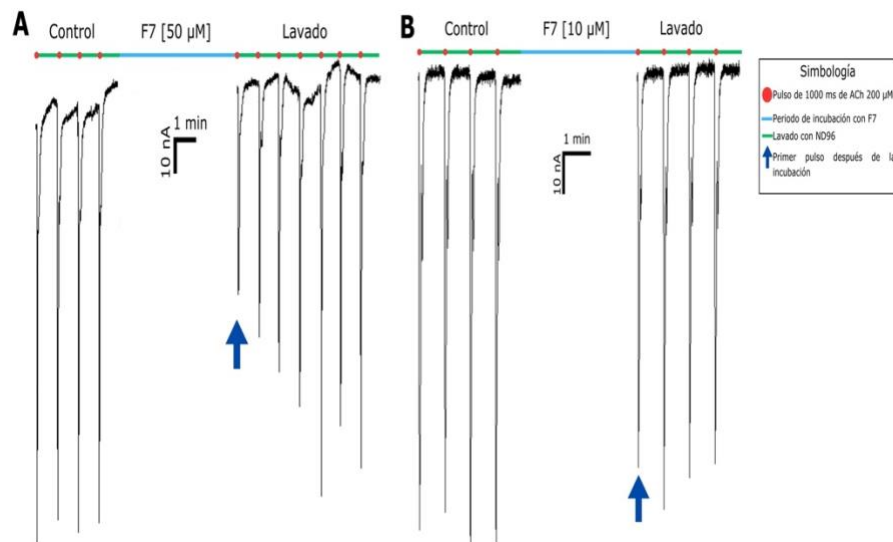


Figura 16. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 200 μ M en el nAChR h α 7 antes y después de la incubación de la fracción 7 [50 μ M y 10 μ M]. Trazos representativos de las corrientes control y respuesta a un baño estático de 5 minutos de incubación con la fracción 7 a una concentración de: (A) 50 μ M y (B) 10 μ M.

Estas mismas concentraciones (50 μM y 10 μM) de F7, se utilizaron para evaluar el efecto de F7 en los subtipos $\alpha 3\beta 2$ y $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ con el objetivo de determinar si existe selectividad de la fracción F7 por el receptor $\alpha 7$. La incubación de ambos subtipos de receptores con 50 μM de F7 no inhibió las corrientes generadas y, como era de esperarse, la incubación con 10 μM de F7 tampoco lo hizo. Los trazos representativos al incubar F7 [50 μM y 10 μM] con los subtipos $\alpha 3\beta 2$ y $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ se muestran en la **Figuras 17** y la **Figura 18**, respectivamente.

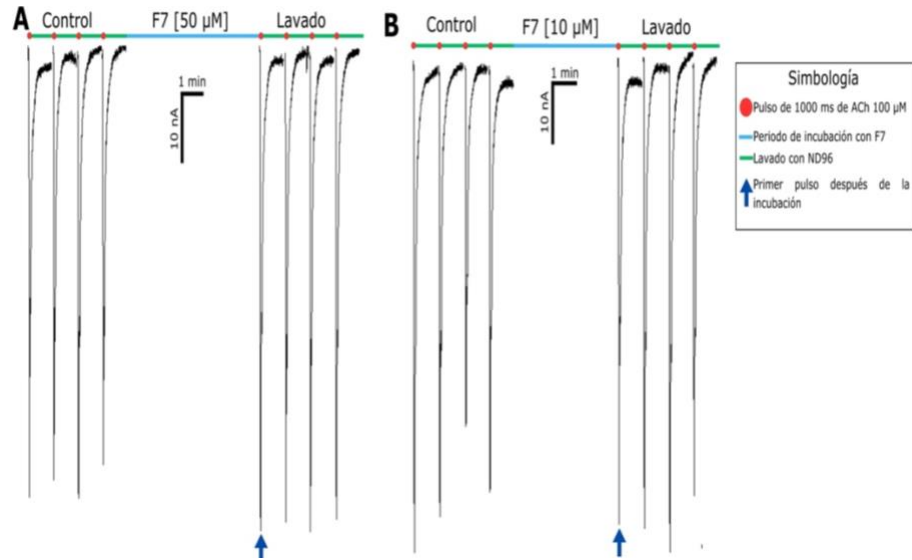


Figura 17. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 100 μM en el nAChR $\alpha 3\beta 2$ antes y después de la incubación con F7 [50 μM y 10 μM]. Trazos representativos de las corrientes control y respuesta a un baño estático de 5 minutos de incubación con la fracción 7 a una concentración de: **(A)** 50 μM y **(B)** 10 μM .

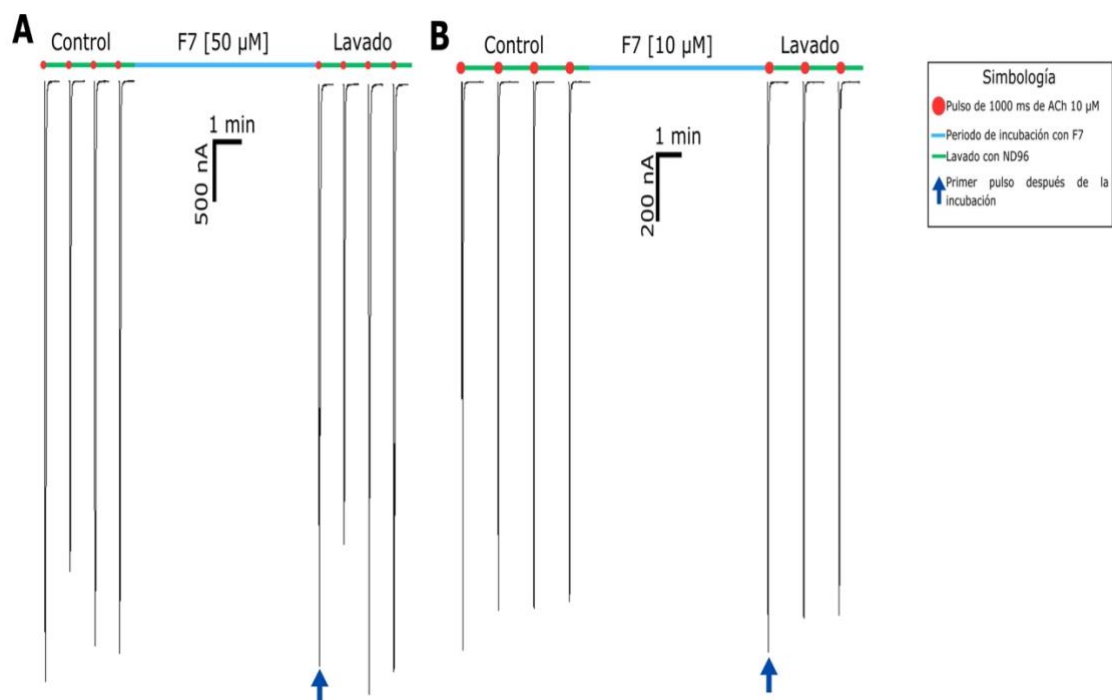


Figura 18. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 10 μM en el nAChR $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ antes y después de la incubación de la fracción F7 [50 μM y 10 μM]. Trazos representativos de las corrientes control y respuesta a un baño estático de 5 minutos de incubación con la fracción 7 a una concentración de: **(A)** 50 μM y **(B)** 10 μM .

Por tanto, la evaluación electrofisiológica de la fracción F7 proveniente del veneno de *C. archon* indica una actividad inhibitoria de baja afinidad, pero selectiva en el subtipo homomérico $ha7$. Esta selectividad se ve plasmada en la **Figura 19**, en la que se comparan el efecto de 50 μM de la F7 en los tres subtipos de nAChR evaluados.

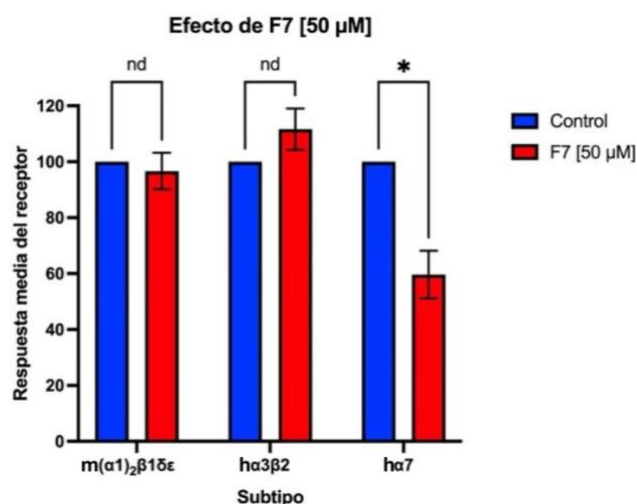


Figura 19. Porcentaje de respuesta promedio de los tres subtipos de nAChR evaluados en presencia de la F7 [50 μM] del veneno de *C. archon*. Se muestra el porcentaje de respuesta de cada receptor (media y desviación estándar) ante la incubación de 5 minutos en un baño estático con F7 [50 μM]. Nd: diferencias

estadísticamente no significativas, *: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) mediante una prueba T de Student

La selectividad de la fracción F7 se confirmó mediante una prueba T de Student en la que se determinó que la incubación con 50 μM de F7 modificó significativamente ($p < 0.05$) la actividad del receptor $\alpha 7$ (**Tabla 3**). En tanto que la F7 [50 μM] no modificó la actividad de los subtipos $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ y $\alpha 3\beta 2$.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición promedio debido al efecto de 50 μM de F7 en los tres subtipos de nAChR que fueron evaluados

Subtipo	% Inhibición promedio (<i>n</i>)	<i>P-value</i>
$m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$	3.33 (3)	0.4251
$\alpha 3\beta 2$	-11.7 (3)	0.0518
$\alpha 7$	40.33 (3)	0.0011*

* $p\text{-value} < 0.05$ mediante una prueba t de Student

Con el objetivo de investigar si alguna de las fracciones cercanas a F7 presentaba una actividad moduladora más potente que pueda indicar la presencia de alguna conotoxina $\alpha 4/3$, se realizó la evaluación funcional de F4, F5 y F6 en el subtipo $\alpha 7$. Debido a la abundancia en el perfil cromatográfico de cada una de estas fracciones, la concentración máxima que se permitió alcanzar fue de 10 μM .

La **Figura 20** muestra los trazos representativos de estos ensayos en los que podemos notar que las fracciones F5 [10 μM] y F6 [10 μM] aparentemente no modificaron la actividad del receptor; mientras que la fracción F4 [10 μM] aparentemente sí mostró un efecto inhibitorio alrededor del 20 %.

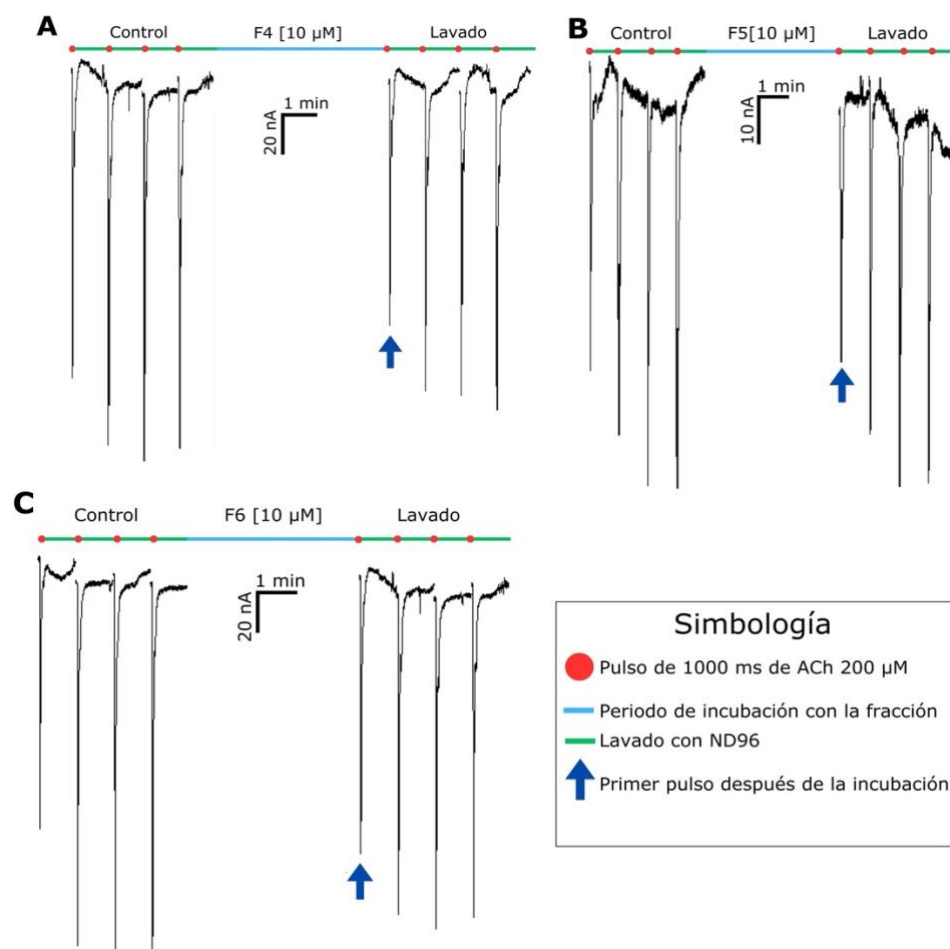


Figura 20. Evaluación de las corrientes generadas con ACh 200 μ M en el nAChR α 7 antes y después de la incubación de F4, F5 y F6 [10 μ M]. Trazos representativos de las corrientes control y respuesta a un baño estático de 5 minutos de incubación con: (A) F4 [10 μ M], (B) F5 [10 μ M] y (C) F6 [10 μ M].

Los porcentajes de inhibición de la F4 y la F7 sobre el subtipo α 7 fueron similares (20 % y 14 %)

La evaluación electrofisiológica se resume en la **Tabla 4**, en la que se aprecia que únicamente las fracciones F4 y F7 mostraron actividad en el mismo subtipo (α 7) con una afinidad similar.

Tabla 4. Efecto de las fracciones con actividad sobre alguno de los nAChR evaluados.

Fracción	Concentración	% de inhibición	Subtipo
F4	10 μ M	20	α 7
F5	10 μ M	0	α 7
F6	10 μ M	0	α 7
F7	10 μ M	14	α 7

10 μ M	0	h α 3 β 2
10 μ M	0	m(α 1) ₂ β 1 $\delta\epsilon$
50 μ M	40	h α 7
50 μ M	-11	h α 3 β 2
50 μ M	0	m(α 1) ₂ β 1 $\delta\epsilon$
100 μ M	83	h α 7

Dado que ninguna de las fracciones accesorias (F4, F5 o F6) mostró un efecto modulador notoriamente mayor sobre el subtipo α 7 al observado a 10 μ M de F7, únicamente se caracterizó bioquímicamente a la fracción F7.

7.5 Purificación de la fracción F7

Tomando como referencia el porcentaje de elución de la fracción F7 (aproximadamente 16 % de solución B), la purificación de la fracción F7 consistió en un subfraccionamiento utilizando un gradiente lineal de 5-21 % de solución B en 50 minutos.

La **Figura 21** muestra el subfraccionamiento de F7 en donde se observan claramente seis componentes (nombrados como F7-1 a F7-6) que constituyen a dicha fracción 7; siendo el cuarto componente (F7-4) la señal mayoritaria.

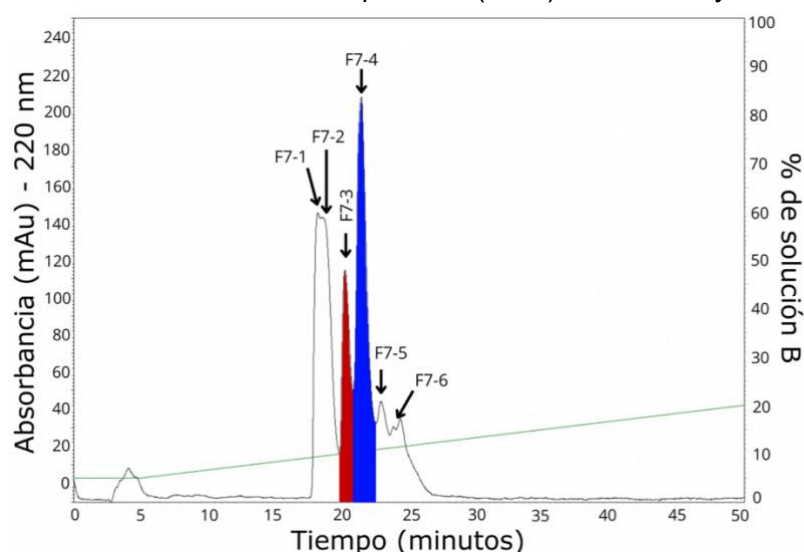


Figura 21. Perfil cromatográfico de la fracción F7 del veneno de *C. archon* a una λ de 220 nm. El gradiente de elución (5-21% B en 50 minutos), se indica con una línea verde. Utilizando un detector de luz UV a una λ de 220 nm, se colectaron 6 componentes. Los componentes sombreados (rojo y azul) muestran las señales mayoritarias y con mayor pureza en el perfil.

Al igual que en el fraccionamiento del extracto crudo, también se examinó la presencia de aminoácidos aromáticos en cada uno de los componentes de F7 mediante la detección a una longitud de onda de 280 nm (**Figura 22**). En este perfil cromatográfico se puede notar la presencia de aminoácidos aromáticos en los

primeros cuatro componentes (F7-1 – F7-4), en contraste con los últimos dos componentes (F7-5 y F7-6) que carecen de estos residuos.

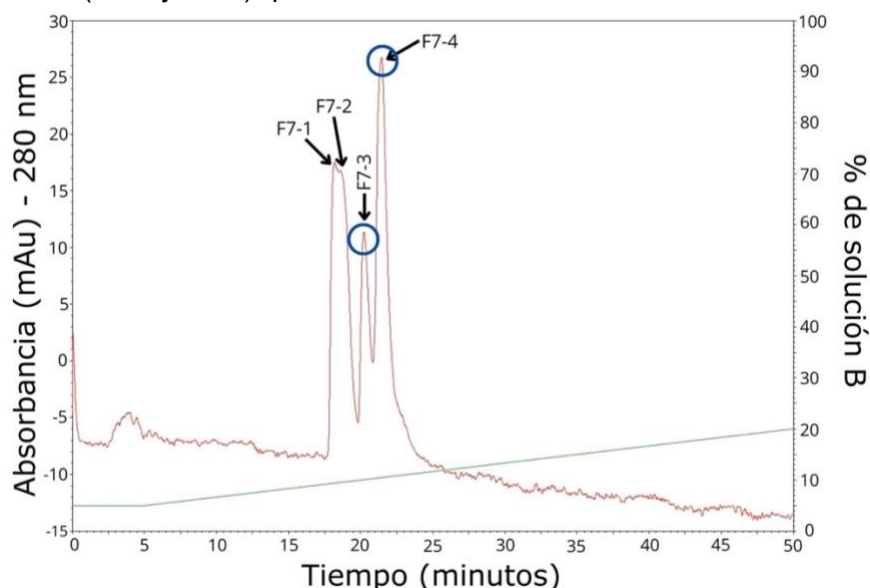


Figura 22. Perfil cromatográfico de la fracción F7 del veneno de *C. archon* a una λ de 280 nm. El gradiente de elución (5-21% B en 50 minutos), se indica con una línea verde. Utilizando un detector de luz UV a una λ de 280 nm, se identificaron 4 componentes con aminoácidos aromáticos. Los componentes sombreados (naranja y azul) representan las señales mayoritarias y con mayor pureza del perfil.

Los componentes sombreados en la **Figuras 21** y **Figura 22**, representan los dos componentes más abundantes en el perfil cromatográfico y además con mayor pureza. Si bien las subfracciones F7-1 y F7-2 también son abundantes, no se aprecia una separación clara entre ambos componentes, indicando una pureza menor comparada con los componentes F7-3 y F7-4.

Por lo tanto, el análisis bioquímico se realizó únicamente con los componentes F7-3 y F7-4. En el caso de F7-3, la cantidad de toxina solo permitió determinar la masa molecular, mientras que de F7-4 se pudo determinar su masa molecular y su estructura primaria (secuencia de aminoácidos).

7.6 Determinación de la masa molecular de los componentes F7-3 y F7-4

Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en una matriz de CHCA, se obtuvo la masa molecular de los componentes F7-3 y F7-4. Los espectros obtenidos se aprecian en la **Figura 23**.

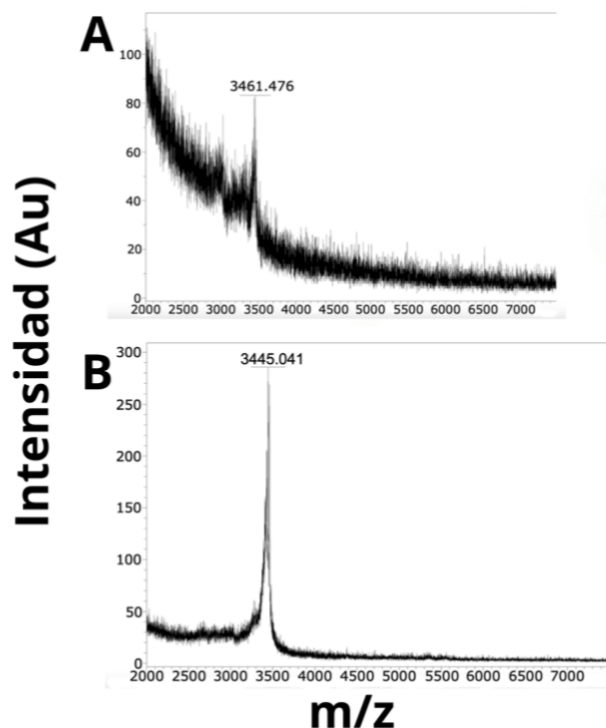


Figura 23. Espectros de masas de los componentes F7-3 y F7-4 purificados. Se observan los pesos moleculares de (A) F7-3 y (B) F7-4.

De este análisis podemos detectar una señal mayoritaria referente al peso molecular de F7-3 (**Figura 23A**) correspondiente al ion con carga +1 y un valor m/z de 3461.47 Da; por su parte, el espectro de masas de F7-4 (**Figura 23B**) muestra un valor m/z de 3445.04 Da también referente también al ion con carga +1. De este modo, podemos notar que F7-3 y F7-4 son moléculas bastante similares en peso, con una diferencia de 16 Da.

7.7 Secuenciación del componente F7-4

Se realizó el ensayo de degradación de Edman con el objetivo de determinar la estructura primaria del péptido F7-4, utilizando una alícuota de 1 nmol. Es de mencionar que, para realizar esta técnica de manera exitosa, es necesario que el extremo amino del péptido se encuentre libre de modo que permita el acoplamiento del PITC y la consecuente escisión del primer aminoácido.

No obstante, tras realizar 10 ciclos con PITC, no se obtuvieron lecturas correspondientes a la detección de aminoácidos (cromatogramas no mostrados), implicando que el extremo amino del péptido se encuentra bloqueado, de modo que no se pudo realizar la unión del extremo amino con PITC. Por esta razón no fue posible obtener la estructura primaria de F7-4.

7.8 Curva dosis-inhibición de la fracción F7 en los subtipos de nAChR

Considerando los pesos moleculares de los componentes caracterizados (~3 kDa), la cantidad de nanomol inicial de F7 (**Tabla 2**) fue sobreestimada, puesto que se obtuvo con el área bajo la curva de 7.8 µg (5 nmol) de α-RglA, cuya masa es de 1570 Da. Por tanto, la cantidad de nanomoles se ajustó nuevamente, ahora empleando la masa de F7-4, ya que este fue el componente mayoritario en la purificación de F7.

De este modo, las concentraciones de toxina reales durante las evaluaciones electrofisiológicas fueron: 45.69 µM, 22.84 µM y 4.56 µM (en vez de 100 µM, 50 µM y 10 µM respectivamente). La **Figura 24** resume el efecto de estas concentraciones sobre el receptor $\alpha 7$ en la que se calculó una IC_{50} de 32.7 µM.

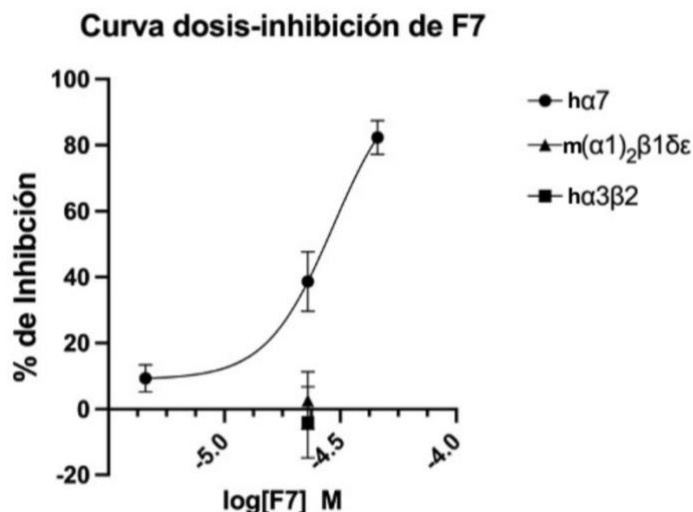


Figura 24. Curva dosis-inhibición de F7 sobre los subtipos de nAChR evaluados. Se muestran los porcentajes de inhibición (media y desviación estándar) para las diferentes concentraciones de F7 utilizadas.

8 Discusión

El objetivo del presente reporte fue ampliar el estudio toxinológico de *C. archon* iniciado por Hernández-Sámamo, A. y colaboradores en 2022 [98] con la descripción de ArchIIIa; aunado a ello se estima que esta especie posee 8 α-conotoxinas de las cuales 3 pertenecen a la subfamilia α4/3. Con base a estos antecedentes, se analizaron cuatro fracciones del veneno de *C. archon* con el objetivo de determinar si alguna de ellas correspondía a una de las α-conotoxinas predichas por Ellison, M. & Olivera 2007 [94].

El análisis toxinológico inició con la cuantificación de proteína del extracto crudo del veneno proveniente tanto de hembras como de machos, en la que se determinó que por cada conducto venenoso, las hembras producen en promedio 7.4 mg más de proteína que los machos. Esta diferencia entre machos y hembras sobre la cantidad de veneno sintetizada ya se ha reportado en *C. regius* de manera estacional [101], *i.e.* en ciertos

periodos del año las hembras producen mayor cantidad de veneno que los machos, pero esta tendencia se revierte al estudiar otros periodos del año.

Una posible explicación del por qué estacionalmente las hembras producen una mayor cantidad de veneno puede deberse a la demanda energética, ya que al ser ellas las que ponen los huevos, requieren consumir más alimento y por consiguiente llegan a producir una mayor cantidad de toxina en su veneno para la captura de sus presas, por lo que se puede especular que los ejemplares de *C. archon* utilizados en el presente reporte, fueron colectados en una fecha cercana a su etapa reproductiva, aunque para confirmar esto, se deben realizar estudios estacionales (colectas en distintas fechas del año) o bien confirmar con la puesta de huevos. Este aspecto permitiría establecer fechas en las que sea más conveniente recolectar a los individuos de esta especie.

Si bien se observó una diferencia en la cantidad de veneno que fue sintetizada por parte de las hembras respecto de los machos de *C. archon*, no se han documentado variaciones por sexo respecto a la composición del mismo [102]. Por estas razones, se aprovechó el mayor rendimiento del veneno proveniente de hembras y se utilizaron sus lotes de extracto crudo para realizar el fraccionamiento mediante RP-HPLC.

Como se ha mencionado previamente, una de las características bioquímicas de las α -conotoxinas es su hidrofiliidad [83]. No obstante, la subfamilia $\alpha 4/3$ se caracteriza por presentar aminoácidos aromáticos en su segunda asa intercisteína [59]; esto se ve representado con la presencia de tirosina (Y) en α -RglA [97] y de triptófano (W) en Iml e ImII [96]. De modo que, si bien es de esperarse que las primeras fracciones en eluir correspondan con alguna de las α -conotoxinas predichas, es probable que las $\alpha 4/3$ no eluyan inmediatamente, pues sus aminoácidos aromáticos les otorgan cierta hidrofobicidad.

Por consiguiente, de las 32 fracciones que se colectaron del veneno de *C. archon* se decidió que las fracciones estudiadas en el presente reporte fueran aquellas que eluyeron entre los minutos 10 y 15 *i.e.* F4, F5, F6 y F7 (**Figura 13**), siendo todos estos componentes más hidrofílicos que ArchIIIA. La **Figura 14** confirma la presencia de aminoácidos aromáticos en las fracciones F4 y F7, por lo que se pudo especular la presencia de alguna conotoxina $\alpha 4/3$ en dichas fracciones.

Dado que tanto el clado *Stephanoconus* como la subunidad $\alpha 7$ son filogenéticamente antiguos [103, 104], no es de extrañar que las conotoxinas $\alpha 4/3$ (presentes exclusivamente en este clado) inhiban al subtipo de nAChR $\alpha 7$. Este subtipo además es el blanco molecular tanto de Iml como de ImII [105] por lo que, si entre las fracciones

seleccionadas, se encontrara alguna conotoxina de la subfamilia $\alpha 4/3$, sería posible notar un efecto sobre este subtipo de nAChR; por ello la evaluación electrofisiológica inició con el subtipo $\alpha 7$ de humano ($\text{h}\alpha 7$).

La decisión de comenzar la evaluación funcional de F7 a una concentración estimada de 100 μM se basó en la IC_{50} de ArchIIIA (45.7 μM). Esta misma concentración (100 μM) ya ha sido utilizada por Wilson, D. *et al.* en 2022 [106] para evaluar el efecto de la conotoxina PI168 en nAChR. La incubación con 100 μM de F7 (aunque tal como se describió en la **sección 7.8**, la concentración real corresponde a 45.69 μM) inhibió la actividad del receptor $\text{h}\alpha 7$ en un 83% (**Figura 15 y Tabla 4**).

Aunque esta elevada concentración puede dar lugar a observar una inhibición por saturación, este no parece ser el caso ya que tras 10 pulsos de lavado el receptor solamente logró recuperar el 54% de su actividad, mientras que en inhibiciones por saturación, la recuperación del 100% de actividad es rápida y ocurre tras pocos pulsos de lavado. Esto ha sido previamente documentado por McIntosh J. *et al.* en 1995 [107] quienes señalaron que la incubación con 100 μM de MrVIA bloquea los canales de calcio en neuronas de *Aplysia*, pero el canal recupera su actividad basal tras pocos segundos de lavado.

El efecto inhibitorio de la fracción F7 fue dosis-dependiente ya que al utilizar diluciones 1:2 y 1:10, correspondientes a 50 μM y 10 μM respectivamente según la estimación inicial (concentraciones reales de 22.84 μM y 4.56 μM) se siguió observando un efecto inhibitorio sobre el subtipo $\text{h}\alpha 7$ aunque con menor intensidad, registrando una inhibición del 40% a 50 μM y del 14% a 10 μM (**Figura 16 y Tabla 4**). Estos resultados corroboran la interacción entre F7 y el receptor $\text{h}\alpha 7$.

Si bien la afinidad de la fracción F7 no fue muy alta, las fracciones cercanas (F4, F5 y F6) evaluadas a 10 μM no tuvieron un efecto mucho mayor al de F7 a esta misma concentración (10 μM). Solamente la fracción F4 inhibió la amplitud de la corriente del receptor $\text{h}\alpha 7$ en un 20% mientras que las fracciones F5 y F6 no mostraron ningún efecto sobre la amplitud de la corriente (**Figura 20 y Tabla 4**). Aunque la inhibición de F4 es mayor (20% de inhibición), ésta no es muy superior a la mostrada por F7 (14%) por lo que, considerando la abundancia de cada fracción en el perfil (**Tabla 2**), se mantuvo a F7 como la fracción de interés.

Curiosamente, las fracciones F4 y F7 poseen aminoácidos aromáticos (**Figura 14**), un aspecto en el que coinciden con ArchIIIA, que presenta una tirosina en la posición 9 (Y9) [98]. Esta observación sugiere que la detección de aminoácidos aromáticos podría

ser un indicador para realizar la búsqueda de potenciales moduladores del nAChR $\alpha 7$, al menos en *C. archon*.

La fracción F7 demostró ser selectiva por el subtipo $\alpha 7$ ya que a 22.84 μM y 4.56 μM no inhibió los subtipos $\alpha 3\beta 2$ y $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ (**Figuras 17 y 18; Tabla 4**). Cuantitativamente, la selectividad de la fracción F7 se confirmó mediante una prueba t de Student, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) únicamente en la incubación de la Fracción F7 con el subtipo $\alpha 7$ (**Figura 19**). Esto indica que la fracción F7 es capaz de distinguir entre subtipos de nAChR e inhibir preferentemente el subtipo $\alpha 7$ (**Figura 25**). En general, las conotoxinas $\alpha 4/3$ inhiben con mayor afinidad los nAChR conformados únicamente por subunidades α respecto a otros subtipos heteroméricos, e.g. ImII muestra una afinidad 16 veces mayor por el subtipo $\alpha 7$ (IC_{50} : 571 nM) en contraste con los subtipos $\alpha 3\beta 2$ (IC_{50} : 9.61 μM) y $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ (IC_{50} : 9.5 μM) [105].

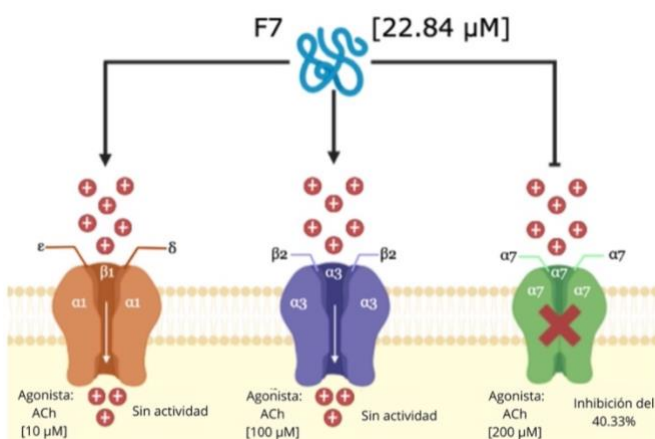


Figura 25. Discriminación entre subtipos de nAChR por parte de la fracción F7 proveniente del veneno de *C. archon*. Se muestra un resumen de los ensayos electrofisiológicos que fueron realizados utilizando a la fracción F7 sobre los subtipos $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$, $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$ en los que se observó que la F7 inhibió selectivamente al receptor $\alpha 7$. Elaboración propia utilizando Biorender.com

Tras estos ensayos funcionales, se encontró que la fracción F7 coincide con algunas características de la subfamilia $\alpha 4/3$: 1) presencia de aminoácidos aromáticos, 2) efecto inhibitorio sobre el subtipo $\alpha 7$ y 3) selectividad por el subtipo $\alpha 7$ en comparación con algunos subtipos heteroméricos ($\alpha 3\beta 2$ y $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$). A pesar de la baja afinidad, la inhibición selectiva del receptor $\alpha 7$ puede ser aprovechada farmacológicamente en el estudio de algunas patologías.

Se ha reportado que la carcinógenesis en el tejido pulmonar se origina por la sobreactivación de los receptores nicotínicos expresados en este tejido. Particularmente se ha documentado la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ tanto en el

carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de pulmón de células no pequeñas [108]. En estas patologías, el subtipo de receptor $\alpha 7$ presenta una mayor expresión, por lo que el uso de antagonistas para este subtipo permitiría esclarecer su rol en esta patología [109]. Sin embargo, la mayoría de los inhibidores utilizados actualmente para el receptor $\alpha 7$, e.g. α -bungarotoxina, α -lml y α -cobratoxina, no son selectivos y también antagonizan otros subtipos de nAChR. En este contexto, si bien la afinidad de la fracción F7 no es alta (IC_{50} : 32.7 μ M) la selectividad observada por parte de la F7 podría ser útil al inhibir el receptor $\alpha 7$ y se podría dilucidar su rol fisiopatológico en cáncer de pulmón; de modo que la fracción F7 emerge como un producto natural con aplicaciones farmacológicas.

Para ahondar en esta posible aplicación es necesario evaluar esta fracción en más subtipos de nAChR (e.g. aquellos con subunidades $\alpha 3$ - $\alpha 6$, $\alpha 9$ - $\alpha 10$) así como en canales voltaje-dependientes a fin de detallar aún más su selectividad. Por esta razón, purificar y caracterizar bioquímicamente a esta fracción resulta crucial para conocer las características del componente activo, lo que permitiría explorar todo el potencial de esta molécula.

De los seis componentes peptídicos que constituyen a la fracción F7 (**Figura 21**), cuatro de estos componentes (F7-1 – F7-4) presentaron aminoácidos aromáticos (**Figura 22**), por lo que es posible pensar que si existe alguna conotoxina $\alpha 4/3$ en la fracción F7, se encuentre en alguna de las cuatro subfracciones que poseen aminoácidos aromáticos. El componente mayoritario en la F7 fue el denotado como F7-4 por lo que se decidió caracterizarlo bioquímicamente.

Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (**Figura 23**), se determinó una señal mayoritaria correspondiente a 3461.47 Da para el componente F7-3 (**Figura 23A**) y 3445.04 Da para el componente F7-4 (**Figura 23B**), ambas corresponden al respectivo ion +1 de cada muestra. La obtención de los pesos moleculares de ambos péptidos (F7-3 y F7-4) revela tres aspectos importantes.

En primer lugar, considerando que la masa promedio de un aminoácido es de 110 Da [51], los pesos de F7-3 y F7-4 (3461.47 y 3445.04 Da respectivamente) hacen pensar que ambos péptidos se componen aproximadamente de 31 aminoácidos, lo que representa una longitud mucho mayor la de las α -conotoxinas con arreglo de cisteínas tipo I, las cuales oscilan entre los 1500 y los 2000 Da. Este peso molecular es mucho más cercano a las conotoxinas de la superfamilia O1 como GeXIVA [110] GmVIA [111] o SrVIA [112]; aunque también se han visto pesos similares en conotoxinas de la superfamilia A como Ec1.7 [113] o Lt1.6 [114].

En segunda instancia, la diferencia de 16 Da entre F7-3 y F7-4 nos hace pensar que existe una gran similitud entre ambos péptidos, diferenciándose únicamente por la presencia de una posible hidroxilación en F7-3 [115], una modificación post-traducciona en la que se agrega un grupo hidroxilo en aminoácidos tales como prolina, lisina, arginina, histidina, fenilalanina o aspartato [116].

La hidroxilación en conotoxinas juega un papel relevante en su actividad biológica, de acuerdo con López-Vera, E. y colaboradores en 2008 [117]; la hidroxilación en la familia farmacológica μ es crucial para su función, puesto que al sustituir las hidroxiprolinas presentes en μ -GIIIA por prolinas, la afinidad del péptido por su blanco molecular (canal $Na_v1.4$) disminuye; mientras que en la familia α la hidroxilación juega un papel inverso, ya que la sustitución de prolina por hidroxiprolina en α -ImI se manifiesta en la pérdida total de la actividad del péptido.

La adición del grupo hidroxilo incrementa la polaridad en la molécula; es por esta razón que el componente F7-3 aparece primero durante la purificación a diferencia de su contraparte no hidroxilada (F7-4). Este incremento en la polaridad a su vez aumenta la capacidad de formar puentes de hidrógeno [118], mientras que en moléculas no hidroxiladas se favorecen las interacciones hidrofóbicas.

Un tercer aspecto que ya ha sido mencionado anteriormente es que la cantidad de nanomoles de F7 fue sobreestimada debido a que el cálculo se realizó utilizando como referencia 7.8 μ g de la conotoxina sintética α -RglA, cuyo peso molecular son 1570 Da. La cantidad real de nanomoles se ajustó utilizando la masa de F7-4 y esto permitió obtener una curva dosis-respuesta y calcular una IC_{50} con las evaluaciones realizadas (**Figura 23**). Aunque no se determinó la eficacia (inhibición máxima) de la fracción F7, la curva observada asemeja a un patrón sigmoideo y muestra una interacción de baja afinidad entre F7 y el receptor $ha7$, la cual se refleja también mediante la IC_{50} calculada: 32.7 μ M.

Esta elevada IC_{50} en conjunto con el peso molecular obtenido (3445.04 Da), indican que la fracción F7 no se trata de una conotoxina de la subfamilia $\alpha 4/3$ y a su vez sugiere que el subtipo $ha7$ no es el blanco molecular específico del componente de la fracción F7. Esta aseveración permite proponer tres posibilidades para el blanco molecular específico de F7: 1) que su blanco molecular sea un subtipo de nAChR expresado en poliquetos, 2) que su blanco molecular sí sea el subtipo $ha7$ pero F7 muestre una mayor afinidad por el ortólogo de peces o 3) que su blanco molecular sea distinto de los nAChR.

Ahondando en la primer posibilidad, se ha documentado la expresión de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en los anélidos poliquetos [119]. Presuntamente, en estos organismos los subtipos de nAChR que contienen estas subunidades son encargados de la actividad motora, por lo que una conotoxina activa en estos receptores tendría un efecto paralizante. De modo que si esta posibilidad fuera aplicable a F7, ésta se trataría de una conotoxina empleada en la depredación de anélidos poliquetos.

Como ejemplo de este tipo de conotoxinas encontramos a $\alpha B-VxXXIVA$ [120] la cual proviene de la especie vermívora *C. vexillum* y se ha demostrado que esta conotoxina inhibe con baja afinidad a muchos subtipos de nAChR, e.g. $\alpha 3\beta 2$ (IC_{50} : $>30 \mu M$), $\alpha 2\beta 2$ (IC_{50} : $23.4 \mu M$), $\alpha 7$ (IC_{50} : $>30 \mu M$), $r(\alpha 1)_2\beta 1\delta \gamma$ (IC_{50} : $6.6 \mu M$); mientras que por el receptor $\alpha 9\alpha 10$ su afinidad incrementa considerablemente (IC_{50} : $1.6 \mu M$). En este punto cabe mencionar que la conotoxina α -RglA es selectivamente más afín por el subtipo $\alpha 7$ (IC_{50} : $4.7 \mu M$) en comparación con otros subtipos neuronales en rata [97], pero al mismo tiempo, su afinidad es aproximadamente 900 veces mayor por el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ (IC_{50} : $5.2 nM$) [121].

Respecto de la segunda posibilidad, la variación en la afinidad de algunas conotoxinas por un mismo subtipo de receptor pero de distintas especies se ha reportado en *AusIA*, una conotoxina inhibitoria del subtipo $\alpha 7$ con una IC_{50} de $11.67 \mu M$ para el receptor de gallo ($g\alpha 7$) [122], mientras que para el receptor humano la IC_{50} es de $47 \mu M$ [123]. Otro ejemplo es la conotoxina ψ -PIIIE la cual inhibe con baja afinidad el subtipo de receptor $m(\alpha 1)_2\beta 1\delta \epsilon$ (IC_{50} : $14 \mu M$) e inhibe con una afinidad 110 veces mayor el subtipo de receptor $(\alpha 1)_2\beta 1\delta \epsilon$ de raya (*Torpedo californica*; IC_{50} : $127 nM$) [60]. Por tanto, una interacción de baja afinidad de la F7 sobre el ortólogo de receptor de humano podría ser un indicativo de que exista una afinidad mayor por el ortólogo de organismos como peces. Esta hipótesis señalaría que la fracción F7 podría ser un componente empleado por *C. archon* para defenderse de peces depredadores.

En este sentido, la **Tabla 5** muestra algunos ejemplos de conotoxinas inhibitorias sobre el subtipo de receptor $\alpha 7$ reportados en la literatura. En estos casos notamos que las conotoxinas que no pertenecen a la superfamilia A presentaron una mayor afinidad por el subtipo de receptor $\alpha 9\alpha 10$. Considerando el peso de F7 ($3445.04 Da$), es muy probable que no pertenezca a la familia A y que muestre efecto por el subtipo $\alpha 9\alpha 10$.

Tabla 5. Antagonistas del nAChR $\alpha 7$ que poseen efecto sobre otros subtipos de nAChR

Conotoxina	Familia genética	Peso molecular (Da)	IC ₅₀ $\alpha 7$ (especie)	Otros receptores blancos	Ref.
ImI	A	1351	595 nM (h)	h $\alpha 3\beta 2$ (IC ₅₀ : 40.8 nM) h $\alpha 3\beta 4$ (IC ₅₀ : 3.39 μ M)	[103]
ImII	A	1508	571 nM (h)	h $\alpha 3\beta 2$ (IC ₅₀ : 9.61 μ M) h($\alpha 1$) ₂ $\beta 1\delta\epsilon$ (IC ₅₀ : 9.5 μ M)	[103]
RglA	A	1570	4.7 μ M (r)	r $\alpha 9\alpha 10$ (IC ₅₀ : 5.1 nM) h($\alpha 1$) ₂ $\beta 1\delta\epsilon$ (IC ₅₀ : 16 μ M)	[95, 119]
ArchIIIA	M	1650	45.7 μ M (h)	h $\alpha 7\beta 2$ (Sin IC ₅₀ determinada)	[96]
GeXIVA	O1	3452	660 nM (r)	r $\alpha 9\alpha 10$ (IC ₅₀ : 4.61 nM) r $\alpha 2\beta 2$ (IC ₅₀ : 491 nM) r $\alpha 3\beta 2$ (IC ₅₀ : 480 nM) r $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ (IC ₅₀ : 806 nM)	[108]
AusIA	A	1764	11.67 μ M (g) 47 μ M (h)	N.D	[120, 121]
VxXXIVA	B3	4625	>30 μ M (r)	r $\alpha 9\alpha 10$ (IC ₅₀ : 3.15 μ M) r $\alpha 2\beta 2$ (IC ₅₀ : 23.2 μ M) r $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ (IC ₅₀ : 30.1 μ M)	[118]
GeXXA	D	5117	210 nM (h)	h $\alpha 9\alpha 10$ (IC ₅₀ : 28 nM)	[124]

N.D. No se han identificado

Finalmente, la tercera posibilidad sería que el blanco de F7 sea distinto de los nAChR y que la inhibición observada sobre el subtipo $\alpha 7$ sea debido a que este receptor posee alguna similitud estructural con el blanco molecular específico de la fracción F7. Al respecto, uno de los ejemplos que sobresale es PIXIVA, una conotoxina procedente de *C. planorbis* que presenta actividad inhibitoria sobre nAChR musculares además del canal voltaje-dependiente Kv1.6 [125]. De modo que otra posibilidad es que la fracción F7 tenga actividad sobre un canal dependiente de voltaje. Todas estas posibilidades se ilustran en la **Figura 26**.

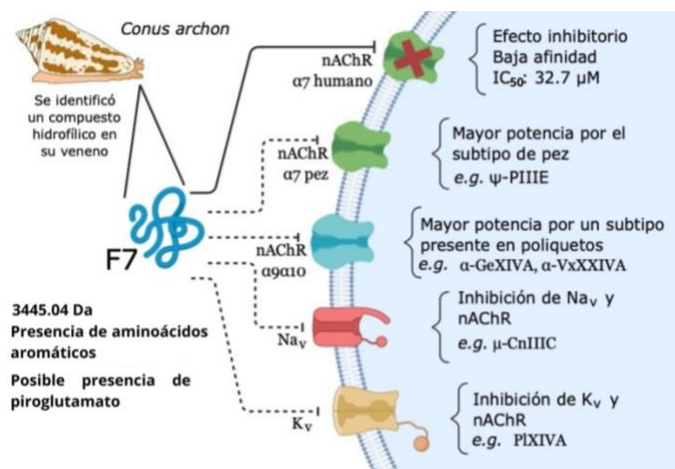


Figura 26. Principales hallazgos del análisis toxinológico realizado y perspectivas futuras. Se muestran las principales características bioquímicas y funcionales (inhibición del subtipo $\alpha 7$) mediante el uso de la fracción F7 proveniente del veneno de *C. archon*; se presentan otros posibles blancos moleculares en los que F7 pudiera actuar y que deberían estudiarse en futuros trabajos. Elaboración propia utilizando Biorender.com.

Es importante aclarar que la IC_{50} obtenida corresponde a la fracción F7 completa y, por tanto, en un futuro deben realizarse repurificaciones que permitan determinar cuál(es) componente(s) presenta(n) la actividad. Se ha reportado que la afinidad de las conotoxinas puede variar dependiendo su grado de pureza [126], ya que otros péptidos dentro de la fracción del veneno contribuyen a la cuantificación de proteína total, así como también pueden interferir en la interacción del péptido activo con el receptor.

Para esclarecer cuál es el blanco molecular específico de la fracción F7, es indispensable determinar la secuencia de aminoácidos del componente F7-4, permitiendo entonces establecer su patrón de cisteínas y comparar dicha secuencia con otras conotoxinas. Además, es de notar que al conocer la estructura de F7-4, podría ser posible el inferir la secuencia de F7-3, debido a que pensamos que estos dos péptidos pudieran diferir únicamente en una hidroxilación. Sin embargo, tras correr 10 ciclos con PITC, no se detectó la elución de PTH-aminoácidos por lo que la degradación de Edman no arrojó resultados sobre la estructura primaria de F7-4 y por ende, no fue posible obtener su secuencia de aminoácidos.

Al fenómeno en el que el PITC no puede acoplarse al extremo amino de las proteínas se le conoce como bloqueo N-terminal y ocurre debido a una modificación post-traduccional en el primer aminoácido de la proteína [127], entre las modificaciones más comunes que bloquean al extremo amino se encuentran la acetilación N-terminal [128] y la ciclación de glutamina y glutamato [129].

Esta última involucra la formación de ácido piroglutámico (Z) y es la opción más común de encontrar en conotoxinas, siendo el caso de varias conotoxinas pertenecientes a la superfamilia M que antagonizan a los canales de Na⁺ como SIIIA [130], SIIIB [131], PIIIA

[132] o CnIIIC [133], aunque también se ha reportado en conotoxinas inhibitoras de nAChR como EIIA [134] o PIB [135], ambas pertenecientes a la superfamilia A. Es de mencionar que CnIIIC además de inhibir a los canales de Na⁺, también inhibe a los nAChR con baja afinidad, por lo que es de particular relevancia en este caso [133] ya que la fracción F7 podría tener una función similar.

Otra posibilidad que podría explicar la falta de lecturas en la degradación de Edman es que F7-4 sea un péptido cíclico, de modo que el extremo amino y carboxilo del péptido estén unidos entre sí. Este tipo de estructuras, aunque raras, ya se han observado en una clase de proteínas vegetales denominadas ciclótidos, las cuales ejecutan un papel defensivo al perturbar las membranas celulares de los insectos [136]; asimismo, en el sistema inmune de algunos primates (incluidos los humanos) se han observado moléculas circulares llamadas θ -defensinas [137]. No obstante, esta opción parece ser poco probable pues las únicas conotoxinas cíclicas corresponden a versiones sintéticas y, a la fecha, no se han identificado conotoxinas circulares.

La **Tabla 6** muestra una comparación entre ArchIIIA y la fracción F7, las cuales actualmente son las únicas conotoxinas que han sido identificadas en *C. archon*. Esta comparación muestra algunos aspectos en que coinciden (aminoácidos aromáticos, blanco molecular evaluado y baja afinidad) pero existen diferencias claves respecto a la hidrofiliidad y al peso molecular experimental, siendo F7 un péptido de mayor tamaño y más hidrofílico. Si bien, como se ha discutido anteriormente, es probable que F7 pertenezca a la superfamilia M, esto no puede ser afirmado hasta conocer su secuencia de aminoácidos completa. Funcionalmente, F7 muestra una afinidad ligeramente mayor que ArchIIIA.

Tabla 6. Comparación entre los péptidos ArchIIIA y F7 provenientes del veneno de *C. archon*.

	ArchIIIA	F7
% de elución (Sol.B)	28	15
Presencia de aminoácidos aromáticos	Sí	Sí
Masa experimental	1650	3445 (F7-4)
Blanco molecular con mayor afinidad	h α 7	h α 7
IC ₅₀	45.7 μ M	32.7 μ M
Superfamilia	M	ND

ND: No determinado

Considerando todos los resultados, el presente trabajo cumplió su objetivo y amplió el estudio toxinológico de *C. archon* al identificar y caracterizar parcialmente a un componente modulador del subtipo de nAChR h α 7 de nAChR. A pesar de que al inicio del proyecto se especuló que dicho componente pudiera ser alguna de las conotoxinas α 4/3 predichas para *C. archon*, el peso molecular en conjunto con la baja afinidad

mostrada por el blanco evaluado sugieren que el componente activo de la fracción F7 pudiera tratarse de otro tipo de conotoxinas.

Para determinar la clasificación (superfamilia genética, arreglo de cisteínas y blanco molecular específico) a la que pertenece el componente activo de la fracción F7, en un futuro se plantea obtener su secuencia de aminoácidos completa así como realizar ensayos funcionales en otros subtipos de nAChR y en canales iónicos voltaje-dependientes, tanto de Na⁺ como de K⁺, permitiendo aumentar la caracterización funcional iniciada en este trabajo.

A reserva de su clasificación, la interacción estadísticamente significativa observada entre el componente F7 y el receptor $\alpha 7$ a una concentración de 22.84 μ M, así como su selectividad, abren la posibilidad de que el componente activo en la fracción F7 puede tener aplicaciones farmacológicas para el estudio y/o tratamiento en modelos de cáncer de pulmón.

Por lo tanto, el continuar el estudio de la fracción F7 identificada en el presente trabajo permitirá ahondar en las aplicaciones expuestas así como continuar estudiando la biología de *Conus archon*.

9 Conclusiones

- Se identificó un componente hidrofílico en el veneno de *C. archon*, denominado como F7 el cual mostró tener una actividad inhibitoria sobre el subtipo de nAChR $\alpha 7$ nAChR.
- La fracción F7 además mostró ser selectiva por el nAChR $\alpha 7$ respecto a los subtipos m($\alpha 1$)₂ $\beta 1\delta\epsilon$ y $\alpha 3\beta 2$ al ser evaluado a 22.84 μ M, ya que únicamente la interacción de la fracción con el subtipo $\alpha 7$ tuvo diferencias estadísticamente significativas respecto a su control.
- La fracción F7 se repurificó y se determinó que está constituida por 6 componentes. La masa molecular del componente mayoritario (F7-4) fue de 3445.04 Da.
- No fue posible obtener la estructura primaria de F7-4 y esto puede deberse a que el extremo N-terminal de F7-4 se encuentre bloqueado por la presencia de ácido piroglutámico.
- La IC₅₀ preeliminar de F7 para el subtipo $\alpha 7$ fue de 32.7 μ M.
- Se observó una variación intersexual en la cantidad de veneno sintetizada por parte de hembras con respecto a los machos de *C. archon*.

10 Perspectivas

- Completar la caracterización bioquímica del componente F7-4, dilucidando su secuencia de aminoácidos, lo que permitiría determinar a que superfamilia genética pertenece y su arreglo de cisteínas.
- Sintetizar químicamente al componente F7-4 para evaluar al péptido puro sobre el subtipo de nAChR $\alpha 7$ y discernir si la actividad de éste péptido se ajusta a la ya caracterizada de la fracción F7.
- Evaluar al componente F7-4 sobre otros subtipos de nAChR, particularmente en aquellos con subunidades $\alpha 9$; así como en otros receptores y canales iónicos para determinar si existe un blanco molecular más específico.
- Caracterizar la interacción entre la conotoxina proveniente de la fracción F7 del veneno de *C. archon* y su blanco molecular.
- Determinar si el componente F7-4 corresponde a una conotoxina utilizada para defensa o para depredación.

11 Referencias

[1] Sala, E., Mayorga, J., Bradley, D., Cabral, R. B., Atwood, T. B., Auber, A., Cheung, W., Costello, C., Ferretti, F., Friedlander, A. M., Gaines, S. D., Garilao, C., Goodell, W., Halpern, B. S., Hinson, A., Kaschner, K., Kesner-Reyes, K., Leprieur, F., McGowan, J., ... Lubchenco, J. (2021). Protecting the global ocean for biodiversity, food and climate. *Nature*, 592(7854), 397–402. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03371-z>

[2] Leary, D., Vierros, M., Hamon, G., Arico, S., & Monagle, C. (2009). Marine genetic resources: A review of scientific and commercial interest. *Marine Policy*, 33(2), 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2008.05.010>

[3] Montaser, R., & Luesch, H. (2011). Marine natural products: a new wave of drugs?. *Future Medicinal Chemistry*, 3(12), 1475–1489. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.118>

[4] De la Calle, F. (2007). Fármacos de origen marino. *Treballs de la SCB*, 58, 141-155
DOI: 10.2436/20.1501.02.50

[5] Jin, A.-H., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Himaya, S. W. A., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J., & Alewood, P. F. (2019). Conotoxins: Chemistry and biology. *Chemical Reviews*, 119(21), 11510–11549. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00207>

[6] Ramasamy, S., Manavalan, G., & Santhanam, R. (2019). *Biology and ecology of pharmaceutical marine mollusks* (1^{ra} edición). CRC Press.

- [7] Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28-33. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>
- [8] Bordon, K. de C. F., Cologna, C. T., Fornari -Baldo, E. C., Pinheiro-Júnior, E. L., Cerni, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., Cordeiro, F. A., Wiezel, G. A., Cardoso, I. A., Ferreira, I. G., de Oliveira, I. S., Boldrini -França, J., Pucca, M. B., Bal do, M. A., & Arantes, E. C. (2020). From animal poisons and venoms to medicines: Achievements, challenges and perspectives in drug discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11(1132), 1-29. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01132>
- [9] Edstrom, A. (1992). *Venomous and poisonous animals* (1^{ra} edición). Krieger Publishing Company.
- [10] Cope, W, Leidy, R. & Hodgson, E. (2004). Classes of toxicants: Uses classes. En: E. Hodgson (Ed.). *A textbook of modern toxicology* (3^{ra} ed, pp. 49-74). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0471646776>
- [11] Harvey, A. L. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 92, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.020>
- [12] Ferguson, R. K., & Vlasses, P. H. (1981). Clinical pharmacology and therapeutic applications of the new oral angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril. *American Heart Journal*, 101(5), 650–656. [https://doi.org/10.1016/00028703\(81\)90233-7](https://doi.org/10.1016/00028703(81)90233-7)
- [13] Ferreira, S. H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of Bothrops jararaca. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 24(1), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x>
- [14] Adams, D. J., Callaghan, B., & Berecki, G. (2012). Analgesic conotoxins: block and G protein-coupled receptor modulation of N-type (CaV2.2) calcium channels. *British Journal of Pharmacology*, 166(2), 486–500. <https://doi.org/10.1111/j.14765381.2011.01781.x>
- [15] Parkhaev, P. Y. (2017). Origin and the early evolution Mollusca. *Paleontological Journal*, 51(6), 91-112. <https://doi.org/10.1134/s003103011706003x>
- [16] Brusca, R. C., Moore, W & Shuster, S. M. (2017). *Invertebrates* (3^{ra} ed.). Oxford University Press.

- [17] Roberts, L. S., Hickman, C. P., Jr, Keen, S. L., Larson, A., I'anson, H., & Eisenhour, D. J. (2007). *Integrated principles of zoology* (14a ed.). McGraw-Hill Companies.
- [18] Cuezco, M. G., Gutiérrez Gregoric, D. E., Pointier, J. -P., Vázquez, A. A., Ituarte, C., Dreher Mansur, M. C., Arruda, J. O., Barker, G. M., dos Santos, S. B., Ovando, X. M. C., de Lacerda, L. E. M., Fernandez, M. A., Thiengo, S. C., de Mattos, A. C., da Silva, E. F., Berning, M. I., Collado, G. A., Miyahira, I. C., Antoniazzi, T. N., ... Damborenea, C. (2020). Phylum Mollusca. En: Damborenea, C., Thorp, J. & Rogers, D. (Eds.). *Freshwater Invertebrates* (4^{ta} ed., Vol. 5, pp. 261–430). Elsevier.
- [19] Ponder, W. F., Lindberg, D. R., & Ponder, J. M. (2020). *Biology and evolution of the Mollusca* (1^{ra} edición). CRC Press.
- [20] Zuschin, M., Hohenegger, J., & Steininger, F. (2001). Molluscan assemblages on coral reefs and associated hard substrata in the northern Red Sea. *Coral Reefs*, 20(2), 107–116. <https://doi.org/10.1007/s003380100140>
- [21] Schwabe, E., Michael Bohn, J., Engl, W., Linse, K., & Schrödl, M. (2007). Rich and rare—First insights into species diversity and abundance of Antarctic abyssal Gastropoda (Mollusca). Deep-Sea Research. Part II, *Topical Studies in Oceanography*, 54(16–17), 1831–1847. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2007.07.010>
- [22] Castillo-Rodríguez, Z. G. (2014). Biodiversidad de moluscos marinos en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 419–430. <https://doi.org/10.7550/rmb.33003>
- [23] Lydeard, C., Yeung, N., & Lindberg, D. R. (2024). Molluscs. En: Scheiner, S. (Ed.) *Encyclopedia of Biodiversity* (3^{ra} ed., Vol. 2, pp. 438–452). Elsevier.
- [24] Chen, Z.-H., Guo, Y.-W., & Li, X.-W. (2023). Recent advances on marine mollusk-derived natural products: chemistry, chemical ecology and therapeutical potential. *Natural Product Reports*, 40(3), 509–556. <https://doi.org/10.1039/d2np00021k>
- [25] Bornancin, L., Bonnard, I., Mills, S. C., & Banaigs, B. (2017). Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. *Natural Product Reports*, 34(6), 644–676. <https://doi.org/10.1039/c6np00097e>
- [26] Brown, K. M., & Lydeard, C. (2010). Mollusca. En: Thorp, J. & Covich, A. (Eds.). *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* (3^{ra} ed., pp. 277–306). Elsevier.

- [27] Sao Mai, D. (2014). Shellfish (molluscs and crustacea) characteristics of the groups. En: Batt, C. & Tortorello, M. (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology* (2^{da} ed., Vol. 3, pp. 376–388). Elsevier.
- [28] Page, L. R. (2003). Gastropod ontogenetic torsion: Developmental remnants of an ancient evolutionary change in body plan. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 297B(1), 11-26, <https://doi.org/10.1002/jez.b.12>
- [29] Moore, J. (2006). An introduction to the invertebrates (2^{da} ed.). Cambridge University Press.
- [30] Webber, H. H. (1977). GASTROPODA: PROSOBRANCHIA. En: Giese, A. & Pierce, J. (Eds.). *Reproduction of Marine Invertebrates* (Vol. 4, pp. 1–97). Elsevier.
- [31] Strong, E. E. (2003). Refining molluscan characters: morphology, character coding and a phylogeny of the Caenogastropoda. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137(4), 447–554. <https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00058.x>
- [32] Modica, M. V., & Holford, M. (2010). The Neogastropoda: Evolutionary innovations of predatory marine snails with remarkable pharmacological potential. En: Pontarotti, P. (Ed.). *Evolutionary Biology – Concepts, Molecular and Morphological Evolution* (1^{ra} edición, pp. 249–270). Springer Berlin Heidelberg.
- [33] Duda, T. F., Jr, Kohn, A. J., & Palumbi, S. R. (2001). Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological journal of the Linnean Society. Linnean Society of London*, 73(4), 391–409. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01369.x>
- [34] Puillandre, Nicolas, & Dutertre, S. (2018). The conoidea and their toxins: Evolution of a hyper-diversified group. En: Grandcolas, P. & Maurel, M. (Eds.). *Biodiversity and Evolution* (1^{ra} edición, pp. 227–249). Elsevier.
- [35] Puillandre, N., Bouchet, P., Duda, T. F., Jr, Kaufenstein, S., Kohn, A. J., Olivera, B. M., Watkins, M., & Meyer, C. (2014). Molecular phylogeny and evolution of the cone snails (Gastropoda, Conoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78, 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.05.023>

- [36] Uribe, J. E., Puillandre, N., & Zardoya, R. (2017). Beyond *Conus*: Phylogenetic relationships of Conidae based on complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.10.008>
- [37] Dutertre, S. & Lewis, J. (2013) Cone snail biology, bioprospecting and conservation. En: Emil M. Hämäläinen, Sofia Järvinen (Eds.). *Snails: biology, ecology and conservation* (1^{ra} edición, pp. 1-15), Nova Science Publishers. hal-02306901
- [38] Duda, T. F., Jr, & Kohn, A. J. (2005). Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(2), 257–272. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.09.012>
- [39] Olivera, B. M. (1997). E.E. just lecture, 1996: *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell*, 8(11), 2101–2109. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.11.2101>
- [40] Dutertre, S., Griffin, J., & Lewis, R. J. (2016). Phyla mollusca: The venom apparatus of cone snails. En: Gopalakrishnakone, P., Haddad, V., Tubaro, A., Kim, E. & Kem, W. (Eds.) *Marine and Freshwater Toxins* (1^{ra} edición, pp. 327–340). Springer Netherlands.
- [41] Zhao, Y., & Antunes, A. (2022). Biomedical potential of the neglected molluscivorous and vermivorous *Conus* species. *Marine Drugs*, 20(2), 105. 1-16. <https://doi.org/10.3390/md20020105>
- [42] 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., & Lewis, R. J. (2014). Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature Communications*, 5(1), 3521. <https://doi.org/10.1038/ncomms4521>
- [43] Tenorio, M.J. (2013). *Conus archon*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013:e.T192837A2170758.<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20131.RLTS.T192837A2170758.en>.
- [44] Vink, D. L. N., & Von Cosel, R. (1985). The *Conus cedonulli* complex: Historical review, taxonomy and biological observations. *Revue suisse de zoologie; annales de la Societe zoologique suisse et du Museum d'histoire naturelle de Geneve*, 92, 525–603. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.81894>

- [45] Davis, J., Jones, A., & Lewis, R. J. (2009). Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. *Peptides*, 30(7), 1222–1227. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.03.019>
- [46] Wong, E. S. W., & Belov, K. (2012). Venom evolution through gene duplications. *Gene*, 496(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.009>
- [47] Robinson, S., & Norton, R. (2014). Conotoxin gene superfamilies. *Marine Drugs*, 12(12), 6058–6101. <https://doi.org/10.3390/md12126058>
- [48] Olivera, B. M. (2002). *Conus* venom peptides: Reflections from the biology of clades and species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 25–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150424>
- [49] Buczek, O., Olivera, B. M., & Bulaj, G. (2004). Propeptide does not act as an intramolecular chaperone but facilitates protein disulfide isomerase-assisted folding of a conotoxin precursor. *Biochemistry*, 43(4), 1093–1101. <https://doi.org/10.1021/bi0354233>
- [50] Zamora-Bustillos, R., Martínez-Núñez, M. A., Aguilar, M. B., Collí-Dula, R. C., & Brito-Domínguez, D. A. (2021). Identification of novel conotoxin precursors from the cone snail *Conus spurius* by high-throughput RNA sequencing. *Marine Drugs*, 19(10), 547. <https://doi.org/10.3390/md19100547>
- [51] Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2012). *Bioquímica* (7^{ma} ed.). Reverte.
- [52] Trivedi, M., Laurence, J., & Siahaan, T. (2009). The role of thiols and disulfides on protein stability. *Current Protein & Peptide Science*, 10(6), 614–625. <https://doi.org/10.2174/138920309789630534>
- [53] Kaas, Q., Westermann, J.-C., & Craik, D. J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 55(8), 1491–1509. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.002>
- [54] Jimenez, E. C. (2021). Post-translationally modified conopeptides: Biological activities and pharmacological applications. *Peptides*, 139(170525), 170525. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170525>

- [55] Lewis, R. J. (2009). Conotoxins: Molecular and therapeutic targets. En: Fusetami, N. & Kem, W. (Eds.). *Marine Toxins as Research Tools* (1^{ra} edición, pp. 45–65). Springer Berlin Heidelberg.
- [56] Mondal, S., Vijayan, R., Shichina, K., Babu, R. M., & Ramakumar, S. (2005). I superfamily conotoxins: sequence and structure analysis. *In Silico Biology*, 5(5–6), 557–571.
- [57] Layer, R., & McIntosh, J. (2006). Conotoxins: Therapeutic potential and application. *Marine Drugs*, 4(3), 119–142. <https://doi.org/10.3390/md403119>
- [58] Fiedler, B., Zhang, M.-M., Buczek, O., Azam, L., Bulaj, G., Norton, R. S., Olivera, B. M., & Yoshikami, D. (2008). Specificity, affinity and efficacy of iota-conotoxin RXIA, an agonist of voltage-gated sodium channels NaV1.2, 1.6 and 1.7. *Biochemical Pharmacology*, 75(12), 2334–2344. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.019>
- [59] Arias, H. R., & Blanton, M. P. (2000). A-conotoxins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(10), 1017–1028. [https://doi.org/10.1016/s13572725\(00\)00051-0](https://doi.org/10.1016/s13572725(00)00051-0)
- [60] Shon, K. J., Grilley, M., Jacobsen, R., Cartier, G. E., Hopkins, C., Gray, W. R., Watkins, M., Hillyard, D. R., Rivier, J., Torres, J., Yoshikami, D., & Olivera, B. M. (1997). A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry*, 36(31), 9581–9587. <https://doi.org/10.1021/bi970235w>
- [61] Mueller, A., Starobova, H., Inserra, M. C., Jin, A.-H., Deuis, J. R., Dutertre, S., Lewis, R. J., Alewood, P. F., Daly, N. L., & Vetter, I. (2015). α -Conotoxin MrIC is a biased agonist at $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 94(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.01.011>.
- [62] Schroeder, C. I., & Craik, D. J. (2012). Therapeutic potential of conopeptides. *Future Medicinal Chemistry*, 4(10), 1243–1255. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.70>
- [63] Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 89(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>

- [64] He, G., Li, Y., Deng, H., & Zuo, H. (2023). Advances in the study of cholinergic circuits in the central nervous system. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 10(12), 2179–2191. <https://doi.org/10.1002/acn3.51920>
- [65] Lindstrom, J. M. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: Comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 998(1), 41–52. <https://doi.org/10.1196/annals.1254.007>
- [66] Sharma, G., & Vijayaraghavan, S. (2002). Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 524–534. <https://doi.org/10.1002/neu.10114>
- [67] Labarca, C., Nowak, M. W., Zhang, H., Tang, L., Deshpande, P., & Lester, H. A. (1995). Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the M2 domain of nicotinic receptors. *Nature*, 376(6540), 514–516. <https://doi.org/10.1038/376514a0>
- [68] Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., & Gotti, C. (2018). Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Current Neuropharmacology*, 16(4), 338–349. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170912110450>
- [69] Cetin, H., Beeson, D., Vincent, A., & Webster, R. (2020). The structure, function, and physiology of the fetal and adult acetylcholine receptor in muscle. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13(581097). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.581097>
- [70] Dani, J. A., & Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 699–729. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>
- [71] Le Novère, N., Corringier, P. J., & Changeux, J. P. (1999). Improved secondary structure predictions for a nicotinic receptor subunit: incorporation of solvent accessibility and experimental data into a two-dimensional representation. *Biophysical Journal*, 76(5), 2329–2345. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77390-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77390-X)
- [72] Changeux, J.-P., & Paas, Y. (2009). Nicotinic Acetylcholine Receptors. En: Squire, L. (Ed.). *Encyclopedia of Neuroscience* (1^{ra} edición, pp. 1129–1133). Elsevier.
- [73] Brejc, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B., & Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-

binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 411(6835), 269–276. <https://doi.org/10.1038/35077011>

[74] Tsetlin, V., Kuzmin, D., & Kasheverov, I. (2011). Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *Journal of Neurochemistry*, 116(5), 734–741. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07060.x>

[75] Connolly, C. N., & Wafford, K. A. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt3), 529–534. <https://doi.org/10.1042/BST0320529>

[76] Becchetti, A., Grandi, L. C., Cerina, M., & Amadeo, A. (2023). Nicotinic acetylcholine receptors and epilepsy. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 189(106698), 106698. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106698>

[77] Li, L., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2018). Neuromuscular junction formation, aging, and disorders. *Annual Review of Physiology*, 80(1), 159–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>

[78] Hill, R., Wyse, A. & Anderson, M. (2012). *Animal Physiology* (3a ed.). Sinauer Associates.

[79] Bouzat, C., Lasala, M., Nielsen, B. E., Corradi, J., & Esandi, M. del C. (2018). Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *The Journal of Physiology*, 596(10), 1847–1861. <https://doi.org/10.1113/jp275101>

[80] Elgoyhen, A. B. (2023). The $\alpha 9\alpha 10$ acetylcholine receptor: A non-neuronal nicotinic receptor. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 190(106735), 106735. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106735>

[81] Tsunoyama, K., & Gojobori, T. (1998). Evolution of nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Molecular Biology and Evolution*, 15(5), 518–527. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025951>

[82] Le Novère, Nicolas, Corringer, P.-J., & Changeux, J.-P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences: Effect of Subunit Composition on nAChRs Function. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 447–456. <https://doi.org/10.1002/neu.10153>

- [83] Jimenez, E. C., & Cruz, L. J. (2017). Conotoxins as tools in research on nicotinic receptors. En: Gopalakrishnakone, P., Cruz, L. & Luo, S. (Eds.). *Toxins and Drug Discovery* (1^{ra} edición, pp. 189–204). Springer Netherlands.
- [84] Santos, A. D., McIntosh, J. M., Hillyard, D. R., Cruz, L. J., & Olivera, B. M. (2004). The A-superfamily of conotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17596–17606. <https://doi.org/10.1074/jbc.m309654200>
- [85] Norton, R. S., & Olivera, B. M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 48(7), 780–798. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.022>
- [86] Gray, W. R., Luque, A., Olivera, B. M., Barrett, J., & Cruz, L. J. (1981). Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4734–4740. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)69313-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)69313-0)
- [87] Dudel, J. (2014). α -Conotoxin M1 (CTx) blocks $\alpha\delta$ binding sites of adult nicotinic receptors while ACh binding at $\alpha\epsilon$ sites elicits only small and short quantal synaptic currents. *Physiological Reports*, 2(12), e12188. <https://doi.org/10.14814/phy2.12188>
- [88] Favreau, P., Krimm, I., Le Gall, F., Bobenrieth, M.-J., Lamthanh, H., Bouet, F., Servent, D., Molgo, J., Ménez, A., Letourneux, Y., & Lancelin, J.-M. (1999). Biochemical characterization and nuclear magnetic resonance structure of novel α -conotoxins isolated from the venom of *Conus consors*. *Biochemistry*, 38(19), 6317–6326. <https://doi.org/10.1021/bi982817z>
- [89] Wilhelm, P., Luna-Ramirez, K., Chin, Y. K.-Y., Dekan, Z., Abraham, N., Tae, H.-S., Chow, C. Y., Eagles, D. A., King, G. F., Lewis, R. J., Adams, D. J., & Alewood, P. F. (2022). Cysteine-rich α -conotoxin SII displays novel interactions at the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(8), 1245–1250. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00857>
- [90] Ning, J., Ren, J., Xiong, Y., Wu, Y., Zhangsun, M., Zhangsun, D., Zhu, X., & Luo, S. (2019). Identification of crucial residues in α -conotoxin EI inhibiting muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Toxins*, 11(10), 603. <https://doi.org/10.3390/toxins11100603>
- [91] Nicke, A., Loughnan, M. L., Millard, E. L., Alewood, P. F., Adams, D. J., Daly, N. L., Craik, D. J., & Lewis, R. J. (2003). Isolation, structure, and activity of GlD, a novel $\alpha 4/7$ -

conotoxin with an extended N-terminal sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3137–3144. <https://doi.org/10.1074/jbc.m210280200>

[92] López-Vera, E., Aguilar, M. B., Schiavon, E., Marinzi, C., Ortiz, E., Restano Cassulini, R., Batista, C. V. F., Possani, L. D., Heimer de la Cotera, E. P., Peri, F., Becerril, B., & Wanke, E. (2007). Novel α -conotoxins from *Conus spurius* and the α -conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *The FEBS Journal*, 274(15), 3972–3985. <https://doi.org/10.1111/j.17424658.2007.05931.x>

[93] Luo, S., Zhangsun, D., Schroeder, C. I., Zhu, X., Hu, Y., Wu, Y., Weltzin, M. M., Eberhard, S., Kaas, Q., Craik, D. J., McIntosh, J. M., & Whiteaker, P. (2014). A novel $\alpha 4/7$ -conotoxin LvIA from *Conus lividus* that selectively blocks $\alpha 3\beta 2$ vs. $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nicotinic acetylcholine receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(4), 1842–1853. <https://doi.org/10.1096/fj.13-244103>

[94] Ellison, M. & Olivera, B. M. (2007). $\alpha 4/3$ Conotoxins: phylogenetic distribution, functional properties, and structure–function insights. *Chemical Record (New York, N.Y.)*, 7(6), 341–353. <https://doi.org/10.1002/tcr.20131>

[95] McIntosh, J. M., Yoshikami, D., Mahe, E., Nielsen, D. B., Rivier, J. E., Gray, W. R., & Olivera, B. M. (1994). A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, alpha-conotoxin Iml. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(24), 16733–16739. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)89452-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)89452-8)

[96] Ellison, M., McIntosh, J. M., & Olivera, B. M. (2003). A-conotoxins Iml and ImII. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 757–764. <https://doi.org/10.1074/jbc.m204565200>

[97] Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M. E., Watkins, M., Elgoyhen, A. B., McIntosh, J. M., & Olivera, B. M. (2006). A-RglA: A novel conotoxin that specifically and potently blocks the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. *Biochemistry*, 45(5), 1511–1517. <https://doi.org/10.1021/bi0520129>

[98] Hernández-Sámano, A. C., Falcón, A., Zamudio, F., Michel -Morfín, J. E., L Jaime, V., López-Vera, E., Jeziorski, M. C., & Aguilar, M. B. (2022). A short framework-III (mini-M-2) conotoxin from the venom of a vermivorous species, *Conus archon*, inhibits human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Peptides*, 153(170785), 170785. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170785>

- [99] Rodriguez-Ruiz, X. C., Aguilar, M. B., Ortíz-Arellano, M. A., SafaviH., & López-Vera, E. (2022). A novel dimeric conotoxin, FrXXA, from the vermivorous cone snail *Conus fergusonii*, of the Eastern Pacific, inhibits nicotinic acetylcholine receptors. *Toxins*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/toxins14080510>
- [100] Guan, B., Chen, X., & Zhang, H. (2013). Two-electrode voltage clamp. En: Clifton, N. (Ed.). *Methods in Molecular Biology* (1^{ra} edición, pp. 79–89). https://doi.org/10.1007/978-1-62703351-0_6
- [101] Vianna Braga, M. C., Konno, K., Portaro, F. C. V., de Freitas, J. C., Yamane, T., Olivera, B. M., & Pimenta, D. C. (2005). Mass spectrometric and high-performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusk *Conus regius*: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 45(1), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.09.018>
- [102] Milisen, J. (2012). Conopeptide production through biosustainable snail farming [Tesis de Maestría, Universidad de Hawaii]. M.S. Molecular bioscience and bioengineering. <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/items/63e581c0-735c-4d72-892b-9df310ce6396>
- [103] Lin, Z., Torres, J. P., Watkins, M., Paguigan, N., Niu, C., Imperial, J. S., Tun, J., Safavi-Hemami, H., Finol-Urdaneta, R. K., Neves, J. L. B., Espino, S., Karthikeyan, M., Olivera, B. M., & Schmidt, E. W. (2021). Non-peptidic small molecule components from cone snail venoms. *Frontiers in pharmacology*, 12(655981). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.655981>
- [104] Wu, J., & Lukas, R. J. (2011). Naturally expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 800–807. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.067>
- [105] Ellison, M., Gao, F., Wang, H.-L., Sine, S. M., McIntosh, J. M., & Olivera, B. M. (2004). A-conotoxins Iml and ImII target distinct regions of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes. *Biochemistry*, 43(51), 16019–16026. <https://doi.org/10.1021/bi048918g>
- [106] Wilson, D. T., Bansal, P. S., Carter, D. A., Vetter, I., Nicke, A., Dutertre, S., & Daly, N. L. (2020). Characterization of a novel A-superfamily conotoxin. *Biomedicines*, 8(5), 128. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050128>

- [107] McIntosh, J. M., Hasson, A., Spira, M. E., Gray, W. R., Li, W., Marsh, M., Hillyard, D. R., & Olivera, B. M. (1995). A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(28), 16796–16802. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16796>
- [108] Improgo, M. R., Tapper, A. R., & Gardner, P. D. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 1015–1021. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.020>
- [109] Arunrungvichian, K., Vajragupta, O., Hayakawa, Y., & Pongrakhananon, V. (2024). Targeting Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in lung cancer: Insights, challenges, and therapeutic strategies. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 7(1), 28–41. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.3c00138>
- [110] 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., & McIntosh, J. M. (2015). Cloning, synthesis, and characterization of α O-conotoxin GeXIVA, a potent α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.1503617112>
- [111] Shon, K. J., Hasson, A., Spira, M. E., Cruz, L. J., Gray, W. R., & Olivera, B. M. (1994). Delta-conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry*, 33(38), 11420–11425. <https://doi.org/10.1021/bi00204a003>
- [112] Luna-Ramírez, K. S., Aguilar, M. B., Falcón, A., Heimer de la Coteria, E. P., Olivera, B. M., & Mailló, M. (2007). An O-conotoxin from the vermivorous *Conus spurius* active on mice and mollusks. *Peptides*, 28(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.08.025>
- [113] Wu, Y., Wang, L., Zhou, M., You, Y., Zhu, X., Qiang, Y., Qin, M., Luo, S., Ren, Z., & Xu, A. (2013). Molecular evolution and diversity of *Conus* peptide toxins, as revealed by gene structure and intron sequence analyses. *PloS One*, 8(12), e82495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082495>
- [114] Li, X., Chen, W., Zhangsun, D., & Luo, S. (2020). Diversity of conopeptides and their precursor genes of *Conus litteratus*. *Marine Drugs*, 18(9), 464. <https://doi.org/10.3390/md18090464>

- [115] Zurlo, G., Guo, J., Takada, M., Wei, W., & Zhang, Q. (2016). New insights into protein hydroxylation and its important role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1866(2), 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.09.004>
- [116] Raju, T. S. (2019). Co- and post-translational modifications of therapeutic antibodies and proteins. John Wiley & Sons.
- [117] Lopez-Vera, E., Walewska, A., Skalicky, J. J., Olivera, B. M., & Bulaj, G. (2008). Role of hydroxyprolines in the in vitro oxidative folding and biological activity of conotoxins. *Biochemistry*, 47(6), 1741–1751. <https://doi.org/10.1021/bi701934m>
- [118] Franco, A., Pisarewicz, K., Moller, C., Mora, D., Fields, G. B., & Marí, F. (2006). Hyperhydroxylation: A new strategy for neuronal targeting by venomous marine molluscs. En: *Molluscs* (pp. 83–103). Springer Berlin Heidelberg
- [119] Jékely, G., Colombelli, J., Hausen, H., Guy, K., Stelzer, E., Nédélec, F., & Arendt, D. (2008). Mechanism of phototaxis in marine zooplankton. *Nature*, 456(7220), 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature07590>
- [120] Luo, S., Christensen, S., Zhangsun, D., Wu, Y., Hu, Y., Zhu, X., Chhabra, S., Norton, R. S., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054648>
- [121] Vincler, M., Wittenauer, S., Parker, R., Ellison, M., Olivera, B. M., & McIntosh, J. M. (2006). Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), 17880–17884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608715103>
- [122] Lebbe, E. K. M., Peigneur, S., Maiti, M., Mille, B. G., Devi, P., Ravichandran, S., Lescrinier, E., Waelkens, E., D'Souza, L., Herdewijn, P., & Tytgat, J. (2014). Discovery of a new subclass of α -conotoxins in the venom of *Conus australis*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 91, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.074>
- [123] Ho, T. N. T., Abraham, N., & Lewis, R. J. (2021). Rigidity of loop 1 contributes to equipotency of globular and ribbon isomers of α -conotoxin AusIA. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01277-4>

- [124] 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(1), 14261. <https://doi.org/10.1038/srep14261>
- [125] 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., & Olivera, B. M. (2006). A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry*, 45(27), 8331–8340. <https://doi.org/10.1021/bi060263r>
- [126] Cruz, L. J., Gray, W. R., Olivera, B. M., Zeikus, R. D., Kerr, L., Yoshikami, D., & Moczydlowski, E. (1985). *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(16), 9280–9288. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)39364-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)39364-x)
- [127] Mozdzanowski, J. (2003). Deblocking of Proteins Containing N-Terminal Pyroglutamic Acid. En: *Protein Sequencing Protocols* (pp. 365–369). Humana Press.
- [128] Chen, L., & Kashina, A. (2021). Post-translational modifications of the protein termini. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.719590>
- [129] Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H.-U. (2004). Glutamyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Letters*, 563(1–3), 191–196. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(04\)00300-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(04)00300-x)
- [130] Wang, C.-Z., Zhang, H., Jiang, H., Lu, W., Zhao, Z.-Q., & Chi, C.-W. (2006). A novel conotoxin from *Conus striatus*, μ -SIIIA, selectively blocking rat tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 47(1), 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.008>
- [131] Schroeder, C. I., Ekberg, J., Nielsen, K. J., Adams, D., Loughnan, M. L., Thomas, L., Adams, D. J., Alewood, P. F., & Lewis, R. J. (2008). Neuronally selective μ -conotoxins from *Conus striatus* utilize an α -helical motif to target mammalian sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21621–21628. <https://doi.org/10.1074/jbc.m802852200>
- [132] Shon, K.-J., Olivera, B. M., Watkins, M., Jacobsen, R. B., Gray, W. R., Floresca, C. Z., Cruz, L. J., Hillyard, D. R., Brink, A., Terlau, H., & Yoshikami, D. (1998). M-conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *The*

Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 18(12), 4473–4481. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-12-04473.1998>

[133] 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., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01837.x>

[134] Quinton, L., Servent, D., Girard, E., Molgó, J., Le Caer, J.-P., Malosse, C., Haidar, E. A., Lecoq, A., Gilles, N., & Chamot-Rooke, J. (2013). Identification and functional characterization of a novel α -conotoxin (EIIA) from *Conus ermineus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(15), 5341–5351. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6926-x>

[135] López-Vera, E., Jacobsen, R. B., Ellison, M., Olivera, B. M., & Teichert, R. W. (2007). A novel alpha conotoxin (α -PIB) isolated from *C. purpurascens* is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(8), 1193–1199. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.007>

[136] Gould, A., & Camarero, J. A. (2017). Cyclotides: Overview and biotechnological applications. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 18(14), 1350–1363. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700153>

[137] Thorstholm, L., & Craik, D. J. (2012). Discovery and applications of naturally occurring cyclic peptides. *Drug Discovery Today. Technologies*, 9(1), e13–e21. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.07.005>