

TESIS DEFENDIDA POR
Oscar Martínez Galván
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director del Comité

Dra. Idania Valdez Vazquez
Miembro del Comité

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias de la Vida con Orientación en
Biotecnología Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

13 de diciembre de 2010.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN BOTECNOLOGÍA MARINA**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DEL CARACOL MARINO
*Conus regularis***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

OSCAR MARTÍNEZ GALVÁN

Ensenada, Baja California, México, diciembre del 2010.

RESUMEN de la tesis de **Oscar Martínez Galván**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Noviembre del 2010

Caracterización Bioquímica del Veneno del Caracol Marino *Conus regularis*

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro
Director de Tesis

Los caracoles pertenecientes al género *Conus* producen venenos que por su composición, estructura y función, son altamente sofisticados, están constituidos por moléculas pequeñas de 10 a 40 aminoácidos y pueden tener hasta 200 componentes peptídicos en su veneno; actúan sobre blancos moleculares específicos y presentan modificaciones post-traduccionales en su estructura, lo que les proporciona estabilidad y algunas de ellas, están involucradas en su función.

En el presente trabajo, se caracterizaron bioquímicamente los componentes mayoritarios del veneno de *Conus regularis*, que habita en el Golfo de California, lo que permitirá ofrecer nuevos recursos farmacológicos para el estudio de canales iónicos. El veneno fue fraccionado por HPLC-RP, obteniendo siete componentes mayoritarios, los cuales fueron purificados y sometidos a espectrometría de masas, las fracciones en un rango de 1500 a 13000 Da. Se realizó la secuenciación de aminoácidos de una de ellas, CR20a. La secuencia nos indica que es componente peptídico de 38 aminoácidos, con un arreglo de cisteínas descrito para la superfamilia de la O-conotoxinas, con posible blanco molecular sobre canales de Ca^{2+} . A este compuesto se le propone nombrarlo Re6a.

Palabras Clave: *Conus regularis*, veneno, espectrometría de masas, conotoxina, modificación postraducciona.

ABSTRACT of the thesis presented by **Oscar Martínez Galván** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México. November 2010.

Biochemical Characterization of the Marine Snail Venom *Conus regularis*

The venom of the *Conus* snails, is a highly sophisticated compound by means of its composition, structure and function. The venom contains small molecules from 10 to 40 amino acids, and about 200 different peptide components, these peptides, can act on specific molecular targets and present post-translational modifications on its structure, which gives them stability and in some cases, their function depend on these modifications.

In the present study, we have done the biochemical characterization of the major components of venom from *Conus regularis*, a snail from the Gulf of California, this will allow new pharmacologic resources for the study of ion channels. The venom was fractionated by RP-HPLC, we get seven main components, and they were purified several times and subjected to mass spectrometry. Their molecular weight were around 1500 to 13000 Da. A protein sequence analysis was done for CR20a. The protein sequence indicates that CR20a is a 38 amino acids peptide, with a Cysteine arrangement which corresponds to the O-superfamily conotoxina, which probably act on Ca²⁺ ion channels. Re6a is a proposal name for this compound.

Keywords: *Conus regularis*, venom, mass spectrometry, conotoxin, post-translational modification

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis padres Rosalina Galván Lugardo y Amado Martínez Orea, por su amor y enseñanza. Sé que estarían orgullosos por este logro.

A mis hermanos Rosa, Eva, Guille, Silvestre y Mary, por el apoyo, aunque estaba incomunicado. A mis sobrinos Nadia, Itzcuahtli, Irais, Max y “bebote”.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad de realizar los estudios de maestría.

Al Dr. Alexei Licea Navarro por permitirme realizar este proyecto bajo su dirección y apoyo en la realización de la estancia de investigación.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Idania Valdez Vazquez y al Dr. Hilario Covarrubias Rosales por la revisión de este trabajo, sus aportaciones, críticas y disponibilidad.

A M. en C. Eduardo Morales por la ayuda otorgada en el uso del HPLC.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinoza del Instituto de Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México por la participación en este proyecto y disponibilidad en asesorarme.

Al Dr. Lourival D. Possani del Instituto de Biotecnología en Cuernavaca, Mor. por prestarme las instalaciones y equipo para realizar las purificaciones.

Al Dr. Fernando Zamudio del Instituto de Biotecnología, por ayudarme a la realización de espectrometría de masas de las fracciones purificadas.

A Fredy Coronas por ayudarme con las repurificaciones en el HPLC en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos.

A los compañeros del laboratorio de Química 2, del Instituto de Bioquímica de la UNAM, por su ayuda y compañerismo durante la estancia.

A los compañeros del laboratorio de toxinas del departamento de biotecnología Edna, Pavel, Tania, Mimí, Karla C; por el apoyo, el compañerismo y la disponibilidad de asesorarme, así como a Ricardo, Ana Paola e Ira, por el apoyo en las colectas de los caracoles.

A la M. en C. Johanna Bernáldez Sarabia por el asesoramiento durante la realización de la estancia y la tesis y cuya participación en este proyecto ha sido de gran importancia.

A los amigos Aby, Angie (Rosy), Ale, Bere, Brendita, Carmen, Chío, Diana, Efra, Fabys, Gloria, Ira, Javier, Karlita, Karla C (sí otra vez), Lisandro, Luz, Mata, Mayra, Nacho, Oscar Pazcualo, Pilar, Rosita, Soco y demás compañeros de maestría y del CICESE, que me apoyaron durante este proceso y regalaron buenos momentos. Al Chamán también.

A los grandes amigos de la ciudad más bella del mundo, que me acompañaron, apoyaron y regalaron buenos momentos durante las pocas visitas de regreso a casa. Fabys, Conny, Vicky, Florecita rockera, Paty, Sebas.

A ti personita por tu gran amistad, cariño, paciencia, por estar siempre conmigo, aún estando lejos; por esos ratos agradables que me regalaste y tu apoyo en esta gran aventura (aunque sé que no te agrado mucho la idea). Paty Fügüemman ¡Gracias! Espero algún día reencontrarnos.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Antecedentes.....	2
I.1.1 Biología del Género <i>Conus</i>.....	2
I.1.2 Aparato Venenoso del Género <i>Conus</i>.....	4
I.1.3 Especie en Estudio <i>Conus regularis</i> (Sowerby, 1833).....	6
I.1.4 Generalidades del Veneno de <i>Conus</i>.....	7
I.1.4.1 Nomenclatura.....	9
I.1.5 Conotoxinas.....	10
I.1.5.1 Precursos Peptídico.....	11
I.1.5.2 Clasificación de las conotoxinas.....	12
I.1.6 Blancos Moleculares.....	15
I.1.7 Modificaciones Post-traduccionales.....	17
I.1.8 Caracterización Bioquímica.....	20
1.2 Justificación.....	21
1.3 Hipótesis.....	21
1.4 Objetivos.....	22
1.4.1 Objetivo General.....	22
1.4.2 Objetivos específicos.....	22
II. METODOLOGÍA.....	23
II.1 Colecta de Organismo.....	23
II.2 Obtención del veneno.....	23
II.3 Fraccionamiento del extracto soluble del veneno del caracol <i>Conus regularis</i> por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa HPLC-RP.....	24

CONTENIDO (continuación)

	Página
II.4 Repurificación de las Fracciones Mayoritarias.....	25
II.5 Espectrometría de Masas.....	25
II.6 Secuenciación de Aminoácidos.....	26
II.7 Ensayo de Fosfolipasas.....	26
III. RESULTADOS.....	27
III.1 Obtención del Veneno de <i>Conus regularis</i>	27
III.2 Fraccionamiento del veneno por HPLC-RP.....	27
III.3 Espectrometría de Masas.....	33
III.4 Secuenciación primaria del péptido.....	42
III.5 Actividad de fosfolipasa.....	43
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	44
IV.1.1 Fraccionamiento del veneno por HPLC-RP.....	44
IV.1.2 Espectrometría de Masas.....	45
IV.1.3 Modificaciones Post-traduccionales.....	46
IV.1.4 Secuenciación Primaria del Péptido.....	47
IV.1.5 Propuesta de Nombre.....	49
IV.2 Conclusiones.....	50
PERSPECTIVAS.....	51
LITERATURA CITADA.....	52
ANEXOS.....	58

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Ejemplares del género <i>Conus</i>	2
2	Esquema general del aparato venenoso de <i>Conus</i>	4
3	Morfología del aparato venenoso de <i>Conus</i>	5
4	Ejemplar de <i>Conus regularis</i>	7
5	Esquema del precursor peptídico.....	12
6	Clasificación de péptidos de <i>Conus</i>	14
7	Disección del caracol.....	24
8	Perfil Cromatográfico del veneno de caracol <i>Conus regularis</i>	28
9	Repurificación del componente CR40.....	29
10	Perfil cromatográfico de CR12 y perfil cromatográfico de CR9.....	30
11	Perfil del componente CR42.....	31
12	Perfil cromatográfico de CR21.....	32
13	Perfil cromatográfico de CR20.....	33
14	Cromatograma de masas de CR9.....	34
15	Cromatograma de masas de CR21.....	35
16	Espectro de masa molecular de CR40.....	36
17	Espectro de masa molecular de CR42.....	37
18	Espectro de masa molecular de CR20a.....	39
18	Espectro de masa molecular de CR20d.....	40
20	Espectro de masa molecular de CR20c.....	41
21	Secuencia del compuesto CR20a.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Estrategia para nombrar Conotoxinas.....	10
II	Componentes peptídicos de <i>Conus</i> con sus blancos moleculares.....	16
III	Compuestos peptídicos que presentan MPT.....	19
IV	Masas moleculares obtenidas de las fracciones mayoritarias del veneno de <i>C. regularis</i>	42
V	Comparación de CR20a con otros miembros de la familia de las ω -Conotoxina.....	48

I. INTRODUCCIÓN

Algunos organismos producen arsenales tóxicos conformados por una serie de compuestos farmacológicamente activos, que pueden tener pesos moleculares bajos hasta proteínas con pesos moleculares elevados (Aneiros y Garateix, 2004; Fusetani, 2009). Los venenos de estos organismos pueden estar compuestos por enzimas, proteínas, esteroides, alcaloides, lípidos, entre otros (Russell, 1984) y afectan el funcionamiento de sistemas como el neuromuscular y cardiovascular, así como tejidos y algunos órganos (Eble, 2010, in press).

Estos compuestos cumplen un rol fundamental en la supervivencia de los animales que los producen, ya que son utilizados para atacar a sus presas, como defensa de sus depredadores, como antibióticos unicelulares (caso específico de organismos filtradores como esponjas) o para evitar la competencia de especies con las que cohabita (Jiménez, *et al*, 2007).

De estos compuestos, sólo una pequeña porción (menos del 1%) de las moléculas que presentan alguna actividad, han sido identificadas y caracterizadas, y aún más, una cantidad mucho menor es conocida a nivel genómico (Ménez, *et al*. 2006).

Dentro de estos organismos productores de toxinas, los caracoles del género *Conus* llaman la atención por las características de sus compuestos peptídicos, debido a la especificidad en sus blancos moleculares y su posible uso potencial, ya sea para su síntesis o manipulación en la búsqueda de nuevos compuestos de interés farmacéutico.

I.1 ANTECEDENTES

I.1.1 Biología del Género *Conus*

El género *Conus* forma parte de la familia Conidae. Se estima que existen alrededor de 500-700 especies, pueden coexistir hasta 20 especies en la misma área. Los miembros pertenecientes a este género son carnívoros (Figura 1). Su distribución geográfica comprende zonas tropicales, principalmente en los Océanos Pacífico e Índico, aunque pueden encontrarse, también, en el Atlántico, Golfo de México y Mar Caribe (Díaz *et al.*, 2005). Un caso especial es *Conus californicus*, que habita en zonas frías de California, Estados Unidos y Baja California, México (Stewart y Gilly, 2005). El hábitat de estos organismos puede ser diverso, ya que se encuentra en zonas rocosas, fondos arenosos o de lodo, arrecifes de coral y pastos marinos (Díaz *et al.*, 2005).



Figura 1. Ejemplares del género *Conus*. Colección privada del laboratorio de Biotoxinas de Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada.

La dieta de *Conus* es más especializada en regiones donde cohabitan más de una especie, mientras que en lugares donde se encuentra una sola especie es más generalizada. Los caracoles que son especialistas, presentan hábitos muy marcados, ya que son nocturnos por lo que descansan bajo las rocas o se entierran bajo el sustrato durante el día. Cada especie tiene preferencias alimentarias bien definidas, por lo que no puede presentarse competencia interespecífica (Purchon, 1977).

La mayoría de los caracoles de este género son vermívoros, es decir, se alimentan de gusanos, siendo su dieta principal los poliquetos. Se sabe que el diente radular no es utilizado para sostener a la presa, sino que varios caracoles de la misma especie pueden congregarse y alimentarse de la misma presa. Otras especies de *Conus* se alimentan de otros gastrópodos, opistobránquios, cefalópodos, bivalvos, e incluso de otras especies de *Conus*. Estos organismos son denominados moluscívoros (Purchon, 1977; Olivera, 1997).

Los conos moluscívoros llenan su diente radular con el veneno, el cual dispara sobre su presa, quedando paralizada inmediatamente, mientras que el cono coloca su boca expandida contra el orificio de la concha de su presa y remueve la carne de ésta, que posiblemente sea desecha por la acción del mismo veneno o por jugos digestivos regurgitados de la boca de caracol sobre su víctima (Purchon, 1977, Olivera, 1997).

Las especies que se alimentan de peces, denominados piscívoros, detectan a su presa por medio de quimiorreceptores. Una vez situada la presa, éstos inyectan al pez con su rádula como si fuera un arpón inyectando el veneno. Una vez que es paralizada la presa, el caracol expande su boca hasta 2 cm de diámetro, para ingerir a su presa, empezando por la cola (Khon, 1956; Purchon, 1977). Posiblemente el pez es digerido en el esófago por acción de enzimas. Se ha descrito que también pueden alimentarse de hemicordados y equiúridos (Olivera,

1997; Espíritu, *et al.* 2001), aunque una especie de este género, *C. californicus*, se alimenta de los tres tipos de presas reportados para este género (Stewart y Gilly, 2005), además, puede depredar crustáceos, en particular camarones (Biggs *et al.* 2010).

I.1.2 Aparato venenoso del Género *Conus*

Todos los caracoles pertenecientes al género *Conus* presentan un aparato venenoso característico (Figura 2).

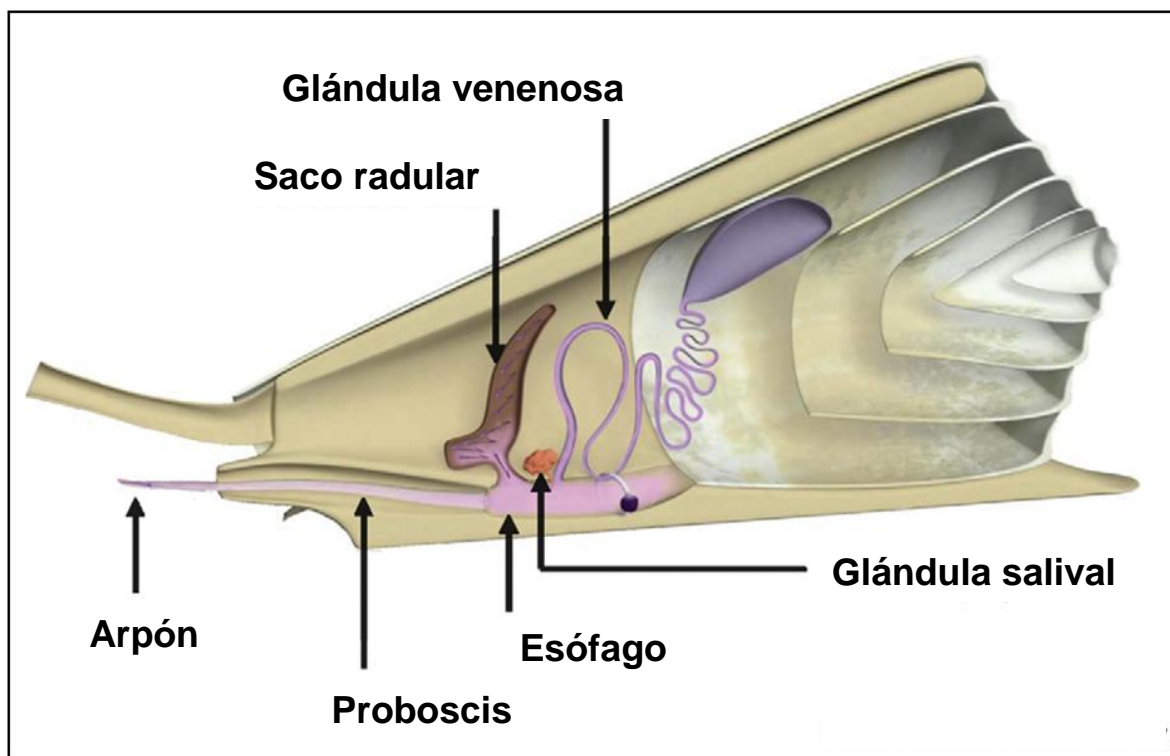


Figura 2. Esquema general del aparato venenoso de *Conus* (Infografía tpcm, cortesía de Toxinomic Foundation, Ginebra, Suiza. In Favreau y Stöcklin, 2009).

El sistema bucal consiste de dientes radulares que están elongados en forma de arpón hueco por donde inyecta a su presa, en el interior de un “carcaj” en la base de la proboscide. El veneno es secretado y almacenado en un ducto que puede llegar a ser varias veces más largo que la concha del animal y el cual se abre dentro del lumen de la proboscide (Figura 3). La terminación distal del ducto venenoso es cerrada y forma un ducto alargado y muscular que al contraerse proyecta el veneno cuando el animal golpea a su presa. Algunas especies tienen una proboscide distensible, con la cual introducen a su presa donde es atacada con el arpón. El diente radular se usa una vez, si el ataque es exitoso, el diente es tragado entero junto con la presa, pero si falla en el ataque, el diente es desechado y un nuevo diente es montado listo para otro ataque (Purchon, 1977; Norton y Olivera, 2006).

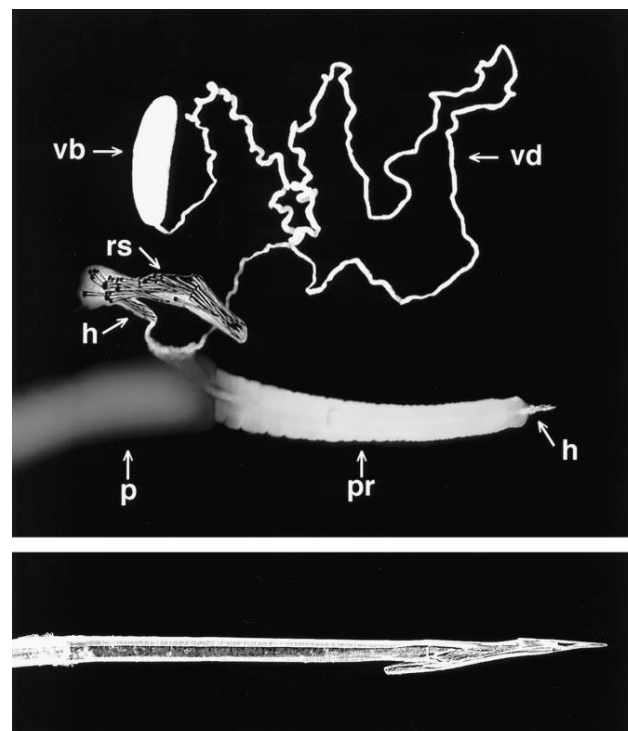


Figura 3. Morfología del aparato venenos del género *Conus*. En la parte superior se observa su estructura: Bulbo venenoso (vb), ducto venenoso (vd), saco radular (rs), rádula (h), faringe (p) y proboscis (pr). En la parte inferior se muestra el diente radular modificado en arpón (Olivera, 1997).

I.1.3 Especie en estudio *Conus regularis* (Sowerby, 1833)

Conus regularis presenta una concha alargada y delgada, con una longitud de 38-59 mm y un diámetro de 18-32 mm. Se observa una espiral alta de 8-9 vueltas y las suturas bien marcadas, blancas y con ornamentaciones lineales de tonos castaño amarillento (Dall, 1910). La abertura es blanca y el labio externo está curvado hacia el frente (Figura 4). Habita en la zona intermareal en lugares rocosos y llega a encontrarse en profundidades de 90 m (Kerstitch y Bertsch, 2007). Se distribuye desde Bahía Magdalena en Baja California, Golfo de California hacia el sur de Panamá, aunque se considera que llega hasta Perú (Keen, 1971; González-Villarreal, 2005;).

En cuanto a su alimentación, no se ha descrito, sin embargo se estima que se alimenta de gusanos, por el tipo de hábitat en el que se encuentra.

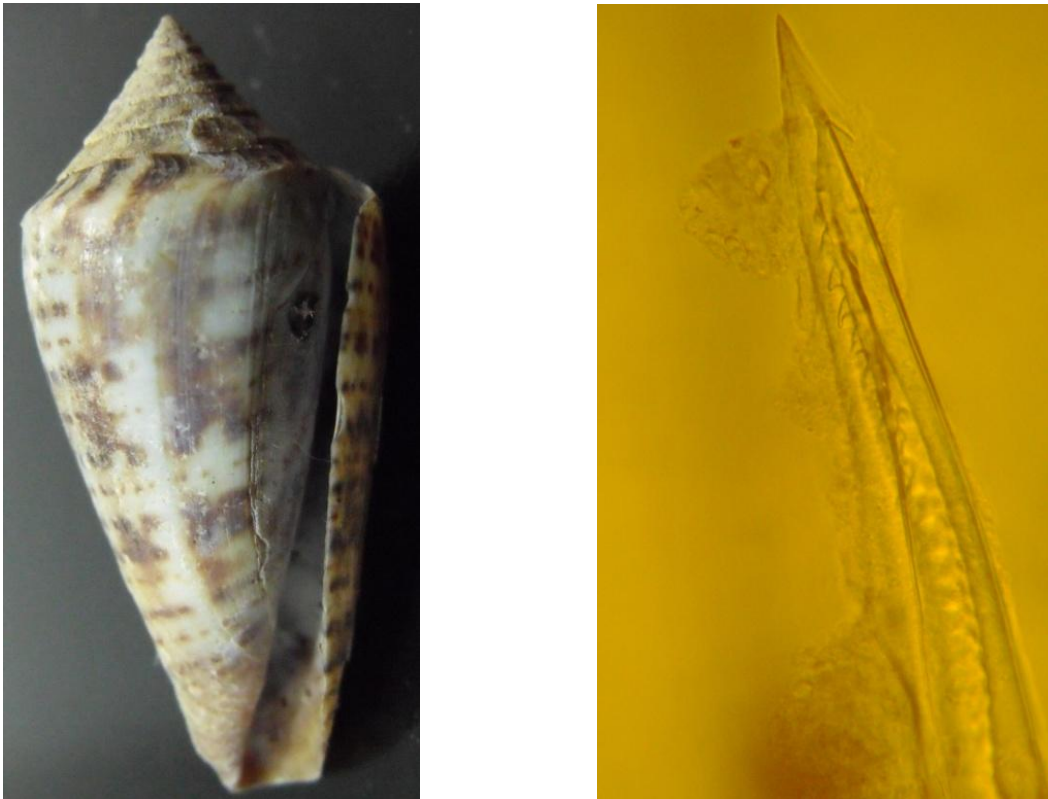


Figure 4. Ejemplar de *Conus regularis*. Colectado en Bahía de los Ángeles, Ensenada, Baja California. Septiembre 2009 (izquierda). Imagen de la rádula de *C. regularis*. Laboratorio de Biotoxinas Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada, Baja California. 2008 (derecha).

I.1.4 Generalidades del Veneno de *Conus*

El veneno de *Conus* muestra una gran variedad de toxinas que pueden llegar a centenares, así también, cada especie tiene la capacidad de expresar cerca de 100 a 200 péptidos diferentes en su veneno, cada secuencia del péptido diverge de forma rápida, así, el complemento del péptido de una especie difiere al de otra especie del mismo género. Por lo que, se estima que existen cerca de 50,000 péptidos diferentes que pueden ser expresados en el veneno de estos organismos (Espíritu, *et al.*, 2001). El hecho de que *Conus* requiera de tantos compuestos en su veneno puede deberse a tres propósitos principales: la captura de su presa, la

defensa contra depredadores y evitar la competencia con otros organismos (Olivera, 1997, 1999).

Por tal motivo, una estrategia que presenta este grupo de caracoles, específicamente en la alimentación, es la combinación de múltiples compuestos que actúan de manera sinérgica para paralizar a su presa. Esto se conoce como “toxinas cabales” que son un grupo de péptidos con un mismo fin y que actúan conjuntamente para obtener el mismo efecto final. Así las toxinas que causan un choque excitotóxico se conocen como “*lightning-strike cabal*” mientras que las que causan bloqueo neuromuscular se denomina “*motor cabal*” (Olivera, 1997, 1999). Otras especies pueden presentar toxinas cabales, tal es el caso de *C. geographus*, que tiene un grupo de toxinas denominado “*nirvana cabal*” el cual provoca un estado de relajación en la presa (Olivera y Cruz, 2001).

El veneno puede presentar dos tipos de compuestos que se encuentran clasificadas en familias y superfamilias, en las cuales comparten características como presentar enlaces disulfuro, una secuencia N-terminal altamente conservada y un modo de acción similar.

Es así como se pueden clasificar en dos grupos (Terlau y Olivera, 2004):

Conopéptidos: que presentan un enlace disulfuro (Conopresinas y contrifanos) o que carecen de enlaces disulfuro (Contalucina, Conantocina o Conorfamida).

Conotoxinas: que presentan múltiples enlaces disulfuro. Pueden contener entre 10 a 30 aminoácidos.

El veneno de *Conus* también presenta componentes proteínicos con propiedades de fosfolipasas de tipo A_2 como Conodipina-M y componentes no peptídicos como serotonina y ácido araquidóico (McIntosh *et al.* 1995,1999).

I.1.4.1 Nomenclatura

La nomenclatura de los conopeptidos está compuesta de un nombre, seguida de la primera letra de la especie: Contulacina-G, aislada de *C. geographus*

En el caso de las conotoxinas, se nombran de dos formas:

1. Si se conoce el mecanismo de acción, se nombran con una letra griega que indica la familia de la cual proviene el péptido, es decir, su acción farmacológica, seguida de un guión y la palabra 'conotoxina', una o dos letras que denotan la especie de la que se aisló el veneno, un número romano que representa los patrones de Cisteínas del compuesto (Tabla I), y por último, una letra capital, para determinar la variante del péptido (Olivera y Cruz, 2001).
2. Si se desconoce su blanco molecular, se escriben dos letras capitales para indicar de que organismo proviene el veneno, un número arábigo que designa el patrón de cisteínas y una letra que denomina la variante, la cual está escrita en letras minúsculas (Olivera y Cruz, 2001).

Table I. Estrategia para nombrar conotoxinas. (Olivera y Cruz, 2001).

Superfamilia	Arreglo de cisteínas		Familia farmacológica	
	Patrón	Asignación	Asignación	Acción
A	CC-C-C	I o 1	α	Antagonista competitivo de receptores de ACh
	CC-C-C-C-C	IV o 4	αA	Antagonista competitivo de receptores de ACh
	CC-C-C-C-C	IV o 4	κA	Inhibidor de canales de K^+
M	CC-C-C-CC	III o 3	μ	Bloqueador de canales de Na^+
	CC-C-C-CC	III o 3	ψ	Antagonista no competitivo de receptores de ACh
O	C-C-CC-C-C	VI o 6	ω	Bloquea canales de Ca^{2+}
	C-C-CC-C-C	VII o 7	ω	Bloquea canales de Ca^{2+}
	C-C-CC-C-C	VII o 7	κ	Inhibe canales de K^+
	C-C-CC-C-C	VII o 6	δ	Retarda la inactivación de VSSC
	C-C-CC-C-C	VII o 6	μO	Bloquea VSSC
P	-C-C-C-C-C-C-	IX o 9		Desconocido
S	C-C-C-C-C-C-C- C-C-C	VII u 8	σ	Receptor de 5-HT ₃
T	-CC-CC-	V o 5		Desconocido

I.1.5 Conotoxinas

Las conotoxinas son péptidos pequeños de 10 a 30 aminoácidos, aunque se han descrito conotoxinas de hasta 49 aminoácidos (Chen *et al*, 2008). Presentan residuos de cisteínas (4 o 6, incluso llegan hasta 10) en posiciones bien definidas, pueden encontrarse juntas o separadas por uno a seis aminoácidos, presentan de uno a cuatro enlaces disulfuro lo que le proporciona una rigidez crucial para la actividad biológica (Olivera, 1997).

I.1.5.1 Precursor peptídico

Cada una de las conotoxinas descritas hasta el momento, está codificada por un ARNm y que el producto de la traducción original de los genes de estas toxinas están compuestos en muchos casos de un péptido señal, un pro-péptido y una toxina madura en la región del C-terminal (Han *et al.* 2008). La traducción de estos compuestos peptídicos empieza como un precursor pre-propéptido (Figura 5), de 70 a 120 aminoácidos, el cual tiene una secuencia señal (región “pre”) en la región N-terminal, con un tamaño estimado de 20 aminoácidos; seguida de una región “pro”, con aproximadamente 40 aminoácidos; una secuencia de reconocimiento proteolítico denominada sección XR, que da paso a la toxina madura que se encuentra en la región del carboxilo terminal, representada por 10 a 30 aminoácidos en promedio. (Craig, *et al.* 1999; Olivera y Cruz, 2001; Becker y Terlau, 2008).

La diversidad de los péptidos de Conus está dada por la hipermutación en la toxina madura, generando nuevas secuencias de péptidos en el veneno y solo manteniendo el arreglo de cisteínas y los enlaces disulfuros que se forman entre ellas (Olivera y Cruz, 2001).

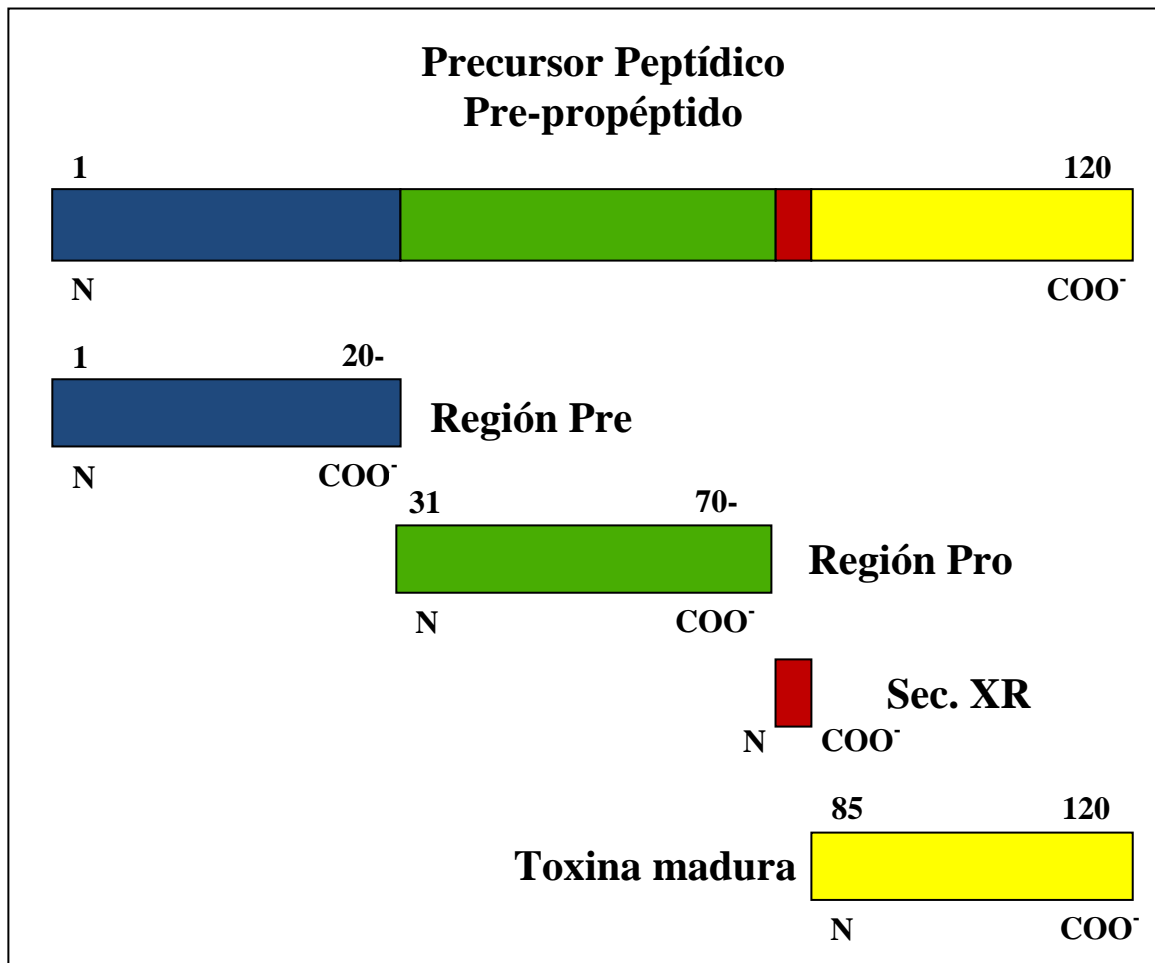


Figura 5. Esquema del precursor peptídico (Oman y Van der Donk, 2010).

I.1.5.2 Clasificación de las conotoxinas

Las conotoxinas se encuentran clasificadas dentro de superfamilias, compartiendo características como la presencia de su enlace disulfuro, una secuencia precursora en el N-terminal altamente conservada y un modo de acción similar. Las superfamilias se subdividen en familias que se caracterizan por tener blancos funcionales sobre los que actúan, que pueden ser canales iónicos dependientes de voltaje, canales iónicos dependientes de ligando, receptores nicotínicos de

acetilcolina, así como, por las propiedades farmacológicas que presentan (Figura 6. Jones y Burlaj 2000, Terlau y Olivera, 2004; Becker y Terlau, 2008).

Se han reportado nueva superfamilias L, J y D (Yuan, *et al.* 2008). La superfamilia V, descrita por Peng *et al.* (2008), con una conotoxina (vi15a) purificada del veneno del caracol *Conus virgo* presenta un arreglo de cisteínas único (C-C-CC-C-C-C-C).

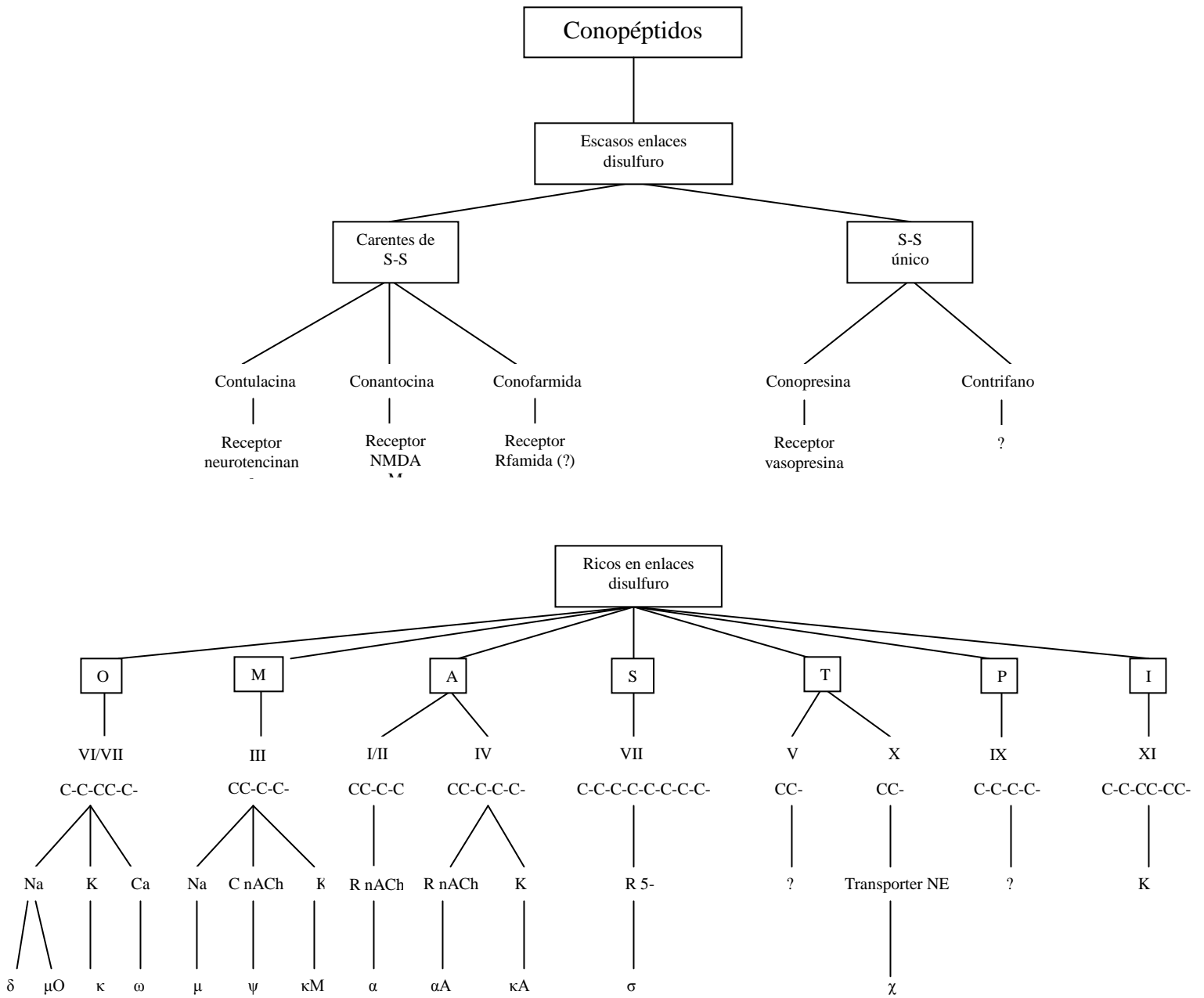


Figura 6. Clasificación de péptidos de *Conus*. Se muestra la superfamilias, familia, blancos farmacológicos y los patrones de cisteínas (Terlau y Olivera, 2004).

I.1.6 Blancos moleculares

Los componentes peptídicos de *Conus* actúan sobre blancos moleculares específicos, entre los que se encuentran canales iónicos, que pueden ser canales dependientes de voltaje y canales dependientes de ligando, así como, neurotransmisores de transporte, por lo que actúan en diversos puntos de la transmisión nerviosa y actividad muscular (Becker y Terlau, 2008).

Los canales iónicos son proteínas de membrana que regulan la permeabilidad iónica en la membrana celular. Tienen la capacidad de servir como elementos clave en las vías de señalización y sensibilidad, conectando de manera selectiva, el interior de la célula con su exterior. Estos canales están implicados en funciones fisiológicas importantes como excitabilidad en el control cardíaco, señalización intracelular, secreción hormonal, proliferación de células, regulación de la presión sanguínea, balance electrostático, recepción sensorial de estímulos externos y la integración, propagación e interacción de señales eléctricas en el cerebro (Miller, 2000).

Canales dependientes de voltaje: Son canales que se activan por un cambio de voltaje en la membrana. Estos canales son de importancia ya que son responsables de la generación, estructura y transmisión de señales eléctricas de la célula.

Canales regulados de ligando: Son canales que median la transmisión sináptica de la célula, los cuales se agrupan de acuerdo a su función y estructura. El primer grupo es activado por acetilcolina (Ach), serotonina, GABA o glicina; un segundo grupo está formado por receptores de glutamato y subdividido en receptores de N-metil-D-aspartato y en no receptores de NMDA (sinasa/AMPA). Un tercer grupo están involucrados en la transmisión sináptica como los receptores de ATP, como P2X₁, que son receptores purinérgicos (Bennett et al 1995).

Regulados por proteínas G, que inhiben proteínas efectoras, regulan el canal a través de segundos mensajeros o proteínas cinasas y por medio de asociaciones con las subunidades de proteínas G y el canal iónico.

La tabla II muestra algunos compuestos peptídicos, así como los blancos moleculares sobre los que actúan.

Tabla II. Componentes peptídicos de *Conus* con sus blancos moleculares (Aneiros y Garateix, 2004; Terlau y Olivera, 2004).

Blanco molecular	Arreglo de cisteínas	clase	Modo de acción	Ejemplo
Receptores de acetilcolina	CC-C-C CC-C-C-C-C CC-C-C-CC	α -Conotoxina α A-Conotoxina ψ -Conotoxina	Inhibidor competitivo Inhibidor competitivo Inhibidor no competitivo	α -GI α A-EIVA ψ -PIIE
Canal de Sodio	CC-C-C-CC C-C-CC-C-C C-C-CC-C-C	μ -Conotoxina μ O-Conotoxina δ -Conotoxina	Bloqueador Bloqueador Inactivación de Na ⁺ Delay	μ -PIIIA μ O-MrVIB δ -TxVIA
Canal de Calcio	C-C-CC-C-C	ω -Conotoxina	Bloquea de subtipos específicos	ω -MVIIA
Canal de Potasio	C-C-CC-C-C	κ -Conotoxina	Bloqueador	κ A-SVIA
Receptor NMDA	Lineal	Conantocinas	Inhibidor	Conantocina-G
Receptores de Vasopresina	C-C	Conopresinas	Agonista	Conopresina-S
Receptores de Neurotensina	Lineal	Contulateinas	Agonista	Contalucina-G
Transporter de Norepinefrina	Lineal	χ -Conotoxina	N.D.	MrIA
Receptores acoplados a proteínas G	N.D.	ρ -Conotoxina	Antagonista	TIA

I.1.7 Modificaciones post-traduccionales

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) son modificaciones de origen enzimático o químico de proteínas que suelen ocurrir después de la traducción del RNAm. Son de gran importancia, ya que actúan en la regulación de la célula. Estas modificaciones cambian de forma drástica las propiedades físicas o químicas de la proteína, su estabilidad, localización y actividad (Farley y Link, 2009). Se han reportado más de 300 tipos de estas modificaciones pero los estudios que se realizan constantemente demuestran la presencia de más modificaciones de este tipo (Favreau, *et al.* 2006).

Las MPT puede llevar a cambios en la masa de los compuestos peptídicos modificados, como es el caso de la fosforilación o metilación, que incrementa la masa de una proteína, en cambio la hidrólisis del péptido o la creación de enlaces disulfuro reduce la masa molecular (Farley y Link, 2009).

Las modificaciones por lo regular, le brindan estabilidad a la estructura del péptido, así como también, variación en la estructura secundaria tridimensional, para optimizar la unión en los blancos moleculares. Aunque se han descrito un número extenso de MPT en péptidos y proteínas, sólo un número pequeño de estas modificaciones se han encontrado en los componentes del veneno de *Conus* (Jakubowski *et al.* 2006. Anexo I).

Estas modificaciones pueden deberse a la acción enzimática de la región “pro” del precursor para dar paso a una diversidad mayor de péptidos (Olivera y Cruz 2001), tal es el caso de la γ -glutamil carboxilasa, que cataliza la carboxilación de residuos específicos de glutamato a γ -carboxiglutamato (γ o Gla), la cual requiere de vitamina K reducida (Stanley, 1997).

El veneno de *Conus* puede llegar a presentar varias MPT en un mismo compuesto (Tabla III), incluso una misma MPT puede repetirse varias veces en un mismo compuesto como lo descrito por Chen *et al.* (2008), donde encontró cuatro hidroxiprolinas en sr16a, compuesto peptídico aislado del veneno de *C. distans*. Sin embargo, en este mismo compuesto hay prolinas no modificadas indicando que las enzimas tienen mecanismos aún desconocidos o poco estudiados para determinar qué aminoácido modifican y cual no.

Dentro de las MPT descritas en *Conus*, se encuentran amidación del carboxilo terminal, γ -carboxilación en glutaminas, sulfonación en tirosinas, piroglutamación, ciclización del amino y carboxilo terminal, formación de residuos de hidroxiprolina, bromación de triptófanos, epimerización de aminoácidos de tipo L- a tipo D-, glucosilación de residuos de serina y treonina (Lewis y García, 2003).

Se estima que las MPT mejoran la eficiencia funcional y la especificidad de los conopeptidos en los que se encuentra, un ejemplo es la glucosilación presentada en ϵ -TxIX, del veneno de *C. textile*, que regula el flujo de Ca^{2+} presináptico como lo reporta Rigby *et al.* (1999). Zugasti-Cruz, *et al.* (2006) menciona que la γ -carboxilación en el glutamato presente en el veneno de *Conus austini*, pueda estar relacionado con la defensa de este caracol contra organismos depredadores que pudieran ser otros moluscos.

Tabla III. Compuestos peptídicos que presentan MTP. Algunos presentan más de una.

Toxina	aa	Especie	Masa (Da)	Modificación	Referencia bibliográfica
as7a	31	<i>C. austini</i>	3236	γ-carboxilación	Zugasti-Cruz, <i>et al.</i> 2006
ca16a	34	<i>C. caracteristicus</i>	3517.6	Hidroprolina	Yuan, <i>et al.</i> 2008
di16a	49	<i>C. distans</i>	N.D.	γ carboxiglutamato Hidroxirolina	Chen, <i>et al.</i> 2008
sr7a	32	<i>C. spurius</i>	N.D.	Amidación c-terminal	Luna-Ramirez, <i>et al.</i> 2007
ViVa ViVb	N.D.	<i>C. virgo</i>	1328 1358	Amidación c-terminal Acido piroglutamico	Quinton, <i>et al.</i> 2006
Con-R	27	<i>C. radiatus</i>	N.D.	γ-carboxiglutamato	White, <i>et al.</i> 2000
vc1.1	N.D.	<i>C. victoriae</i>	N.D.	Hidroxirolina γ-carboxiglutamato	Clark, <i>et al.</i> 2006
γ-conopresina-vil	N.D.	<i>C. villepinii</i>	996.45	γ-carboxiglutamato Amidación	Möller y Marí, 2007
Conomarfina	15	<i>C. marmoreus</i>	N.D.	Prolina hidroxilada Conformación D de Phe	Han, <i>et al.</i> 2008
De7a	28	<i>C. delessertii</i>	3170	Hidroxirolina γ-carboxiglutamato amidación	Aguilar, <i>et al.</i> 2005
Cctx	N.D.	<i>C. consor</i>	5170.71 4118.19	glicosilación	Dutertre, <i>et al.</i> 2010
Contrifano Vn	10	<i>C. ventricosus</i>	N.D.	D-triptofano amidación	Massilia, <i>et al.</i> 2001
CCAP-vil		<i>Conus villepinii</i>	N.D.	amidación	Miloslavina, <i>et al.</i> 2010 in press
κA-SIVA (s4a) s4b	30 37	<i>C. striatus</i>	4080.5 4947.1	O-glicosilados Cterminal amidado	Kelley, <i>et al.</i> 2006
Con-E Con-P	24	<i>C. purpurascens</i> <i>C. ermineus</i>	N.D.	γ-carboxiglutamato	Gowd, <i>et al.</i> 2008
ε-TxIX	N.D.	<i>C. textile</i>	N.D.	glicosilación	Rigby, <i>et al.</i> 1999

I.1.8 Caracterización bioquímica

La caracterización de un compuesto ayuda a comprender mejor su estructura, composición, masa, incluso su posible función. Son muchas las técnicas utilizadas para la caracterización bioquímica de proteínas, pero, solo algunas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se utiliza para el fraccionamiento de los diversos componentes que conforman el veneno, donde los componentes más hidrofílicos son los primeros en separarse, mientras que los componentes más hidrofóbicos, son los últimos en separarse. En cuanto a espectrometría de masas (MS), son varias técnicas de este tipo que se utilizan para analizar el veneno, proporcionando sólo la masa molecular del péptido. Por ejemplo, como la espectrometría de masas de ionización por electrospray acoplada a cromatografía líquida (LC-ESI-MS) o espectrometría de masas en tiempo de vuelo con láser de ionización/desabsorción (MALDI-TOF-MS), utilizadas para determinar los componentes del veneno. Para la caracterización estructural se requieren de equipos específicos en los cuales ESI y MALDI están acoplados a otros analizadores para obtener la fragmentación del péptido, tal es el caso del equipo con trampa de iones, triple cuadrupolo o tiempo de vuelo/tiempo de vuelo (TOF-TOF) que permite una detección más eficiente (Favreau, et al. 2006).

I.2 JUSTIFICACIÓN

El veneno proveniente de animales es usado como recursos biomédicos o como herramientas novedosas para la investigación, agentes de diagnóstico o como compuestos farmacológicos. Cada día aparecen nuevas moléculas con bioactividad que pueden ser usadas con fines médicos. Tal es el caso de las conotoxinas.

Estos descubrimientos son registrados principalmente al observar su actividad biológica, posteriormente su caracterización bioquímica y estructural de la molécula en estudio. Debido a que *C. regularis* es una especie de caracol marino de la región, y de la cual no se tiene ningún péptido reportado, y ninguna actividad biológica, se considera necesario realizar un análisis bioquímico del veneno de este caracol, para ofrecer nuevas herramientas farmacológicas o moleculares para el estudio de canales iónicos.

I.3 HIPÓTESIS

En las fracciones mayoritarias del veneno de *C. regularis* existe al menos un compuesto que sea una conotoxina o conopéptido no descrito previamente en la literatura.

I.4 OBJETIVOS

I.4.1 Objetivo General.

Caracterizar de forma bioquímica los compuestos mayoritarios del veneno del caracol *C. regularis*, para observar su estructura y su posible función.

I.4.2 Objetivos particulares.

1. Fraccionar y aislar los componentes más abundantes del extracto soluble del veneno del caracol marino.
2. Determinar la secuencia primaria de aminoácidos que componen las fracciones mayoritarias del veneno.
3. Caracterizar por espectrometría de masas las fracciones mayoritarias presentes en el veneno del caracol *C. regularis*.

II. METODOLOGÍA

II.1 Colecta de organismos

Los caracoles de la especie *Conus regularis*, fueron colectados en la zona costera de la localidad de Bahía de Los Ángeles, Ensenada, Baja California; en el mes de octubre del 2008. Los organismos fueron tomados de acuerdo a las características morfológicas. El día y hora de colecta se definió de acuerdo al calendario de mareas. Los organismos fueron transportados vivos en recipientes con agua de mar.

II.2 Obtención del veneno

El veneno se obtuvo realizando disecciones de los caracoles. Para extraer al animal, éste se centrifugó a 7000 rpm colocados en tubos Falcon de 50 ml. Posteriormente, se aisló el ducto venenoso (figura 7), el cual fue macerado con un homogenizador de vidrio (Wheaton) en una solución de 1 ml de acetonitrilo (ACN) al 40% en agua, por cada 20 ductos. La muestra se centrifugó a 10, 000 rpm por 5 minutos a 4°C, este procedimiento se realizó dos veces. Se extrajo el sobrenadante y se congeló a -70°C para su posterior liofilización.



Figura 7. Disección del caracol, en la parte superior se encuentra la concha; en la parte central, se muestra el aparato venenoso, la flecha indica el ducto venenoso, y en la parte inferior se observa el animal disectado.

II.3 Fraccionamiento del extracto soluble del veneno del caracol *C. regularis* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa HPLC-RP

El veneno de los caracoles se fraccionó de acuerdo al tiempo de retención de sus componentes por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-RP, por sus siglas en inglés), utilizando un cromatógrafo Agilent 1100, en el cual se utilizó una columna analítica Vydac C₁₈ (Grace-Vydac 218TPS54, 4.6 x 250 mm, 300 Å), con una precolumna Zorbax C18 (Zorbax-Agilent Technology, 4.6 x 12.5mm, 5µm) ambas fueron equilibradas en solución A: ácido trifluoracético al 0.12% y agua destilada 99.88%.

La muestra se lavó con 100% de solución A por 5 minutos. Se eluyó a temperatura ambiente durante 60 minutos utilizando un gradiente lineal de 0 a 60% de solución B: Acetonitrilo 99.9% y ácido trifluoroacético 0.1%

La detección de los péptidos se realizó mediante absorbancia de radiación UV con una longitud de onda de 230 nm. Las fracciones se colectaron de acuerdo a su tiempo de retención y se almacenaron a -70°C para su posterior liofilización (Lyph-Lock 6, Labconco),

II.4 Repurificación de las fracciones mayoritarias

Para la repurificación de las fracciones mayoritarias, se realizó por HPLC-RP utilizando un cromatógrafo Agilent 1100, en el cual se utilizó una columna analítica Vydac C₁₈ (Grace-Vydac 218TPS54, 4.6 x 250 mm, 300 Å), con una precolumna Zorbax C18 (Zorbax-Agilent Technology, 4.6 x 12.5mm, 5µm) ambas fueron equilibradas en solución A.

Para la repurificación de cada componente se siguió una estrategia de trabajo de acuerdo a su tiempo de retención, eluyendo durante 60 minutos un gradiente propuesto para dicho componente, los cuales fueron de 0% - 30% y de 24% - 46% de solución B.

II.5 Espectrometría de masas

Las fracciones en su forma homogénea fueron reconstituidas en 50% de acetonitrilo y 1% de ácido acético y se inyectaron directamente (5µl) en un espectrómetro de masas Thermo Finnigan LCQ electrospray. La elución a 20 µl/min fue separado de tal manera que solo el 5% de la muestra entró en la fuente de nano-electrospray (1.0 µl/min). El voltaje de spray fue ajustado a 1.6kV y la

temperatura fue a 110°C. Todos los espectros fueron obtenidos en modo de ion positivo. La adquisición de datos fue realizada en un sistema de datos Xcalibur Windows NT. La determinación fue realizada por el Dr. Fernando Zamudio del grupo de trabajo del Dr. Lourival D. Possani del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

II.6 Secuenciación de aminoácidos

La secuenciación de aminoácidos se realizó en la compañía Kratos (Shimadzu) por el Dr. David Sukrowsky, en Estados Unidos.

II.7 Ensayo de fosfolipasas

Se prepararon tres soluciones:

- a) Se mezclaron 6 ml de yema de huevo, sin clara con 36 ml de NaCl al 0.86%
- b) Se disolvió 0.3 g de agarosa en 50 ml de Tris-HCl m M, pH 7.95.
- c) Se disolvió 0.147 g de CaCl_2 en 100 ml de agua desionizada.

Se mezclaron 0.5 ml de la solución a, 50 ml de la solución b y 0.5ml de la solución c. Posteriormente se vertieron 15 ml de esta mezcla en cajas de Petri, para obtener geles de aproximadamente 2 mm de espesor. Con una punta de 100 μl , se realizaron perforaciones en el gel, las cuales estuvieron separadas entre sí por 4 o 5 cm. Se colocaron diferentes concentraciones (0.5 μg , 1.5 μg y 2 μg) de la fracción CR40 y CR42 en cada pozo y se incubaron a 37°C. Se observaron cada día hasta ver un halo de degradación. Como control positivo se utilizó lecitinasa-C. El experimento se hizo por duplicado.

III RESULTADOS

III.1 Obtención del veneno de *Conus regularis*

Los caracoles utilizados para este trabajo fueron colectados en el mes de octubre del 2008. Obteniendo un total de 62 mg de proteína del veneno total, extraídos de 184 caracoles.

III.2 Fraccionamiento del veneno por HPLC

El veneno fraccionado por HPLC de *C. regularis*, se colectó en 12 fracciones de 5 minutos cada que una, a las que se les nombró F1, F2 y así sucesivamente hasta F12. Posteriormente se hicieron colectas por pico individual de acuerdo a su tiempo de retención, realizando un total de 27 purificaciones del veneno total.

Se detectaron un total de 45 picos, donde se observaron siete picos mayoritarios de interés (Figura 8) los cuales están indicados con una flecha. Estos picos fueron nombrados de acuerdo a su tiempo de retención y se les denominó CR9, CR12, CR17, CR20, CR21, CR40 y CR42. Posteriormente cada pico fue repurificado para su análisis bioquímico.

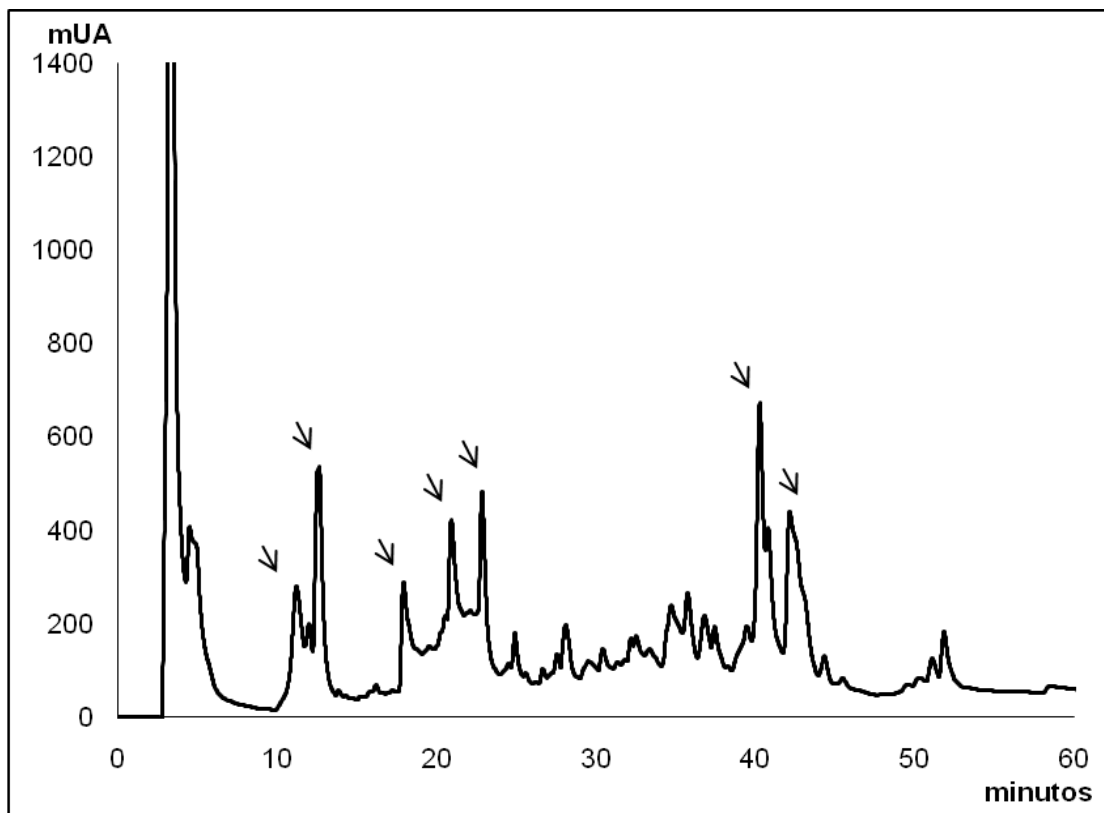


Figura 8. Perfil cromatográfico del veneno del caracol *Conus regularis*. Las flechas indican los picos mayoritarios de interés. El primer pico que se muestra es el pico de inyección.

Se hicieron varias repurificaciones de las fracciones mayores, de acuerdo a las condiciones descritas en la sección VI.4. El primer componente en ser repurificado, fue CR40, ya que fue el de mayor absorbancia, utilizando el protocolo de 24% - 46% de ACN. Se repitió el procedimiento una segunda vez para tener el componente prácticamente puro para su análisis posterior (Figura 9).

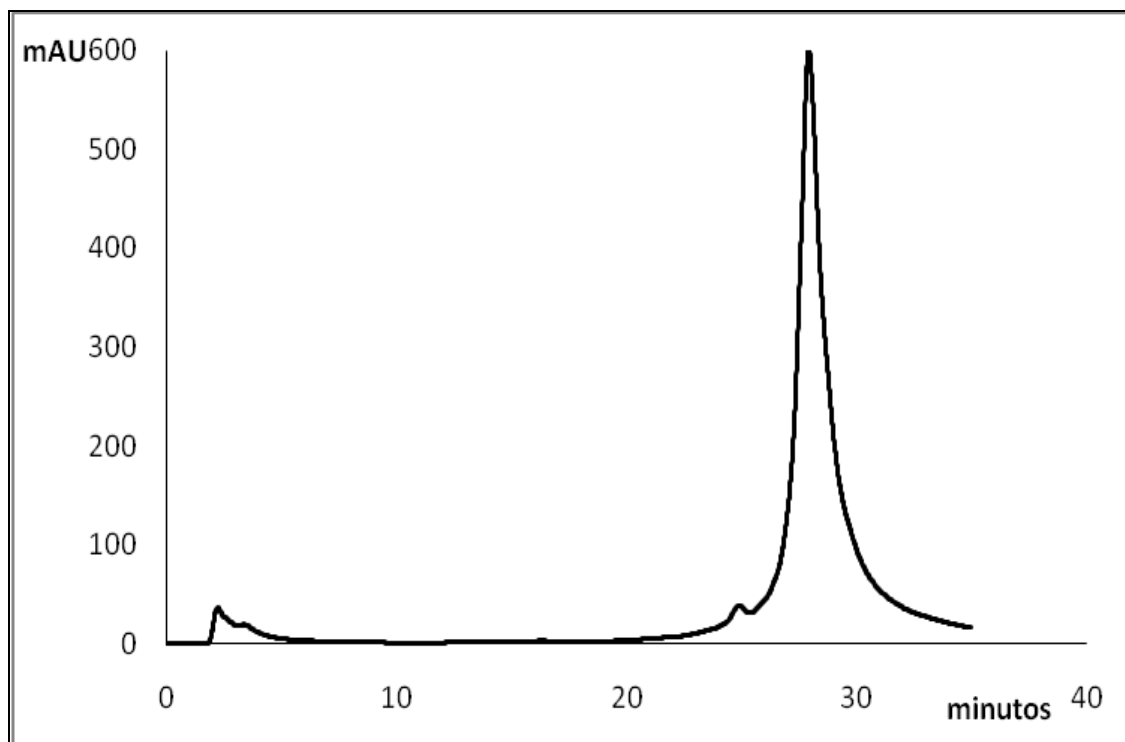


Figura 9. Repurificación del componente CR40. Se observa un compuesto puro.

Para la repurificación de CR12 (el segundo componente de mayor absorbancia), se utilizó un protocolo diferente, de 0% a 30% de ACN. Se realizaron varias repurificaciones para obtener un componente de mayor pureza (figura 10a). Para el componente CR9 se utilizó el mismo protocolo dada la cercanía con el compuesto anterior y así, obtener una mayor pureza (figura 10b).

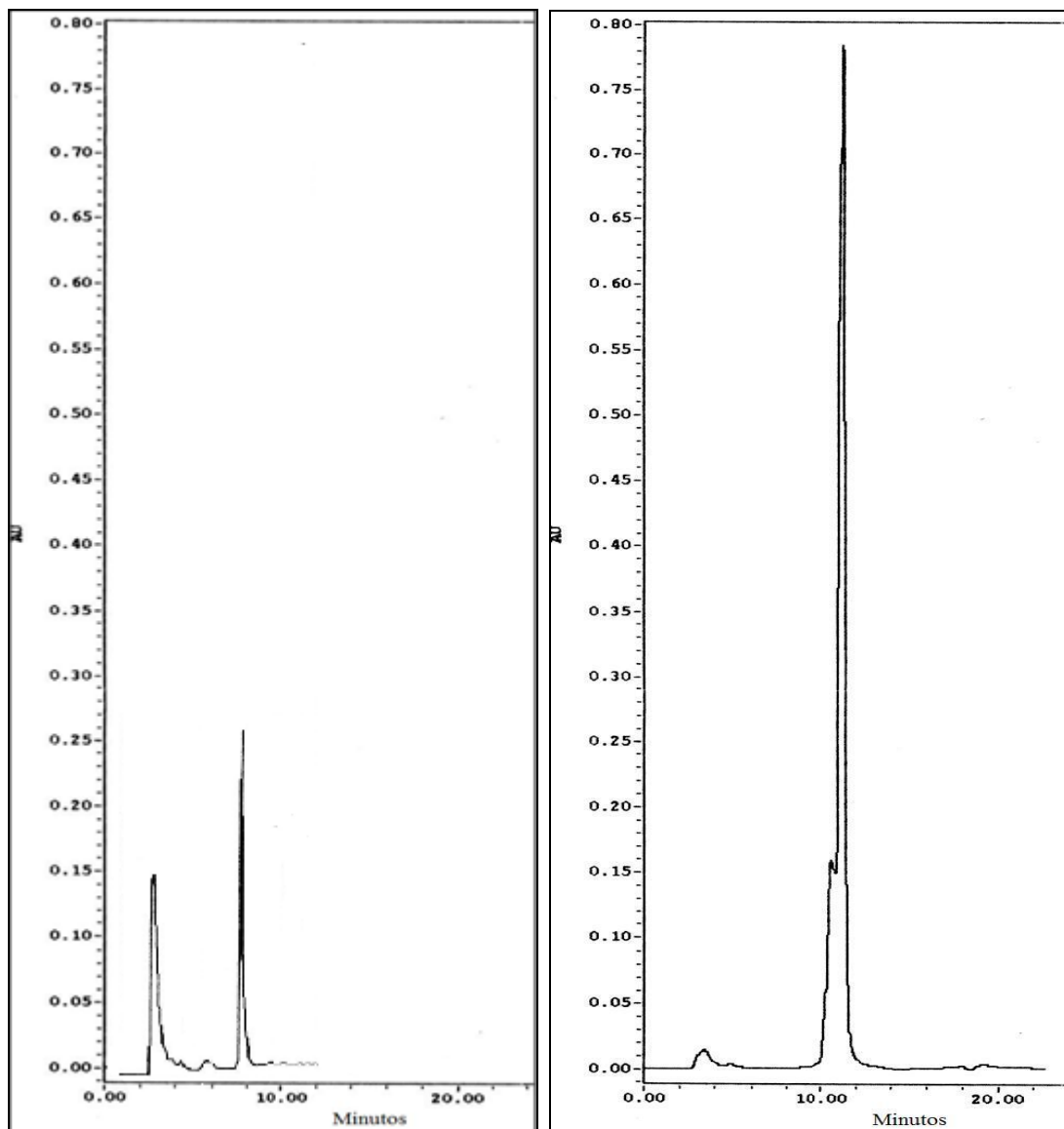


Figura 10. A) Perfil cromatográfico del componente CR12. B) Perfil cromatográfico del componente CR9, observándose picos puros.

En el caso del componente CR42, se utilizó el mismo protocolo para CR40, aunque en este caso se observaron otros componentes de menor tamaño en el perfil, no se tomaron en cuenta debido a la densidad óptica que mostraron (Figura 11).

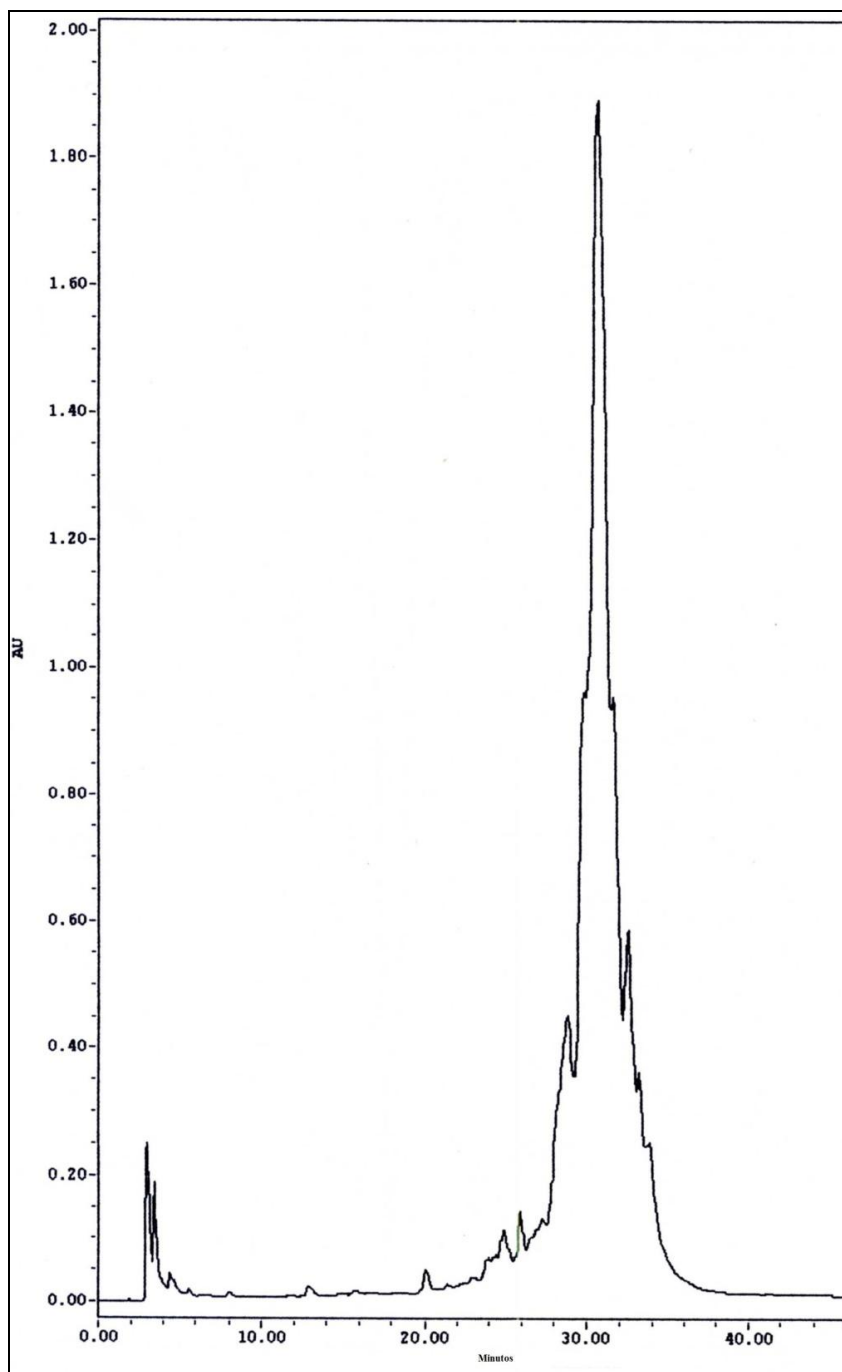


Figura 11. Perfil del componente CR42.

Para los componentes CR17, CR20 y CR21, se realizaron varias repurificaciones utilizando el método de 0% - 30% de ACN, ya que contenían varios componentes, en la figura 12 se muestran los perfiles cromatográficos de CR17 y CR 21.

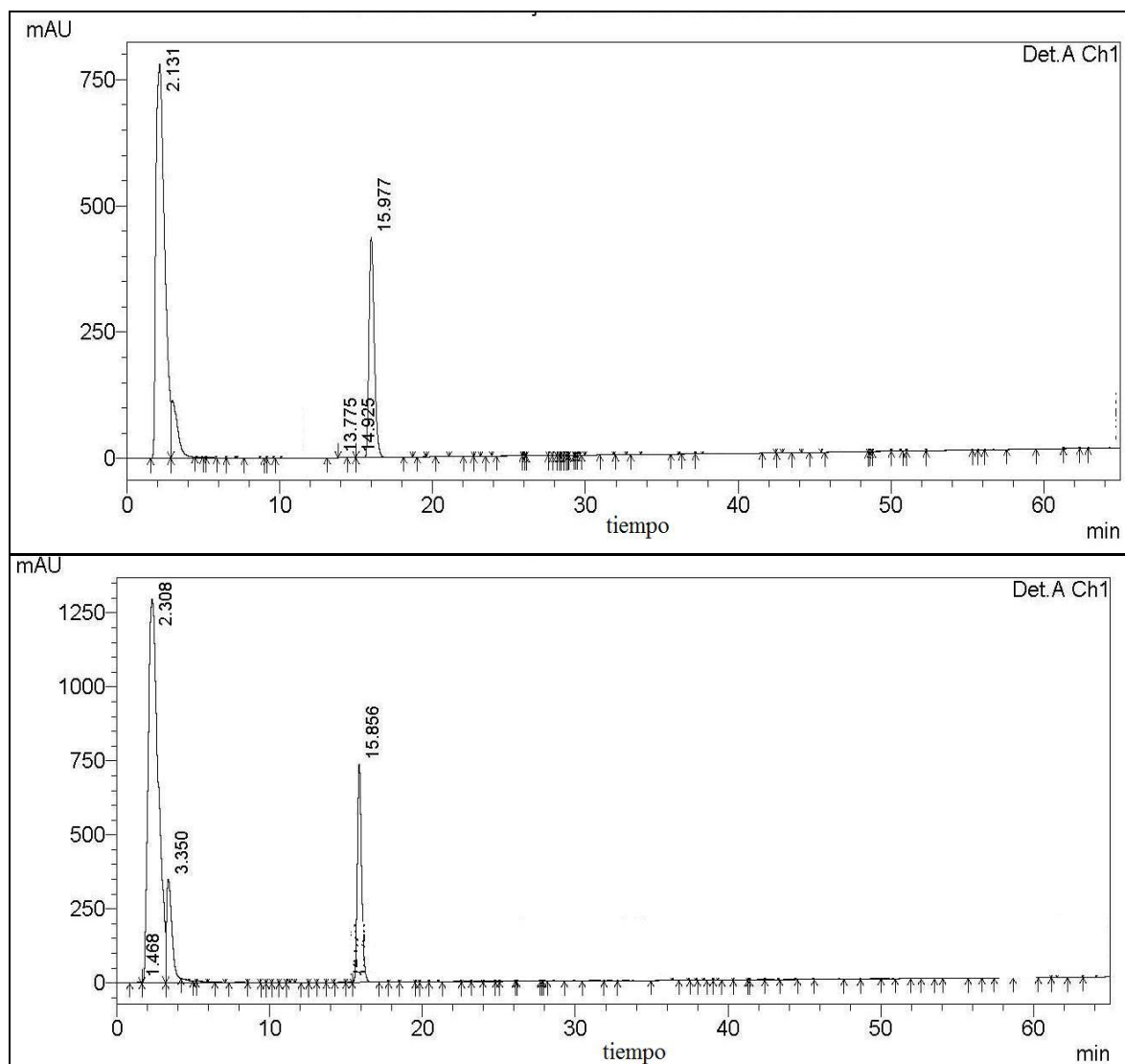


Figura 12. Perfil cromatográfico de CR17 (imagen superior) y CR21 (imagen inferior).

En el caso de CR20, se muestran cuatro picos, dos al principio de la corrida cuyos tiempos de retención se encuentran en los minutos 2.94 y 7.06, los cuales presentan una mayor absorbancia, y otros dos picos a la mitad de la corrida con tiempos de retención de 31.64 y 35.66 minutos, siendo de menor tamaño que los primeros (figura 13). A cada componente se le asignó una letra para nombrarlos (CR20a, CR20b, CR20c y CR20d)

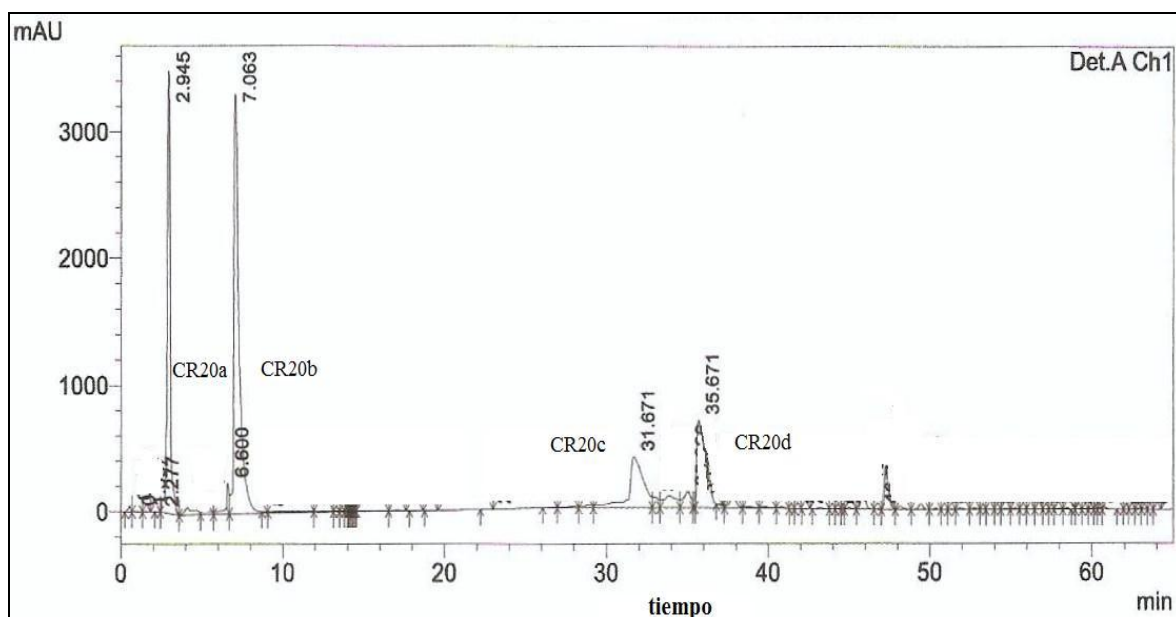


Figura 13. Perfil cromatográfico de CR20 con cuatro componentes de interés denominados CR20a, CR20b, CR20c y CR20d, de acuerdo a su tiempo de retención.

III.3 Espectrometría de masas

De acuerdo a la concentración de cada fracción, se tomaron 5 μ l de cada componente de la solución para inyectarla en el espectrómetro de masas, casi todas las fracciones se presentaron puras. En la figura 14 se observa el componente CR9, en el cual se observa un componente mayoritario mostrando una masa de 3216 Da.

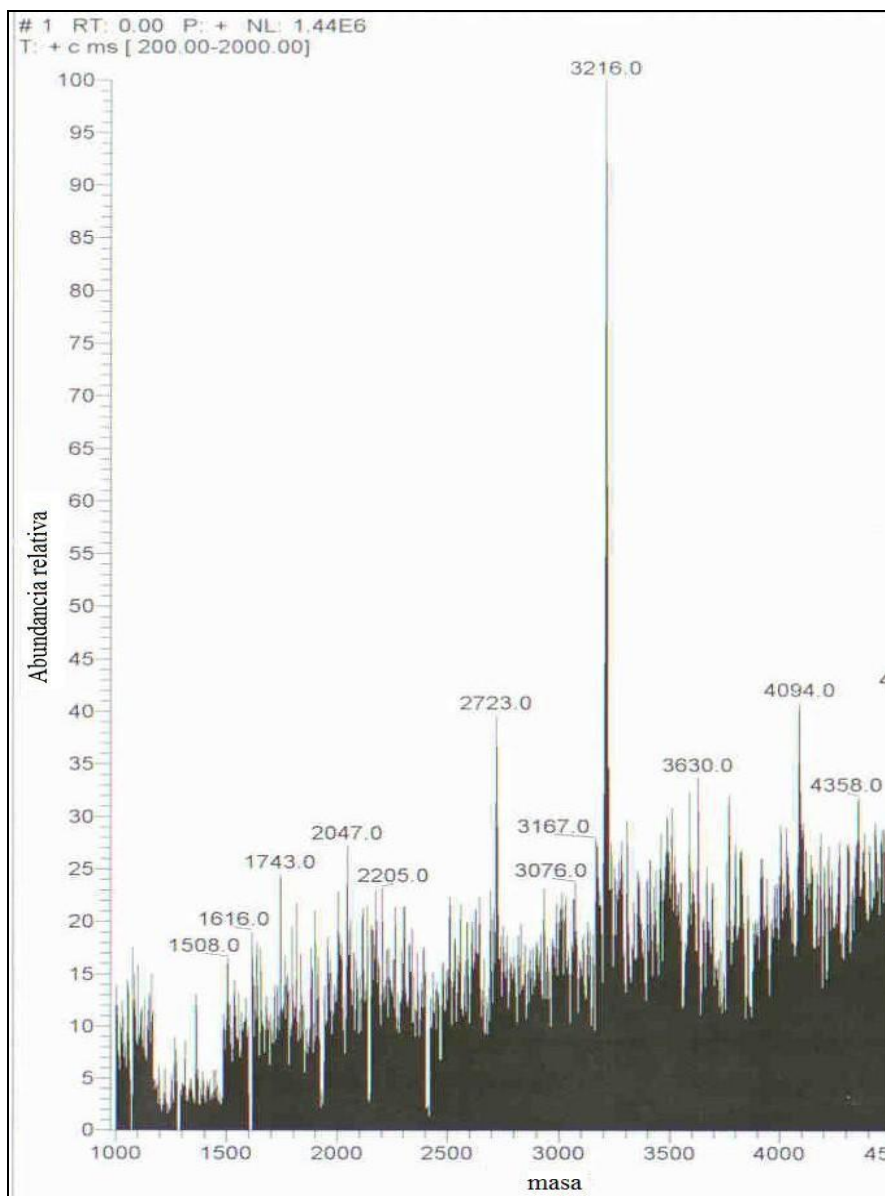


Figura 14. Espectro de masas de CR9. Muestra una masa molecular de 3216 Da.

En el caso de CR12, no se determinó de forma concluyente por lo que no se presentan los datos. En el caso de CR17, se determinó una masa de 3183 Da, Para CR21, tuvo una masa de 1358 Da (figura 15).

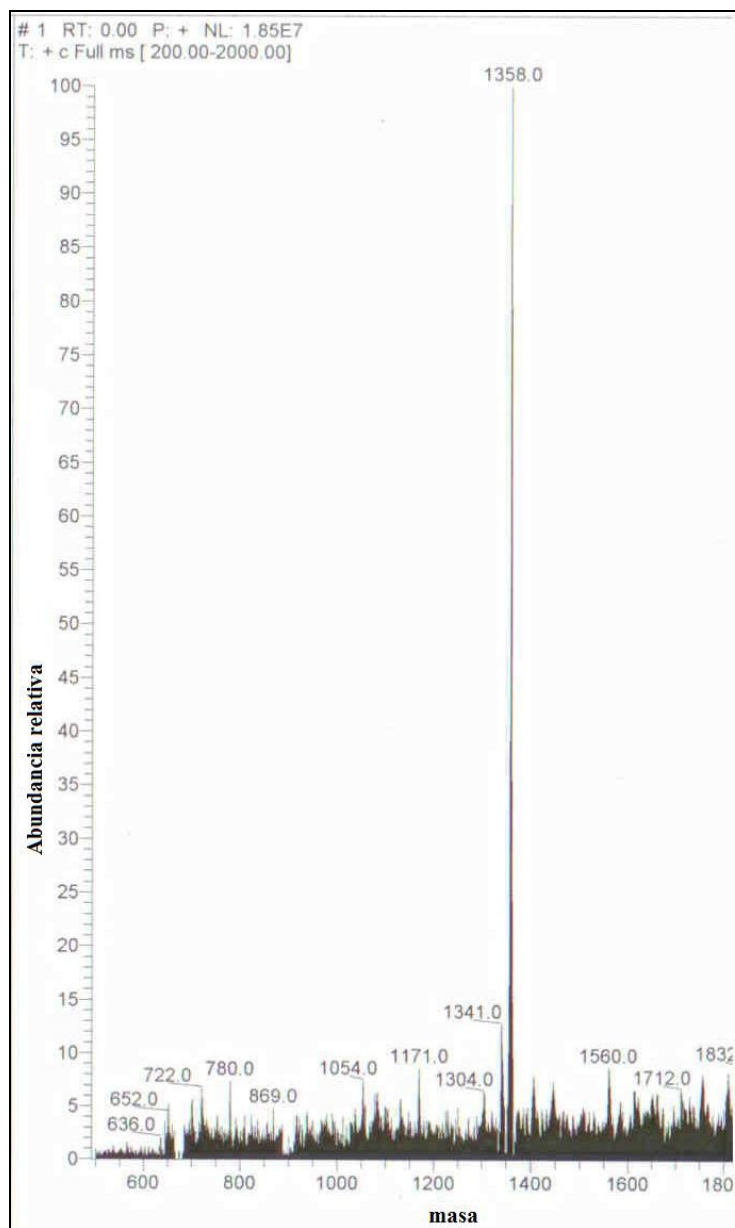


Figura 15. Espectro de masas de CR21. Este componente presenta una masa molecular de 1358 Da.

En el caso de los últimos fracciones, CR40 y CR42, presentan una masa mucho mayor que las anteriores y que la mayoría de los componentes registrados. Teniendo masas de 13,482 Da, para la primera (figura 16) y 10,709 Da, para la segunda (figura 17).

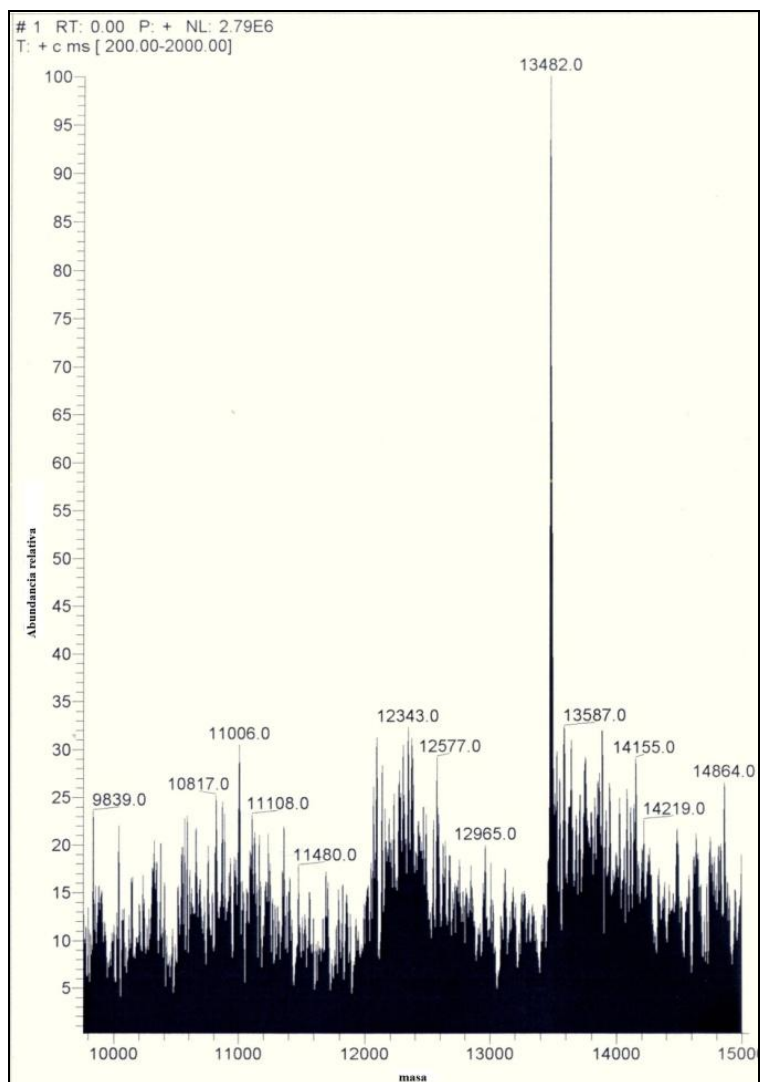


Figura 16. Espectro de masa molecular de CR40. Esta fracción presenta la de mayor masa molecular con 13482 Da.

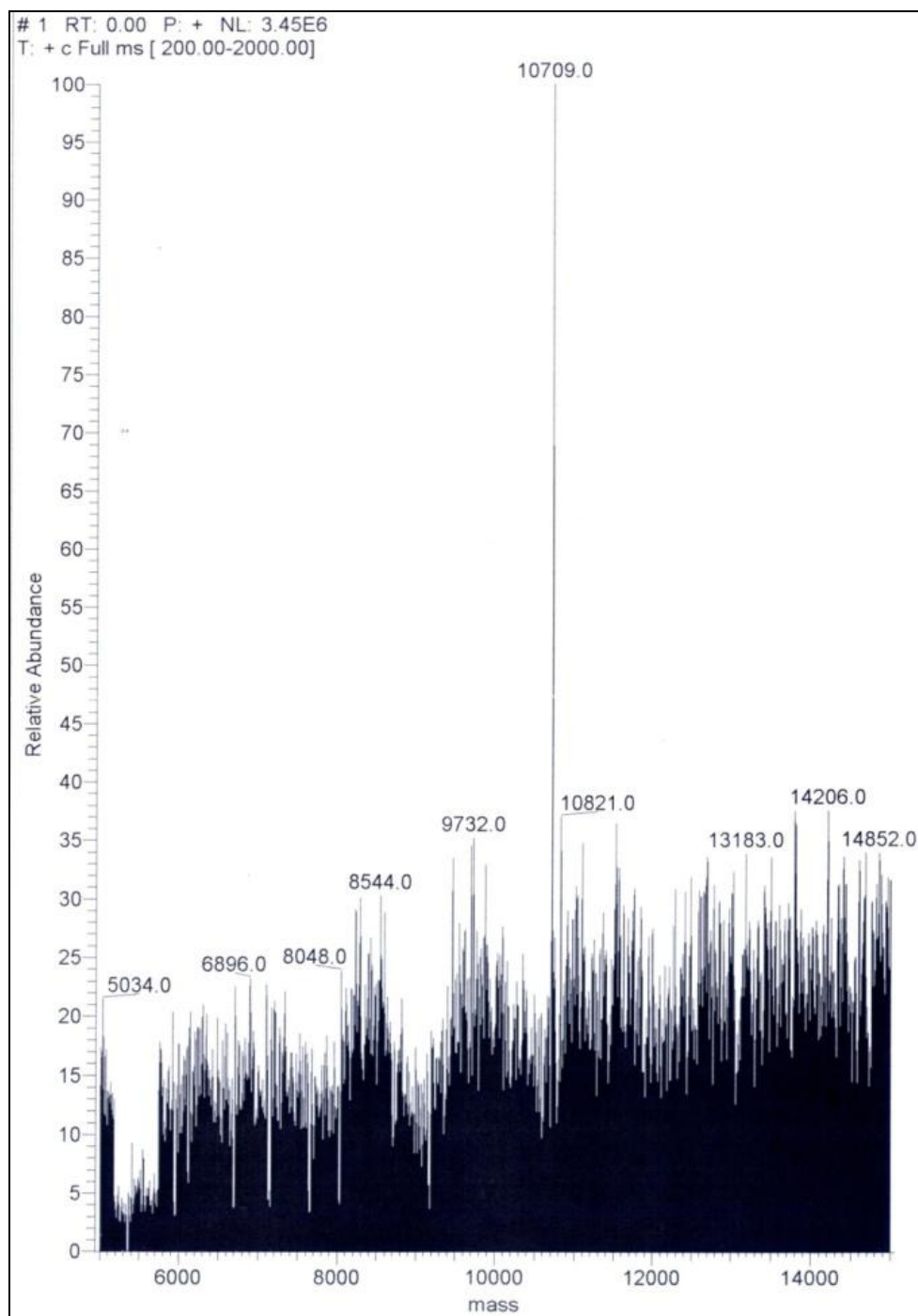


Figura 17. Espectro de masa molecular de CR42. Esta fracción presenta una masa molecular de 10709 Da.

Para el caso de CR20, se midieron las masas de los cuatro componentes que se observaron en las repurificaciones (figura 13). En la primera fracción (CR20a) se tuvo una masa de 4279 Da (Figura 18), para la fracción CR20b no se pudo determinar la masa. En cuanto a los picos siguientes con tiempos de retención en los minutos 30 (CR20c, figura 20) y 35 (CR20d, figura 19), se observan masas de 5012 Da y 4278 Da, respectivamente. Sin embargo, en el caso del componente CR20c, se observa otro componente con una masa molecular de 4279 Da (figura 18), es decir, la misma masa molecular de la fracción CR20a, pero apareciendo 30 minutos después de que fue obtenida en la repurificación por HPLC-RP, por lo que probablemente se trate de una modificación por manipulación de la toxina, ya que presenta los mismos protones. Por otro lado, las masas moleculares de CR20a y CR20d difieren de un solo dalton, lo que posiblemente indique la misma secuencia de aminoácidos con una ligera modificación postraducciona l entre ambos.

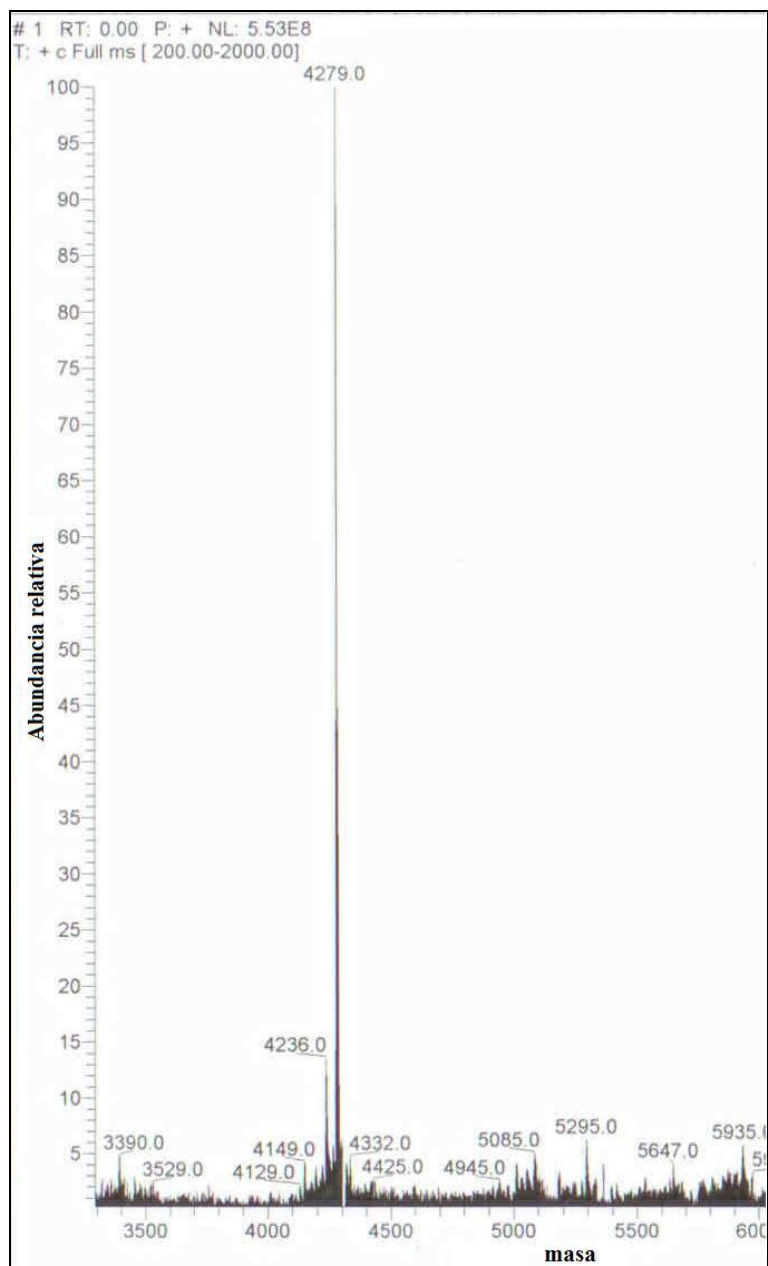


Figura 18. Espectro de masa molecular de CR20a. La subfracción tuvo una masa molecular de 4279 Da.

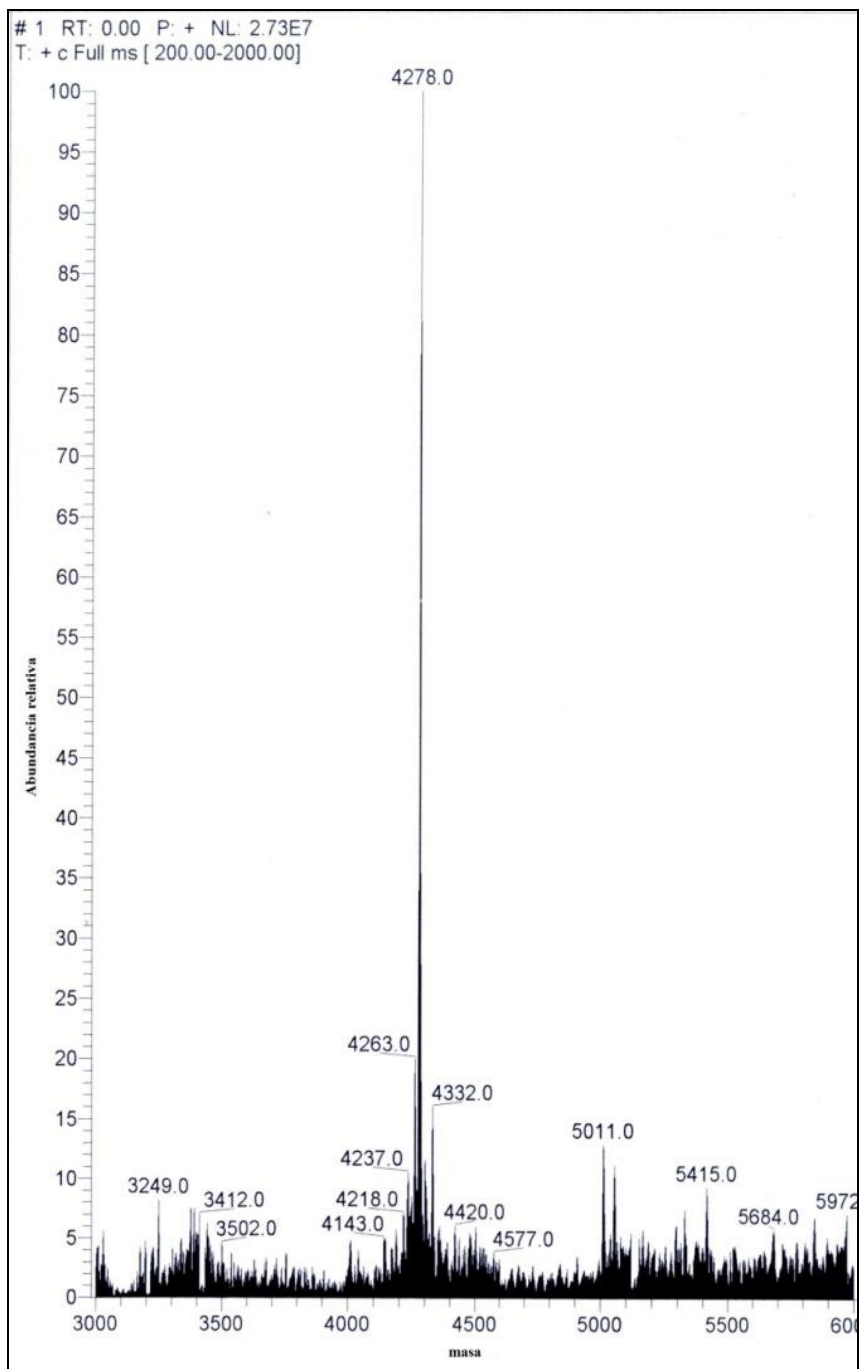


Figura 19. Espectro de masa molecular de CR20d. La subfracción tuvo una masa molecular de 4278 Da, un daltón menos que la subfracción CR20a

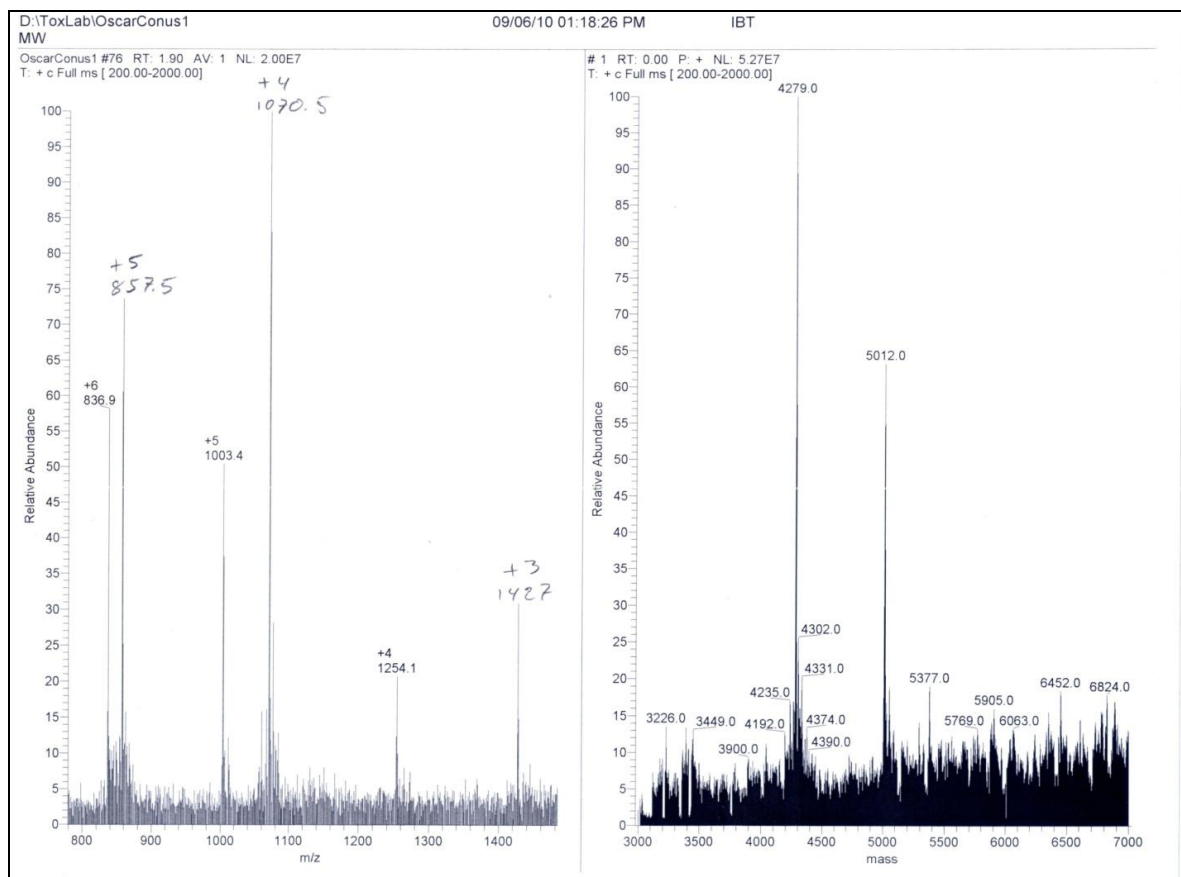


Figura 20. Espectro de masa molecular de CR20c. En la imagen de la izquierda se observan los protones capturados, los que se muestran escritos a mano representan los protones de CR20a, mientras que los escritos en computadora representan a los protones de CR20c. En la figura de la derecha se observan las masas moleculares de CR20c (5012 Da) en menor proporción, mientras que la de mayor proporción se encuentra la masa de CR20a (4279 Da).

En la tabla IV se resumen las masas moleculares de las fracciones mayoritarias obtenidas por espectrometría de masas

Tabla IV. Masas moleculares obtenidas de las fracciones mayoritarias del veneno de *C. regularis*.

N. D. indica datos no disponibles.

*** Repurificación de CR20, el cual proporcionó cuatro fracciones.**

Tiempo de retención	Nombre	Masa molecular (Da)
9	CR9	3,216
12	CR12	N. D.
17	CR17	3,183
2.94*	CR20a	4,279
7.06*	CR20b	N. D.
31.67*	CR20c	5,012 y 4,279
35.67*	CR20d	4,278
21	CR21	1,358
40	CR40	13,482
42	CR42	10,709

III.4 Secuenciación primaria del péptido

La secuencia primaria del péptido CR20a presenta un peso molecular de 4136.2654 Da, con un total de 38 aminoácidos. Este componente presenta la siguiente secuencia:



La cual presenta un patrón de cisteínas característicos de la superfamilia O (C-C-CC-C-C). Para poder determinar el tipo de compuesto que es, se realizó una búsqueda por BLAST, el resultado indica que no hay una secuencia similar a este compuesto.

III.5 Actividad de fosfolipasa

Las fracciones CR40 y CR42 no presentaron actividad fosfolipasas, ya que después de tres días de incubación, no se observó un halo de degradación en el gel, como se mostró en el control positivo (Lecitinasasa C).

IV DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El presente estudio reporta la caracterización bioquímica de un compuesto proveniente de *Conus regularis*, cuyo veneno no se ha caracterizado previamente y la información con respecto a su biología aun es escasa o nula.

CR20a es el primer componente peptídico descrito y caracterizado para *C. regularis*, así como de las especies de caracoles de éste género que habitan en el Golfo de California, ya que no se han realizado estudios con estos organismos. Aunque la función biológica de este compuesto es desconocida, por su secuencia y patrón de cisteínas, es probable que sus blancos moleculares sean canales de Ca^{2+} .

IV.1.1 Fraccionamiento del veneno por HPLC-RP

Al realizar el fraccionamiento del veneno de *C. regularis*, se observó un promedio de 45 componentes proteínicos que lo constituyen al ser fraccionado por HPLC-RP, esto difiere con otros estudios realizados con venenos de especies de este género, que muestran una mayor cantidad de componentes proteínicos que lo conforman, algunos reportan hasta 703 componentes, del veneno de *C. textile*, 276 para el veneno de *C. imperialis*, 320 para el veneno de *C. marmoreus* (Devis, *et al.* 2009); otros reportan menos componentes proteínicos, como el caso de en *C. striatus* que presenta 71 componentes, 103 de *C. victoriae* (Jakubowski, *et al.* 2006), 104 componentes en el veneno de *C. regius* (Viana-Braga, *et al.* 2005). Estos estudios se realizaron procesando el ducto venenoso, pero fraccionando o separando los componentes por medio de espectrometría de masas, o siguiendo una técnica diferente en el fraccionamiento por HPLC. Sin embargo, están dentro del promedio esperado de 50 a 200 componentes en el veneno de *Conus* (Olivera, 1997).

IV.1.2 Espectrometría de masas

Los componentes mayoritarios de *C. regularis* presentan masas moleculares altas a diferencia de las reportadas para otras especies de *Conus*, pero son similares a otros organismos como arañas que pueden llegar a tener pesos moleculares entre 3000 y 5000 Da (Scoubas *et al.*, 2006), serpientes o escorpiones. La masa de CR9 y CR20c fueron de 3216 Da y 5012 Da respectivamente, en el caso de especies de *Conus*, se han reportado masas moleculares similares a as14b del veneno de *C. delesertii* con una masa de 3170 Da (Aguilar, *et al.* 2005), ca16a del veneno de *C. characteristicus*, cuya masa es fue 3517 Da (Yuan, *et al.* 2008), as14a y as14b de *C. austini* (Zugasti-Cruz, *et al.* 2008). Cctx aislado del veneno de *C. consor* con una masa de 5170 Da (Dutertre, *et al.* 2008), ca8a de *C. característico* con una masa de 4606 Da (Liu, *et al.* 2008), s4a y s4b de *C. striatus* con 4080 y 4974 Da respectivamente (Kelley, *et al.* 2006); estas últimas con respecto a las masas similares reportadas en este trabajo, de CR20a, CR20c y CR20d.

Se reportaron dos componentes mayoritarios con masas moleculares muy altas, CR40 y CR42, las cuales fueron de 13,482 Da y 10,709 Da. respectivamente, lo cual es inusual en toxinas de *Conus*. En otros organismos se encuentran este tipo de componentes como en el caso de toxinas de escorpiones (Shwartz, 2008) y serpientes, las cuales las utilizan como defensa y presentan actividades farmacológicas como carditoxicidad, neurotoxicidad, hemólisis, miotoxicidad y acción anticuagulante (Huang y Mackessy, 2004; Sallau *et al.* 2008). Sin embargo, se han descrito algunos compuestos peptídicos de *Conus* con esta actividad, tal es el caso de la Conodipina-M, aislado del veneno de *Conus magus*, y que presentó una masa de 13,600 Da con actividad de fosfolipasa tipo A₂ (McIntosh *et al.* 1995). Sin embargo ambos componentes de *C. regularis* no presentaron esta actividad, es

probable que pueda presentar otro tipo de efecto tal vez con actividad antibacterial, como lo describe Samy, *et al.* (2010, *Art in press.*).

IV.1.3 Modificaciones post-traduccionales

El perfil cromatográfico de CR20 presentó varios componentes al ser purificado por HPLC-RP, por lo que probablemente estuviera contaminado con alguno de las fracciones anteriores (CR17) o posteriores a este (CR21), por la cercanía a CR20 (figura 8). Al realizar las repurificaciones posteriores se vieron cuatro componentes (figura13): CR20a, CR20b, CR20c y CR20d, presentando dos picos mayoritarios de absorbancia considerable en tiempos de retención de 3 y 7 minutos, 30 minutos después aparecen otros dos picos con menor elevación, teniendo tiempos de retención de 30 y 35 minutos. Una vez purificados, se realizó el análisis de espectrometría de masas a cada componente, resultando que la masa molecular de CR20a (4279 Da) reaparece en CR20c (4279 Da), 30 minutos después, con los mismos protones de CR20a. Posiblemente, el componente de CR20a se haya unido a otro compuesto que lo hiciera más hidrofóbico, lo que hizo que tuviera un tiempo de retención de 30 minutos adicionales, por lo que en el espectro de masas apareció otro componente con 5000 Da, formando un dímero alterando la polaridad. Sin embargo, a los cinco minutos de presentarse este fenómeno, aparece otro compuesto con una masa similar pero con una diferencia de un Dalton, 4278 de CR20d con un tiempo de retención de 35 minutos. Esto parece indicar la presencia de una MPT, de tipo amidación en el carboxilo terminal, ya que este tipo de modificaciones pueden disminuir la masa molecular de un daltón en compuestos peptídicos (Jakubowski, *et al.* 2006). Esta modificación se ha reportado en varios compuestos de *Conus* (tabla III). Aunque cabe la posibilidad de que el componente de CR20c, sea un compuesto diferente al caracterizado de CR20a.

IV.1.4 Secuenciación primaria del péptido

CR20 es un polipéptido de 38 péptidos, lo que hace pensar que es una molécula peptídica grande en comparación con lo reportado para conopéptidos y conotoxinas, con tamaños de 10 a 30 aminoácidos (Olivera 1997). No obstante, se han reportado otros compuestos en el veneno de *C. regularis* con tamaños de hasta 49 aminoácidos (Chen, *et al.* 2008). La secuencia no está determinada totalmente, pero los datos obtenidos dan información suficiente para concluir que es un nuevo compuesto.

Se realizó una búsqueda por BLAST para determinar el porcentaje de similitud con otros polipéptidos reportados en el Gen Bank. Los resultados indican un porcentaje de similitud del 55% con el de una δ -conotoxina aislada de *C. purpurascens*, al realizar una comparación más detallada entre las secuencias, la similitud observada fue el arreglo de cisteínas. También, se realizó una búsqueda en la bibliografía donde se presentan conotoxinas de la familia de las ω -conotoxinas (Tabla V), donde se encontró que presenta cinco patrones principales que indica que es un péptido perteneciente a ésta familia y por lo tanto de la superfamilia de la O-conotoxinas (Figura 19) y que al parecer es un nuevo componente aislado del veneno de *Conus*.

círculo verde, con dos residuos de serina y cisteína. Los aminoácidos faltantes en la secuencia de *C. regularis*, aún no se han determinado debido a que la muestra se sigue en proceso de análisis.

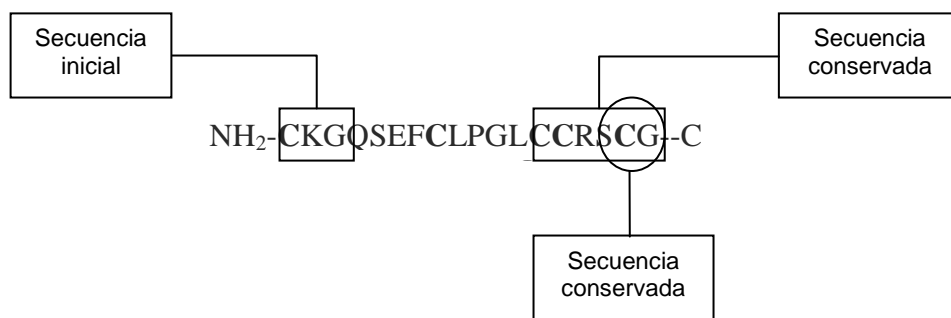


Figura 21. Secuencia del compuesto CR20a con características conservadas que la definen como miembro de la familia ω -conotoxina y de la superfamilia O.

Aunque no se ha determinado su actividad biológica de este compuesto, se puede inferir que CR20a actúa sobre canales de Ca²⁺, ya que los componentes de esta familia actúan sobre este tipo de blancos moleculares (McIntosh, *et al.* 1999).

IV.1.5 Propuesta de nombre

Dado que es un nuevo compuesto de la familia de las conotoxinas, se procede a nombrar a CR20a como re6a, de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Olivera y Cruz (2001):

Re: del organismo del cual fue aislado, *Conus regularis*.

6: es el número propuesto por el arreglo de cisteínas (tabla 1).

a: indica la variante.

IV.2 CONCLUSIONES

El perfil cromatográfico del veneno de *C. regularis* es característico de esta especie.

Los componentes del veneno de *C. regularis* presentaron modificaciones post-traduccionales, las cuales fueron identificadas por métodos como HPLC-RP y espectrometría de masas.

Las masas obtenidas en los componentes mayoritarios del veneno de *C. regularis* fueron superiores a la mayoría de las masas reportadas para otros componentes peptídicos aislados del veneno de otros miembros del género *Conus*.

La secuencia primaria CR20a, aislada de *C. regularis* no presenta homología con otros compuestos descritos anteriormente, lo que indica que es un compuesto nuevo y se propone asignarle el nombre de re6a.

Re6a forma parte de la superfamilia de las O-conotoxinas y de la familia de las ω -conotoxinas, por lo que este compuesto pudiera actuar sobre canales de Ca^{2+} .

V PERSPECTIVAS

Realizar pruebas sobre posibles presas (gusanos, peces o moluscos) o determinar su dieta por estudios de su contenido estomacal y ampliar más la información en cuanto a la biología de este caracol.

Realizar ensayos electrofisiológicos con CR20a (re6a) en canales de Ca^{2+} y observar la posible función de este componente sobre su blanco molecular.

Realizar la secuenciación primaria de los demás componentes para confirmar la presencia de nuevos péptidos con actividad biológica sobre algún blanco molecular.

Realizar bioensayos en otros organismos como bacterias, hongos, líneas celulares o invertebrados y observar si se presenta actividad *in vivo*.

VII LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. B., López-Vera, E., Imperial, J.S., Falcón, A., Olivera, B. M. y Heimer de la Cotera, E. P. 2005. **Putative γ -conotoxins in Vermivorous Cone Snails: the Case of *Conus delessertii*.** *Peptides*. 26:23-27.
- Aneiros, A. y Garateix, A. 2004. **Bioactive Peptides from Marine Sources: Pharmacological Properties and Isolation Procedures.** *Journal of Chromatography*. 803:41-53.
- Becker, S. y Terlau, H. 2008. **Toxins from Cone Cnails: Properties, Applications and Biotechnological Production.** *Microbiol. Biotechnol.* 79:1-9.
- Bennett, M. R., Farnell, L., Gibson, W. G. y Karunanithi, S. 1995. **Quantal Transmission at Purinergic Junctions: Stochastic Interaction between ATP and its Receptors.** *Biophysical Journal*. 68:925-935.
- Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.-P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K. J., Bernaldez, J., Licea-Navarro, A., Cornlei, P. S. y Olivera, B. M. 2010. **Evolution of *Conus* peptide toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56(1):1-12.
- Chen, P., Garret, J. E., Watkins, M. y Olivera, B. M. 2008. **Purification and Characterization of a Novel Excitatory Peptide from *Conus distans* Venom that Defines a Novel Gene Superfamily of Conotoxins.** *Toxicon*. 52:139-145.
- Clark, R. J., Fischer, H., Nevin, S. T., Adams, D. J. y Craik, D. J. 2006. **The Synthesis, Structural Characterization and Receptor Specificity of the α -Conotoxin Vc1.1.** *Journal of Biological Chemistry*. 281(32):23254-23263.
- Craig, A. C., Bandyopadhyay, P. y Olivera, B. M. 1999. **Post-Tranlationally Modified Neuropeptides from *Conus* Venoms.** *European Journal of Biochemistry*. 264:271-275.
- Dall, W. H. 1910. **Summary of the Shells of Genus *Conus* from the Pacific Coast of america in the U S National Museum.** *Government Printing Office*. 38:217-228.

- Davis, J. Jones, A. y Lewis, R. J. 2009. **Remarkable Inter- and Intra-Species Complexity of Conotoxins Revealed by LC/MS.** *Peptides*. 30:1222-1227.
- Díaz, J. M., Gracia, A. M. y Cantera, J. M. 2005. **Checklist of the Cone Shells (Mollusca: Gastropoda: Neogastropoda: Conidae) of Colombia.** *Biota Colombiana*. 6(1):73-86.
- Dutertre, S. Biass, D., Stöcklin, R. y Favreau, P. 2010. **Dramatic Intraspecimen Variations with the Injected Venom of *Conus consor*: An Unsuspected contribution to Venom Diversity.** *Toxicon*. 55:1453-1462. Eble. 2010.
- Eble, J. A. 2010. **Matrix Biology Meets Toxinology.** *Matrix biology. Art. In Press*.
- Escoubas, P., Sollod, B. y King, G. F. 2006. **Venom Landscapes: Mining the Complexity of Spider Venoms Via a Combined cDNA and Mass Spectrometric Approach.** *Toxicon*. 47:650-663.
- Espiritu, D. J. D.; Watkins, M.; Dia-Monje, V.; Cartier, G. E.; Cruz, L. J. y Olvera, B. M. 2001. **Venomous Cone Snails: Molecular Phylogeny and the Generation of Toxin Diversity.** *Toxicon*. 39:1899-1916.
- Farley, A. R. y Link, A. J. 2009. **Identification and Quantification of Protein Posttranslational Modifications.** *Methods in Enzymology*. 463:725-763.
- Favreau, P; Menin, L.; Michalet, S.; Perret, F.; Cheneval, O.; Stöcklin, M; Bulet, P y Stöcklin R . 2006. **Mass Spectrometry Strategies for Venom Mapping and Peptide Sequencing from Crude Venoms: Case Applications with Single Arthropod Specimen.** *Toxicon*. 47:676-687.
- Favreau, P. y Stöcklin, R. 2009. **Marine Snail Venoms: Use and Trends in Receptor and Channel Neuropharmacology.** *Pharmacology*. 9:594-601.
- Fusetani, N. y Kem. W. 2009. **Marine Toxines and Research Tools.** *Series Editors*. 259 pp.
- González-Villarreal, L. M. 2005. **Guía Ilustrada de los Gasterópodos Marinos de la Bahía de Tenacatita, Jalisco, México.** *Scientia-CUCBA*. 7(1):1-84.

- Gowd.K. H., Twede, V., Watkins, M., Krishnan, K.S., Teichert R. W., Bulaj, G. y Olivera, B. M. 2008. **Conantocin-P, an Unusual Conantokin with a Long Disulfide Loop.** *Toxicon*. 52(2):203-213.
- Han, Y., Huang, F., Jiang, H., Liu, L., Wang, Q., Wang, Y., Shao, X., Chi, C., Du, W. y Wang, C. 2008. **Purification and Structural Characterization of a D-amino Acid-containing Conopeptide, Conomarphin, from *Conus marmoreus*.** *FEBS Journal*. 275:1976-1987.
- Huang, P. y Mackessy, S. P. 2004. **Biochemical Characterization of Phospholipase A₂ (Trimorphin) from the Venom of the Sonoran Lyre Snake *Trimorphodon biscutatus lambda* (family Colubridae).** *Toxicon*. 44(27-36).
- Jakubowky, J. A.; Kelley, W. P. y Sweedler, J. V. 2006. **Screening for Post-translational Modifications in Conotoxins Using Liquid Chromatography/mass spectrometry: an Important Componente of Conotoxin Discovery.** *Toxicon*. 47:688-699.
- Jiménez, J. C., Marfil, M. Francesch, A. M., Cuevas, C., Alvarez, M. y Albericio, F. 2007. **Productos Naturales de Origen Marino.** *Investigación y Ciencia*. 75-83.
- Jones, R. M y Burlaj, G. 2000. **Conotoxins-New Vistas for Peptides Therapeutics.** *Current Pharmaceutical Design*. 6,1249-1285.
- Keen, A. M. 1971. **Sea Shells of Tropical West America: Marine Mollusks from Baja California to Peru.** Stanford University Press. Second edition. Pp. 1064.
- Kelley, W. P., Schulz, J. R., Jakubowski, J. A., Gilly, W. F. y Sweedler, J. V. 2006. **Two Toxins from *Conus striatus* that Individually Induce Tetanic Paralysis.** *Biochemistry*.45(47):14212-14222.
- Kerstitch, A. y Berstch, H. 2007. **Sea of Cortez Marine Invertebrates, A Guide for the Pacific Coast, México to Perú.** *Sea Challengers*. Segunda edition. 100 pp.
- Khon, A. 1956. **Piscivorous Gastropods of the Genus *Conus*.** *Zoology*. 42:168-171.
- Lewis, R. L. y Garcia, M. L. 2003. **Therapeutic Potential of Venom Peptides.** *Nature Reviews Drug Discovery*. 2:790-802.

- Liu, L., Wu, X., Yuan, D. D., Chi, C. y Wang, C. 2008. **Identification of a Novel S-Superfamily Conotoxin from Vermivorous *Conus caracteristicus***. *Toxicon*. 51 :1331-1337.
- Luna-Ramirez, K., Aguilar, M. B., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E. P. Olivera, B. M. y Maillo, M. 2007. **An O-Conotoxin from Vermivorous *Conus spurius* Active on Mice and Mollusks**. *Peptides*. 28:24-30.
- Massilia, G. R., Schininà, M. E., Ascenzi, P. y Polticelli, F. 2001. **Contryphan-Vn: A Novel Peptide from the Venom of Mediterranean Snail *Conus ventricosus***. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288:908-913.
- McIntosh, J. M., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Dooley, D. J., Stoehr, S. J., Giordani, A. B., Naisbitt, S. R. y Olivera, B. M. 1995. **Conodipine-M, a Novel Phospholipase A₂ Isolated from the Venom of the Marine Sanail *Conus magus***. *The Journal Biological Chemistry*. 270:3518-3526.
- McIntosh, J. M., Olivera, B. M. y Cruz, L. J. 1999. ***Conus* Peptides as Probes for Ion Channels**. *Methods in Enzymology*. 294:605-624.
- McIntosh, J. M., Santos, A. D. y Olivera, B. M. 1999. ***Conus* Peptides Targeted to Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes**. *Annual Review of Biochemistry*. 68: 59-88.
- Menéz, A., Stöcklin, R. y Mebs. D. 2006. **The Venomous Vystem Genome Project**. *Toxicon*. 47:255-259.
- Miloslavina, A., Ebert, C., Tietze, D., Ohlenshläger, O., Englert, C. Görlach, M. e Imhof, D. 2010. **An Unusual Peptide from *Conus villepini*: Sybthesis, Solution Structure, and Cardioactivity**. *Toxicon*. *In press*.
- Miller, C. 2000. **Ion Channels: Doing Hard Chemistry With Hard Ions**. *Chemical biology*, 4:148-151.
- Möller, C y Marí, F. 2007. **A Casopressin/Oxytocin-Related Conopeptide with γ -Carboxyglutamate at Position 8**. *Biochem. J*. 404:413-419.
- Norton, R. S. y Olivera, B. M. 2006. **Conotoxins down Under**. *Toxicon*. 48:780-798.
- Olivera, B. M. 1997. ***Conus* Venom Peptides, Receptor and Ion Chanel Target, and Drugs Desing: 50 Million Years of Neuropharmacology**. *Molecular Biology of the Cell*. 8:2101-2109.

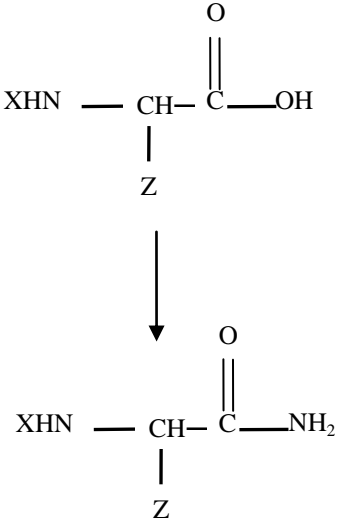
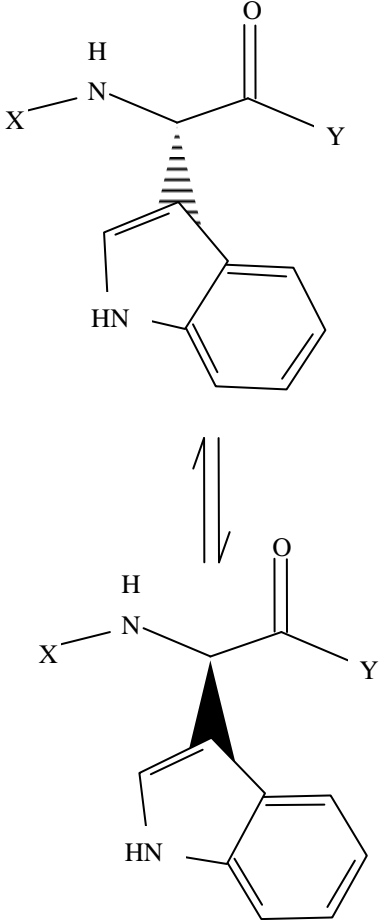
- Olivera, B. M. 1999. **Conus Venom Peptides: Correlating Chemistry and Behavior.** *J. Comp. Physiol. A.* 185:353-359.
- Olivera, B. M. y Cruz, L. J. 2001. **Conotoxin, in Retrospect.** *Toxicon.* 39:7-14.
- Oman, T. J. y Van der Donk, W. A. 2010. **Follow the leader: The Use of Leader Peptides to Guide Natural Product Biosynthesis.** *Nature Chemical Biology.* 6:1-18
- Peng, C., Liu, L., Shao, X. Chi, C. y Wang, C. 2008. **Identification of a Novel Class of Conotoxins Defined as V-conotoxins with a Unique Cysteine Pattern and Signal Peptide Sequence.** *Peptides.* 29:985-991.
- Purchon, E. D. 1977. **The Biology of the Mollusca.** Pergamon Press. Second edition. Pp. 560.
- Quinton, L., Le Caër, J. P., Vinh, J., Gilles, N. y Chamot-Rooke, J. 2006. **Fourier Transform Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Toxin Analysis.** *Toxicon.* 47:715-726.
- Sallau, A. B., Ibrahim, M. A. Salihu, A. y Patrick, F. U. 2008. **Characterization of Phospholipase A₂ (PLA₂) from *Echis ocellatus* Venom.** *African Journal of Biochemistry Research.* 2(4):98-101.
- Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., Bow, H., Puspharaj, P. N. y Chow, C. T. K. 2010. **Identification and Characterization of a Phospholipase A₂ from the Venom of the Saw –Scaled Viper: Novel Bactericide and Membrane Damage activities.** *Biochemie. In Press.*
- Schwartz, E.; Camargos, T. S.; Zamudio, F. Z.; Silva, L. P.; Bloch Jr. C.; Caixeta, F.; Schwartz, C. A. y Possani L. D. 2008. **Mass Spectrometry Analysis, Amino Acid Sequence and Biological Activity of Venom Components from the Brazilian Scorpion *Opisthacanthus cayaporum*.** *Toxicon.* 5:1499-1508.
- Stanley, T. B., Darrel, W. S., Baldomero, M. O. y Bandyopadhyay, P. K. **Identification of a Vitamin K-dependent carboxylase in the Venom Duct of a *Conus* Snail.** *FEBS letters.* 407:85-88.
- Stewart, J. y Gilly, W. F. 2005. **Piscivorous Behavior of a Temperate Cone Snail, *Conus californicus*.** *Biol. Bull.* 209:146-153.

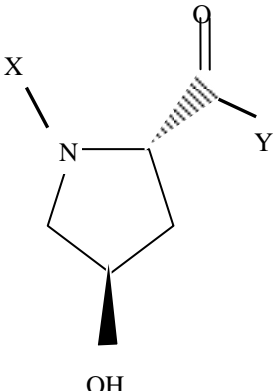
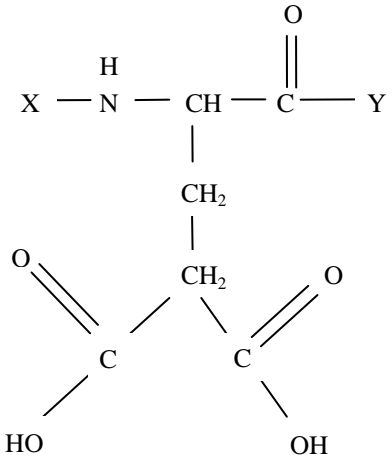
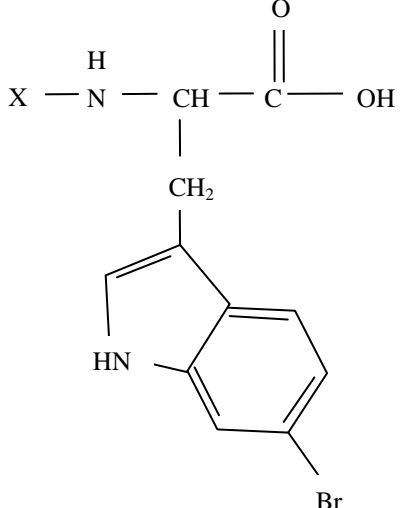
- Rigby, A. C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D. E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J. D., Furie, B. C. Furie, B. y Stenflo, J. 1999. **A Conotoxin from *Conus textile* with Unusual Posttranslational Modifications Reduce Presynaptic Ca^{2+} Influx.** *Neurobiology*. 96:5758-5763.
- Russell, F. E. 1984. **Marine Toxines and Venomous and Poisonous Marine Plants and Animals (Invertebrates).** *Marine Biology*. 21:59-217
- Terlau, H. y Olivera, B. M. 2004. ***Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides.** *Physiol. Rev.* 84:41-68.
- Viana-Braga, M. C., Konno, K., Portaro, F. C. V., de Freitas, J. C., Yamane, T., Olivera, B. M. y 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*. 45:113-122.
- White, H. S., McCabe, R. T., Armstrong, H., Donevan, S. D., Cruz, L. J., Abogadie, F. C. Torres, J., Rivier, J. E. Paarmann, I., Hollmann, M. y Olivera, B. M. 2000. **In Vitro and In Vivo Characterization of Conantokin-R, a Selective NMDA Receptor Antagonista Isolated from the Venom on the Fish-Hunting Sail. *Conus raduatus*.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 292:425-432.
- Yuan, D. D., Liu, L., Shao, X. X., Peng, C., Chi, C. W. y Guo, Z. Y. 2008. **Isolation and Cloning of a Conotoxin With a Novel Cysteine Pattern from *Conus characteristicus*.** *Peptides*. 29:1521-1525.
- Zugasti-Cruz, A., Maillo, M., López-Vera, E., Falcón, A., Heimer de la Cotera, E. P., Olivera, B. M. y Aguilar, M. B. 2006. **Amino Acid Sequence and Biological Activity of a γ -Conotoxina-Like Peptide from the Worm-Hunting Snail *Conus austini*.** *Peptides*. 27:506-511.

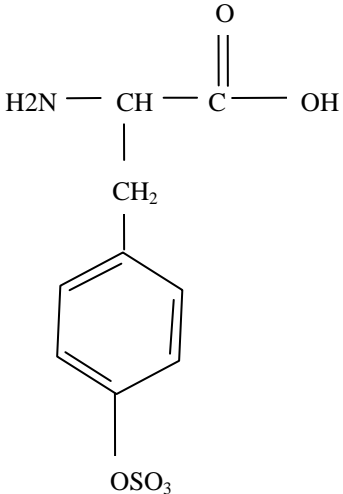
VII ANEXOS

Anexo I. Modificaciones post-traduccionales en *Conus*

Modificación	Masa (Da)	Sitio	Estructura
Piroglutaminación	-17 (-18)	Gln (Glu)	
Formación de enlaces disulfuro	-2	Cys	

Amidación	-1	C-terminal seguida de Gly-Lys o Gly-Arg	
L a D-epimerización	0	Trp, Phe, Val	

Hidroxilación	+16	Pro (4- <i>trans</i>) Val (posición γ)	
Carboxilación	+44	Glu (posición γ)	
Brominación	+78	Trp (posición 6)	

Sulfonación	+80	Tyr	
Glicosilación	Varia, azúcares que contienen hexosas (+162) y N-acetilhexosamina (+203)	O-ligada a Ser, Thr*	