

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS**

**ESTUDIO HISTOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL  
CONDUCTO VENENOSO DEL CARACOL MARINO *Conus perplexus***



**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
CON OPCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**VALERIA MIRANDA ARIZMENDI**

**Hermosillo, Sonora**

**Octubre del 2019**

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **FORMATO DE APROBACIÓN**

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Valeria Miranda Arizmendi la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología

---

M.C. Erick Jose Ponce Manjarrez  
Director de Tesis

---

Dra. Perla Urquidez Bejarano  
Secretario Sinodal

---

Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros  
Sinodal

---

Dr. Miguel Cuevas Cruz  
Suplente

---

Dr. Sergio Agustín Román Gonzales  
Asesor Externo

## DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo incondicional, por darme el valor y el impulso para salir adelante, por darme las herramientas para alcanzar mis metas y por siempre motivarme a dar lo mejor de mí.

A mi hermana Pau por ser mi confidente, por su apoyo emocional y por siempre hacerme reír con sus ocurrencias.

A mis abuelos y tíos por su cariño, su apoyo y por siempre creer en mí.

*Por este logro y más estoy eternamente agradecida con ustedes.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por contribuir a mi formación como Bióloga con acentuación en Biotecnología.

Al Instituto de Química en la UNAM y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) por su apoyo y disposición para realizar mi tesis.

A los miembros de mi comité de tesis, el M.C. Erick Ponce, la Dra. Perla Urquidez, el Dr. Roberto Arreguín, el Dr. Miguel Cuevas y el Dr. Sergio Román; por permitirme formar parte de este proyecto, por su orientación, tiempo y dedicación para que todo saliera en tiempo y forma. Por compartir sus conocimientos y su pasión por la ciencia.

A Valeria Maleny, Dalila, Carolina y Daniela por ser mis compañeras de carrera, de proyecto y de aventura.

A mis compañeros de laboratorio durante mi estancia en la Instituto de Química, por hacer esta experiencia tan provechosa y a la vez divertida.

A mis amigos de biología, a mis amistades de regreso en casa y a todos los que acompañaron en el camino, por su gran aprecio y sus porras en todo momento.

## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>  | 1  |
| <b>II. ANTECEDENTES</b>   | 4  |
| II.1. Características Generales de los Caracoles <i>Conus</i>                         | 4  |
| II.2. Función y Anatomía del Aparato Venenoso   | 5  |
| II.3. Descripción Histológica del Conducto Venenoso                                   | 6  |
| II.4. Veneno del género <i>Conus</i>  | 7  |
| II.4.1. Conotoxinas y Síntesis  | 7  |
| II.4.2. Modificaciones Post-traduccionales  | 10 |
| II.4.3. Clasificación de Superfamilias  | 10 |
| II.4.4. Blancos Moleculares y Fisiología  | 11 |
| II.4.5. Actividad Sobre Canales Iónicos Regulados por Voltaje                         | 12 |
| II.5. Métodos para la Caracterización de Conopéptidos                                 | 14 |
| II.5.1. Cromatografía Líquida de Alto Desempeño de Fase Reversa                       | 14 |
| II.5.2. Espectrometría de Masas   | 15 |
| II.6. Características Biológicas y Clasificación Taxonómica de <i>Conus perplexus</i> | 16 |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN</b>   | 18 |
| <b>IV. HIPÓTESIS</b>  | 19 |
| <b>V. OBJETIVO</b>  | 20 |
| V.1. Objetivo General   | 20 |
| V.2. Objetivos Específicos  | 20 |
| <b>VI. METODOLOGÍA</b>  | 21 |
| VI.1. Características de la Zona de Colecta   | 21 |
| VI.2. Colecta de Organismos   | 22 |
| VI.3. Disección del Aparato Venenoso  | 22 |
| VI.3.1. Análisis Histológico del Conducto   | 24 |

|   |    |
|---|----|
| VI.4. Extracción del Veneno y Cuantificación del Veneno | 24 |
| VI.4. Caracterización Bioquímica                        | 25 |
| VI.5.1. Fraccionamiento por RP-HPLC                     | 25 |
| VI.5.2. Espectrometría de Masas por MALDI-TOF           | 26 |
| VI.6. Análisis Estadístico                              | 27 |
| <b>VII. RESULTADOS</b>                                  | 28 |
| VII.1. Análisis Histológico del Conducto                | 28 |
| VII.2. Caracterización Bioquímica                       | 30 |
| VII.2.1. Fraccionamiento por RP-HPLC                    | 30 |
| VII.2.2. Cuantificación y comparación de conotoxinas    | 33 |
| VII.2.3. Espectrometría de Masas por MALDI-TOF          | 36 |
| <b>VIII. DISCUSIÓN</b>                                  | 40 |
| VIII.1. Estudio Histológico                             | 40 |
| VIII.2. Caracterización Bioquímica                      | 41 |
| VIII.3. Espectrometría de Masas por MALDI-TOF           | 42 |
| <b>IX. CONCLUSIONES</b>                                 | 44 |
| <b>X. RECOMENDACIONES</b>                               | 45 |
| <b>XI. LITERATURA CITADA</b>                            | 46 |
| <b>XII. APENDICES</b>                                   | 54 |

## LISTA DE TABLAS

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Tabla I | Familias farmacológicas de conotoxinas (tomada de Kaas, et al., 2010). | 13 |
|---------|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Representación anatómica del aparato venenoso del género <i>Conus</i> .  | 6  |
| Figura 2  | Proceso de maduración de las conotoxinas.  | 9  |
| Figura 3  | Concha y cuerpo blando de <i>Conus perplexus</i> colectado en Bahía de Kino, Sonora.   | 17 |
| Figura 4  | Mapa del área de muestreo en Bahía de Kino, Sonora.  | 21 |
| Figura 5  | Aparato venenoso extraído de <i>Conus perplexus</i> .  | 23 |
| Figura 6  | Gradiente de elución empleado en el fraccionamiento por RP-HPLC.   | 26 |
| Figura 7  | Micrografías de los cortes histológicos del aparato venenoso de <i>Conus perplexus</i> .   | 29 |
| Figura 8  | Cromatograma de la región proximal de <i>Conus perplexus</i> .   | 30 |
| Figura 9  | Cromatograma de la región media de <i>Conus perplexus</i> .  | 31 |
| Figura 10 | Cromatograma de la región distal media de <i>Conus perplexus</i> .   | 32 |
| Figura 11 | Comparación de los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC.  | 32 |
| Figura 12 | Diagrama de caja del área bajo la curva correspondientes a las regiones proximal, media y distal.  | 33 |
| Figura 13 | NMDS de las fracciones individuales obtenidas de las regiones proximal, media y distal del conducto venenoso de <i>Conus perplexus</i> . | 34 |
| Figura 14 | Histograma de frecuencias ANOSIM.  | 35 |
| Figura 15 | Cluster de similitud obtenido de las tres regiones del aparato venenoso.   | 35 |
| Figura 16 | Espectro de masas de la región proximal obtenido por MALDI-TOF en una matriz de CHCA.  | 36 |
| Figura 17 | Espectro de masas de la región media obtenido por MALDI-TOF en una matriz de SA.   | 37 |
| Figura 18 | Espectro de masas de la región proximal obtenido por MALDI-TOF en una matriz de CHCA.  | 38 |
| Figura 19 | Comparación de los espectros de masas de las regiones proximal, media y distal de <i>Conus perplexus</i> .                               | 39 |

## RESUMEN

Los gasterópodos pertenecientes al género *Conus* son de gran interés en el ámbito farmacéutico debido a que son una novedosa fuente de compuestos bioactivos con gran afinidad por objetivos moleculares como canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y/o transportadores de neurotransmisores. Estos organismos producen toxinas de origen peptídico conocidas como conotoxinas, las cuales son sintetizadas en un aparato venenoso que consta de un bulbo, un conducto venenoso y un saco rádular. Múltiples autores establecen que la síntesis de estos compuestos se lleva a cabo en el conducto venenoso, sin embargo, se han reportado diferencias tanto a nivel tisular como peptídico en cuanto a la relación masa/carga de los péptidos presentes en diferentes regiones del conducto venenoso. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar las diferencias bioquímicas y tisulares de la región proximal, media y distal del conducto venoso de *Conus perplexus*. Se colectaron 25 organismos en Bahía de Kino, Sonora, estos fueron disectados para extraer el aparato venenoso. Para determinar si existían diferencias entre las regiones del conducto venenoso se realizaron técnicas histológicas, cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés) y espectrometría de masas MALDI-TOF. Los análisis histológicos de las tres regiones del conducto venenoso indicaron que hay variaciones respecto a la abundancia de gránulos de veneno a lo largo de esta estructura. Los resultados indicaron diferencias bioquímicas en los componentes extraídos en las tres regiones; así mismo por espectrometría se detectaron péptidos presuntivos con masas distintas en cada región. Los resultados obtenidos mostraron una clara diferenciación entre las tres regiones estudiadas, lo que puede ser evidencia de la síntesis así como del proceso al se ven sometidas las conotoxinas antes de estar completamente maduras y listas para ser inyectadas.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente una cantidad considerable de medicamentos se ha desarrollado a partir de productos naturales (Newman et al., 2003) entre los compuestos bioactivos se encuentra el veneno que diversos organismos son capaces de producir e inyectar gracias al desarrollo de órganos especializados involucrados en estos dos procesos. Entre los organismos venenosos de hábitat terrestre que han sido estudiados, destacan las serpientes y escorpiones; mientras que en el ambiente marino se encuentran algunas especies de medusas y de caracoles que son capaces de producir sustancias tóxicas de origen peptídico, las cuales actúan sobre diferentes blancos fisiológicos (Utkin, 2015).

El género *Conus* pertenece a un grupo de gasterópodos marinos con hábitos depredadores, cuenta con aproximadamente 800 especies y está distribuido ampliamente en zonas intermareales de las regiones tropicales (Paredes et al., 2010; Puillandre et al., 2014). Estos organismos son de movimiento lento en comparación a la fauna presente en su ambiente natural, sin embargo, cuentan con estrategias de caza altamente sofisticadas, como la producción de péptidos tóxicos, utilizados como mecanismo de defensa y para la captura de presas (Kohn et al., 1960; Olivera et al., 1985). En organismos del género *Conus* el responsable de la síntesis, almacenamiento y liberación es un aparato venenoso altamente sofisticado; el veneno se compone de una mezcla de compleja compuestos comúnmente conocidos como conotoxinas o conopéptidos (Olivera, 2002).

El aparato venenoso consta de un ducto tubular, en donde el veneno es producido y después liberado por la probóscide con ayuda de movimientos de contracción muscular de un bulbo ubicado en la parte basal del conducto (Olivera, 2002). La probóscide contiene a su vez un diente radular que es utilizado como arpón para inyectar el veneno en la presa, una vez que el veneno es liberado, ésta queda inmovilizada y puede ser engullida (Kohn et al., 1960).

Cabe desatacar que el veneno producido por estos organismos está conformado por un coctel de toxinas de gran diversidad que se produce como respuesta adaptativa a las diferentes

interacciones bióticas a las que están sometidos estos organismos. Otro factor importante que influye en la composición del veneno es el tipo de presa, ya que su dieta general se divide en tres grandes dietas y que se componen de peces, gusanos y moluscos (Halai y Craik, 2009; Miljanich, 2004).

Por otro lado, los caracoles *Conus* han sido atractivos para formar parte de colecciones debido a los bellos y distinguidos patrones de sus conchas, sin embargo, fue hasta los primeros casos de envenenamiento humano reportados en 1848 que captaron la atención de los investigadores en neurociencias (Hermitte, 1946). A partir de los años sesenta comenzaron a realizarse diferentes estudios en los cuales se reconoció a las toxinas del género *Conus* como una fuente novedosa de compuestos bioactivos con aplicaciones farmacológicas; al mismo tiempo se empezó a determinar su uso potencial en el tratamiento de trastornos neurológicos (Olivera et al., 1985; Olivera et al., 1990).

Los péptidos presentes en las conotoxinas han resultado de gran interés en el ámbito bioquímico y farmacéutico, debido a que varias investigaciones han determinado que tienen una elevada selectividad hacia objetivos moleculares característicos como los canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y/o transportadores de neurotransmisores (Lewis et al., 2012); debido a la actividad de las conotoxinas se han producido fármacos y productos terapéuticos que han contribuido en incremento de esfuerzos para identificar y caracterizar nuevas conotoxinas (Norton y Olivera, 2006).

Las conotoxinas se clasifican en tres categorías dependiendo de la superfamilia de genes a la que pertenecen, así como a su marco de cisteínas o a la familia farmacológica, basada en el blanco receptor y el tipo de interacción (Puillandre et al., 2012; Robinson y Norton, 2014). Así mismo, la categorización en superfamilias hace posible una comparación superficial y rápida entre toxinas ya conocidas, lo que resulta de gran ayuda para hacer inferencias sobre su posible bioactividad (Robinson y Norton, 2014).

Investigaciones realizadas en organismos del género *Conus* con el objetivo de describir los tejidos por medio de técnicas histológicas han proporcionado información relacionada con las características estructurales que componen la anatomía de las diferentes regiones del aparato

venenoso, así como el papel que desempeñan dichos elementos en la producción y maduración de los componentes peptídicos. Diversos estudios proponen la diferenciación de tres regiones a lo largo del conducto venenoso, las cuales son responsables de la síntesis y del transporte de toxinas, así como su ensamblaje en gránulos proteínicos presentes en células epiteliales (Marshall et al., 2002).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la estructura anatómica de tres regiones del conducto venenoso, la presencia de material granular de origen peptídico y la composición bioquímica de las toxinas que constituyen del veneno de *Conus perplexus*.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Características Generales de los Caracoles *Conus*

Los gasterópodos conforman una de las clases más abundantes del Phylum mollusca (Castillo-Rodríguez, 2014), con aproximadamente 4,000 especies vivas, algunos de estos organismos utilizan el veneno como mecanismo principal para la captura de sus presas, las especies venenosas se encuentran dentro de la superfamilia Conoidea (Kohn, 1998; Puillandre et al., 2008), que se compone de tres familias: Terebridae, Turridae y Conidae, las cuales se diferencian por sus características morfológicas (Kohn, 1998).

Existen alrededor de 800 especies del género *Conus* registradas actualmente (Puillandre et al., 2014). Estos organismos cuentan con una amplia distribución en las zonas tropicales y subtropicales. Se pueden encontrar desde la zona intermareal hasta profundidades cercanas a 1,000 metros (Paredes et al., 2010). La gran variedad de conchas y los patrones que estas presentan han resultado atractivas para diferentes culturas, sin embargo, otro aspecto que generó un gran interés en el campo de la investigación fueron los diferentes efectos causantes de la muerte en los humanos (Cruz y White, 1995; Olivera et al., 1990).

A lo largo de 50 millones de años, estos organismos han evolucionado en tres grupos, los cuales se especializaron en el consumo de diferentes tipos de presas: piscívoros, vermívoros y molusquívoros. Esta especialización dio lugar a la diversificación de distintos linajes y a un sofisticado aparato venenoso, responsable de la producción de una mezcla de toxinas peptídicas denominadas conotoxinas, las cuales son utilizadas para atrapar a sus presas (Duda et al., 2001; J. Kohn et al., 1960; Olivera et al., 1985).

## **II.2. Función y Anatomía del Aparato Venenoso**

La estructura que facilita la alimentación de estos gasterópodos es el aparato venenoso, el cual es capaz de realizar la síntesis de toxinas (constituidas por componentes peptídicos) que son usadas para someter a sus presas o como mecanismo de defensa (Taylor et al., 1993; Kohn, 1990; Puillandre y Holford, 2010).

El proceso de caza comienza cuando la presa es detectada por medio de señales químicas (Spengler y Kohn, 1995), posteriormente la probóscide se extiende en dirección a la presa, se coloca un diente radular cerca de la punta de la probóscide y es accionado por un esfínter, cuando el diente se conecta con la presa se inserta y libera el veneno (Greene y Kohn, 1989).

La anatomía del aparato venenoso (Figura 1) es compleja y se encuentra relacionada con las regiones anteriores del tracto digestivo (Halstead, 1988). Está conformado por tres estructuras principales: bulbo, conducto venenoso y rádula; el bulbo, tiene como función impulsar la toxina a lo largo de un conducto venoso; sin embargo, algunos autores argumentan que en esta región también se realiza la biosíntesis de toxinas (Safavi-Hemami et al., 2010).

Diversos autores postulan que el conducto venenoso es responsable de la producción de toxinas; mientras que el saco radular está relacionado con la formación de dientes radulares, uno de los cuales se encuentra precargado de toxinas y se ubica en la probóscide que efectúa la inyección de toxina al momento de atacar a la presa (Marshall et al., 2002; Brusca y Brusca, 2006).

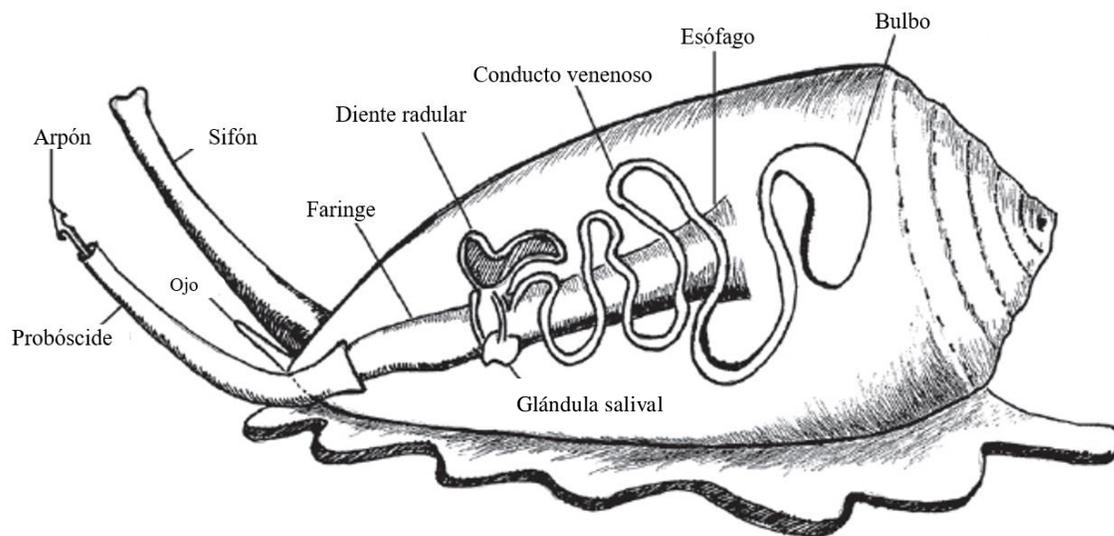


Figura 1. Representación anatómica del aparato venenoso del género *Conus*. Fuente: Halai y Craik (2009).

Cabe destacar que la rádula de los gasterópodos suele estar conformada por filas de dientes de un material quitinoso, sin embargo, en el caso de los caracoles *Conus* los dientes radulares no se encuentran unidos y presentan una forma de aguja hipodérmica que se utiliza para inyectar el veneno y paralizar a la presa (Spengler y Kohn, 1995).

### II.3. Descripción Histológica del Conducto Venenoso

Estudios histológicos realizados por autores como Marshall et al., (2002) han aportado información de gran importancia para entender mejor las correlaciones anatómicas del aparato venenoso de caracoles *Conus* y la producción del veneno, mediante los cuales se ha descrito la presencia de material granular en lumen del conducto, así como dentro del saco radular.

El epitelio del conducto venenoso de diferentes especies del genero *Conus* presenta características distintivas, por ejemplo en el caso de *Conus californicus*, Marshall et al., (2002) describen un epitelio complejo en la parte posterior, que se relaciona con el transporte activo en lugar de la secreción; en la porción distal se detalla un tipo de epitelio diferente que sugiere una función en la secreción holocrina y además se describen al menos dos tipos de gránulos intracelulares de gran tamaño, uno de los cuales llena el lumen del conducto.

Por otro lado estudios realizados por Safavi-Hemami et al., (2010) indican que una de la principales funciones del bulbo es realizar movimientos peristálticos para impulsar las toxinas a lo largo del conducto, aunque también presentan una producción de toxinas a un nivel muy bajo. Esta característica también ha sido descrita por Hermitte (1946) quien basado en estudios histológicos indicó que el bulbo presenta un epitelio columnar de tipo granular o escamoso simple con células que podrían estar especializadas para procesos de secreción.

De acuerdo a Halstead (1988) la producción y aplicación del veneno de los caracoles *Conus* consta de tres pasos generales: el primero involucra la síntesis, procesamiento y empaquetamiento de los péptidos que conforman las toxinas; el segundo consiste en la generación y almacenamiento de los dientes radulares, así como la transferencia de uno de estos a la punta de la probóscide y el tercero es el paso de la inserción del veneno mediante la expulsión por el diente radular.

## **II.4. Veneno del Género *Conus***

### **I.4.1. Conotoxinas y Síntesis**

Diversos casos de envenenamiento humano provocado por caracoles *Conus* piscívoros motivaron el estudio de estos organismos, así como de su veneno (Flecker, 1936) y fue durante

la década de los ochenta que llevó al descubrimiento de la omegaconotoxina MVIIA aislada de *Conus magus*, esta toxina bloquea selectivamente los canales de calcio tipo N (Olivera et al., 1985) y fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en 2004 como tratamiento para el dolor crónico severo (Miljanich, 2004).

Décadas de investigación bioquímica y farmacológica de los caracoles *Conus* han dado lugar al descubrimiento de una gran variedad de péptidos biológicamente activos, los cuales tienen un efecto sobre las neurotransmisiones y que actúan sobre estructuras nerviosas tales como los receptores y transportadores de canales iónicos activados por voltaje y ligando (Norton y Olivera, 2006; Olivera y Teichert, 2007; Terlau y Olivera, 2004).

Cada especie del género *Conus* contiene entre 50-200 pequeños péptidos de veneno altamente estructurados, los cuales pueden estar conformados generalmente por un total de 12 a 30 aminoácidos (Terlau y Olivera, 2004). Diferentes investigaciones enfocadas en estos péptidos ricos en puentes disulfuro, denominados conotoxinas o conopéptidos han mostrado un alto potencial farmacéutico (Lopez-Vera., 2007; Olivera, 2006). Una de las primeras conotoxinas aprobadas para uso farmacéutico fué el Ziconotida, comercialmente conocida como Prialt. Esta sustancia, fue descubierta y producida a partir de un péptido sintetizado por *Conus magus* perteneciente a la clase  $\omega$ -MVIIA, esta conotoxina así como otras pertenecientes a la superfamilia O actúa sobre los canales de  $Ca^{2+}$  y tiene una gran especificidad para el canal de calcio tipo N Cav2.2 (Olivera, 2006), por lo que es empelada en el tratamiento de dolor crónico en pacientes con cáncer y VIH (Miljanich, 2004).

Las conotoxinas son transcritas a partir de RNAm, los cuales son traducidos en precursores de proteínas y a su vez, divididos y sometidos a varias etapas de maduración hasta obtener un conopéptido final (Kaas et al., 2010) como se ilustra en la figura 2. Por otro lado, los conopéptidos son traducidos como prepropéptidos, que constan de tres dominios generales, posteriormente separados proteolíticamente en sitios específicos para producir la toxina madura, a) la región N-terminal de las secuencias precursoras contiene una secuencia señal altamente conservada que cuenta aproximadamente con 20 aminoácidos, y se considera responsable de dirigir al péptido precursor a la vía secretora celular; b) la región intermedia (“propéptido”,

conformado por entre 20 y 40 aminoácidos) que participa en la maduración de la conotoxina y es removida posteriormente antes de la secreción del péptido maduro; y c) la región C-terminal (que contiene una secuencia de entre 10 a 40 aminoácidos) característicamente hipervariable que es representativa de una toxina madura (Baldomero y Olivera, 1997; Halai y Craik, 2009; Olivera, 2000; Woodward et al., 1990).

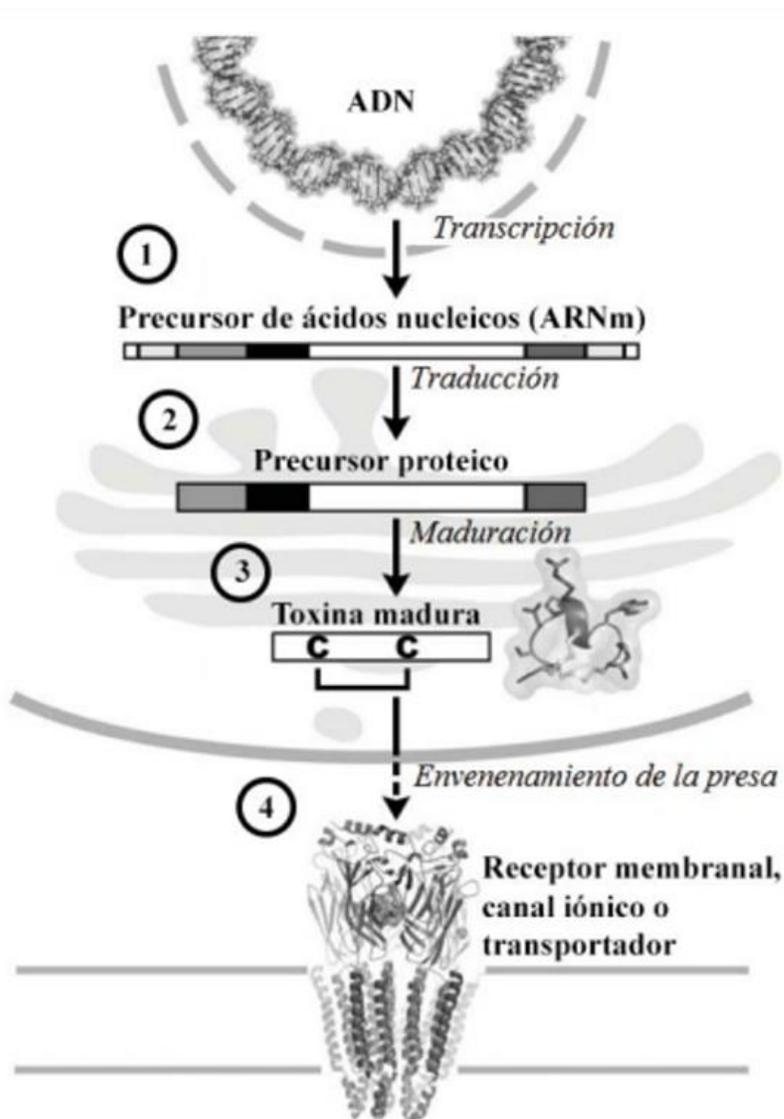


Figura 2. Proceso de maduración de las conotoxinas. Fuente: Kaas et al. (2010).

## **II.4.2. Modificaciones Post-traduccionales**

Una de las principales atribuciones del éxito de los caracoles *Conus* como depredadores se debe a su habilidad para generar péptidos nuevos de manera muy rápida, dicha variedad puede deberse a sus adaptaciones a las diferentes interacciones bióticas a las que son expuestos (Kohn et al., 1960; Olivera, 2002). La variación de los péptidos se realiza mediante modificaciones post-traduccionales que ocurren en una frecuencia particularmente alta que consisten en cambios químicos o estructurales realizados a los aminoácidos que no están codificados directamente en genes correspondientes a un péptido (Craig et al., 1999), a su vez se cree que múltiples conotoxinas son inyectadas simultáneamente para lograr el efecto fisiológico buscado, lo cual podría explicar el amplio repertorio de toxinas presentes en estos organismos, las cuales ascienden aproximadamente a 2,500 conopéptidos descritos hasta la fecha (Terlau y Olivera, 2004).

Según Terlau y Olivera (2004) los cambios de un solo aminoácido así sea en las regiones hipervariables pueden producir una estructura con los mismos dobleces (debido a que el marco de cisteínas se conserva) pero puede presentar una selectividad a diferentes subtipos receptores. El mecanismo de acción por el cual este tipo de modificaciones ocurre, puede deberse a que la región propéptido ha desarrollado sitios específicos para que enzimas de modificaciones postraduccionales se unan y modifiquen aminoácidos estándares mediante la adición de diferentes grupos funcionales. Se tiene identificada una amplia gama de enzimas responsables de estas modificaciones, entre ellas se encuentra una disulfuro isomerasa, encargada de la formación de puentes disulfuro, una monooxigenasa, responsable de la amidación del extremo C-terminales, una hidroxilasa de prolina y una  $\gamma$ -glutamato carboxilasa, entre otras (Buczek et al., 2005; Bulaj, 2005).

## **II.4.3. Clasificación de Superfamilias**

Las toxinas pueden clasificarse en dos grupos principales, las ricas en puentes disulfuro y las pobres en puentes disulfuro (que por ende cuentan con uno o ningún enlace disulfuro); con

base a esto se dividen en seis grupos con propiedades características, las ricas en disulfuro son las conocidas comúnmente como conotoxinas, las cuales están conformados por péptidos en un rango de entre 12 y 33 aminoácidos (Halai y Craik, 2009).

Por otro lado, la disposición de las cisteínas en la secuencia primaria de aminoácidos se encuentra restringida a solo algunos patrones característicos, en general cada uno de estos patrones es correspondiente a una conectividad de puentes disulfuro específica; este patrón se usa como diagnóstico para la organización en superfamilias de genes que codifican a un péptido y que en muchos casos puede ser representativo del blanco farmacológico, motivo por el cual la secuencia conservada del péptido precursor y el arreglo de las cisteínas en el péptido maduro son factores de suma importancia para categorización de las conotoxinas (Kaas et al., 2007; Olivera y Teichert, 2007; Terlau y Olivera, 2004; Woodward et al., 1990).

La nomenclatura utilizada actualmente para la clasificación de toxinas fue propuesta por Cruz et al, (1958), ésta categoriza las toxinas en superfamilias basadas en su secuencia y homología de su marco, así como la actividad farmacológica, a partir de los blancos con los que interactúan y de esa manera sentar las bases de la clasificación que integra un total del 27 superfamilias génicas distintas ( Kaas et al., 2010).

#### **II.4.4. Blancos Moleculares y Fisiología**

El término “toxina cabal” ha sido empleado para describir el proceso mediante el cual actúan un conjunto de conopéptidos en coordinación para obtener el mismo efecto final. En especies como *Conus purpurascens* se han encontrado dos toxinas que presentan un efecto separado tanto en tiempo como espacio (Terlau y Olivera, 2004; Terlau et al., 1996).

El primer se denomina “lightning-strike cabal” y genera una inmovilización inmediata sobre la presa, a través de la inyección de componentes peptídicos que inhiben la inactivación del canal de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje y que bloquean canales de K<sup>+</sup> dependiente de voltaje, mecanismo que en conjunto resulta en la despolarización masiva de axones próximos al lugar

de la inyección del veneno, a partir de esto se genera un efecto parecido a la electrocución en las presas inmediatamente después de la inyección (Terlau y Olivera, 2004; Terlau et al., 1996).

El segundo efecto fisiológico ocurre de una manera más lenta, y genera la inhibición total de la transmisión neuromuscular, este fenómeno se lleva a cabo por conopeptidos denominados “motor cabal”, los cuales actúan en sitios lejanos al sitio de inyección; el “motor cabal” contiene péptidos que inhiben los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje localizados en las terminales presinápticas que controlan la liberación de neurotransmisores, receptores nicotínicos postsinápticos y canales de  $\text{Na}^{+}$  implicados en el potencial de acción muscular (Terlau y Olivera, 2004).

#### **II.4.5. Actividad Sobre Canales Iónicos Regulados por Voltaje**

Análisis bioquímicos han demostrado que las toxinas de los caracoles *Conus* constan de pequeños péptidos activos comprimidos que actúan sobre un amplio rango de blancos moleculares (Tabla 1), dichos blancos incluyen canales iónicos dependientes de voltaje y dependientes de ligando, así como, receptores acoplados a proteínas G (Cruz et al., 1985; Olivera et al., 1985). Un ejemplo característico de estos blancos es el efecto analgésico que produce la  $\omega$ -conotoxina MVIIA al apuntar a canales de calcio dependientes de voltaje que causan una interferencia en la transmisión de señales responsables del dolor (Miljanich, 2004).

Tabla I.- Familias farmacológicas de conotoxinas. Fuente: Kaas et al. (2010).

| <b>Familia farmacológica</b> | <b>Receptor de membrana</b>                                     | <b>No. Conotoxinas maduras</b> | <b>Superfamilia génica</b> | <b>Marco de cisteínas</b>    | <b>Grupo dietario</b> | <b>Referencia</b>         |
|------------------------------|---|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| $\alpha$ (Alfa)              | Receptores nAChR  | 55                             | A, D, L, M, S              | I,II, III, IV, VIII, XIV, XX | P, V, M               | (Gray et al., 1981)       |
| $\chi$ (Chi)                 | Transportador de noradrenalina neuronal                         | 4                              | T                          | X                            | M                     | (Sharpe et al., 2001)     |
| $\delta$ (Delta)             | Canales de Na <sup>+</sup> dependientes de voltaje              | 18                             | O1                         | VI/VII                       | P, M                  | (Fainzilber et al., 1991) |
| $\epsilon$ (Epsilon)         | Canales presinápticos de Ca <sup>2+</sup> o proteína G acoplado | 1                              | T                          | V                            | M                     | (Rigby et al., 1999)      |
| $\gamma$ (Gamma)             | Corrientes catiónicas   | 4                              | O1, O2                     | VI/VII                       | V, M                  | (Fainzilber et al., 1991) |
| $\iota$ (Iota)               | Canales de Na <sup>+</sup> dependientes de voltaje              | 2                              | I1, M                      | III, XI                      | P, V                  | (Buczek et al., 2007)     |
| $\kappa$ (Kappa)             | Canales de K <sup>+</sup> activados por voltaje                 | 8                              | A, I2, J, M, O1            | III, IV, VI/VII, XI, XIV     | P, V                  | (Terlau et al., 1996)     |
| $\mu$ (Mu)                   | Canales de Na <sup>+</sup> dependientes de voltaje              | 23                             | M, O1, T                   | III, IV, V, VI/VII           | P, V, M               | (Cruz et al., 1985)       |
| $\omega$ (Omega)             | Canales de Ca <sup>+</sup> regulados por voltaje                | 31                             | O1                         | VI/VII                       | P, V, M               | (Kerr y Yoshikami, 1984)  |
| $\rho$ (Rho)                 | Adenoceptores alfa 1 (GPCR)                                     | 1                              | A                          | I                            | P                     | (Sharpe et al., 2001)     |

Los canales iónicos activados por voltaje tienen funciones fisiológicas de suma importancia, entre ellas la generación, configuración y transducción de señales eléctricas de las células, éstos se encuentran compuestos por una subunidad principal que forma los poros y que a su vez contiene cuatro dominios homólogos (canales  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^+$  activados por voltaje) o cuatro subunidades distintas, en el caso de los canales de  $\text{K}^+$  activados por voltaje las subunidades interactúan con subunidades auxiliares que no forman parte de la configuración del poro (que a su vez pueden alterar las propiedades de la subunidad) para generar cambios conformacionales tras ser activados (lo cual resulta en la permeación selectiva de cationes a través del poro del canal), además en el estado abierto de los canales iónicos pueden inactivarse mediante cambios conformacionales adicionales, para ingresar a un estado no conductor o a una desactivación y así regresar a un estado cerrado (Terlau y Olivera, 2004).

Existen tres familias diferentes de conotoxinas que son conocidas por su efecto sobre los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje: las  $\mu$ -conotoxinas que bloquean los canales, las  $\mu\text{O}$ -conotoxinas que inhiben la conductancia del canal de  $\text{Na}^+$  y las  $\delta$ -conotoxinas que retrasan o inhiben una inactivación rápida; la omega-conotoxina GVIA es una de las conotoxinas que bloquean canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, y es de las más utilizadas en el campo de la neurociencia como una herramienta farmacológica para inhibir la transmisión sináptica (Terlau y Olivera, 2004).

## **II.5. Métodos Para la Caracterización de Conopéptidos**

### **II.5.1. Cromatografía Líquida de Alto Desempeño de Fase Reversa**

La cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés) es un método comúnmente utilizado para el análisis y purificación de péptidos y

proteínas, mediante esta técnica se puede observar en gran resolución de sustancias estrechamente relacionadas y estructuralmente dispares en una gran variedad de condiciones cromatográficas (Regnier y Gooding, 1990). El sistema RP-HPLC consiste en un absorbente *n*-alquilsilícico mediante el cual se eluyen péptidos y proteínas en un gradiente de concentración creciente de un disolvente orgánico que puede ser acetonitrilo, el cual contiene un modificador iónico, por ejemplo, ácido trifluoroacético (Aguilar y Hearn, 1996).

El mecanismo por el cual los diferentes solutos peptídicos y proteicos son retenidos depende de la interacción hidrófoba del péptido a través de una fase móvil polar y la adsorción que esta presenta sobre un sobrenadante no polar; en estas condiciones los componentes se retienen en diferentes grados, dependiendo su hidrofobicidad intrínseca, la eluotropicidad de la fase móvil y la naturaleza de los ligandos solventes (Wilce et al., 1993).

La retención cromatográfica en términos de afinidad y cinética de la interacción, se encuentra determinada por la composición molecular de las regiones de contacto específicas, se ha comprobado que la región de contacto para péptidos pequeños implica la contribución de toda o una gran proporción de la superficie molecular del soluto, lo que resulta en tiempos de retención cortos que se pueden predecir con los coeficientes de retención para todos los residuos de aminoácidos constituyentes. Los componentes separados pueden someterse directamente a análisis posteriores tales como la secuenciación automática de Edman o la espectrometría de masas con electrospray, pero para lograr la purificación de péptidos derivados sintéticamente, el producto crudo es separado típicamente a una escala analítica donde se evalúa la complejidad de la mezcla (Aguilar y Hearn, 1996; Guo et al., 1986; Wilce et al., 1993).

### **II.5.2. Espectrometría de masas**

Un espectrómetro de masas es un instrumento que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de iones en condiciones de vacío y a partir de los datos obtenidos en este equipo se pueden determinar las masas moleculares con alto grado de precisión, lo que permite determinar la composición molecular de analitos dados.

Los espectrómetros de masas cuentan con tres componentes principales: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector de iones; la fuente de ionización tiene la función de convertir el analito en iones de fase gaseosa en vacío, los iones posteriormente son acelerados en un campo eléctrico hacia el analizador, que se encarga de separar de acuerdo a las relaciones  $m/z$  en camino al detector, por último el detector registra el impacto de los iones de manera individual. El mapeo de péptidos, conocido también como la huella dactilar de péptidos (PMF) hace alusión a la identificación de proteínas mediante la utilización de datos de masas peptídicas intactas. Este método se basa en que cada proteína puede ser identificada de forma única por las masas que presentan los péptidos que la constituyen, consecuentemente diferentes algoritmos han sido desarrollados para permitir la búsqueda en bases de datos acerca de los datos obtenidos sobre la masa de péptidos (Twyman, 2004).

## **II.6. Características Biológicas y Clasificación Taxonómica de *Conus perplexus***

La especie *Conus perplexus* presenta una morfología cónica invertida con longitud máxima de 28.5 mm y diámetro 16.6 mm (Figura 3), las espiras son cortas con suturas ligeramente cóncavas, cuenta con una vuelta que termina en un hombro subcarinado, una abertura con profundo seno posterior y un amplio canal exterior que se encuentra excavado dorsalmente a la izquierda y un labio externo liso delgado, por el cual se translucen las manchas de la concha, la vuelta corporal es lisa pero presenta costillas espirales anchas en el tercio anterior, las cuales son separadas por surcos que alcanzan el labio interno. La concha presenta un color blanquecino con ligeras tonalidades violeta y numerosas hileras en forma de espiral de manchas cuadradas y rectangulares con colores oscuros pardos, así como manchas grandes e irregulares del mismo color en la parte baja de los hombros y vueltas de la espira, con un color violeta oscuro o claro en la parte interior de la abertura y periostraco liso color café claro. Esta especie se distribuye desde Bahía Magdalena en Baja California, a lo largo del Golfo de California, hasta El Rubio Tumbes en Perú y habita en regiones infralitorales con fondo de arena

gruesa, de los 36 a los 73 metros de profundidad (Keen, 1971; Paredes et al., 1999; Skoglund, 2002; Cruz, 1992; Shasky, 1997; Alamo y Valdivieso., 1987; Rivadeneira y Arias, 1999; Finet, 1985).

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de la especie:

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Gasterópoda

Subclase: Caenogastropoda

Orden: Neogastropoda

Superfamilia: Conoidea

Familia: Conidae

Género: *Conus*

Especie: *C. perplexus*



Figura 3. Concha y cuerpo blando de *Conus perplexus* colectado en Bahía de Kino, Sonora.

### III. JUSTIFICACIÓN

La estructura del aparato venenoso del genero *Conus* es conocida de manera general y múltiples autores afirman que la síntesis de las toxinas ocurre en el conducto, estudios histológicos reportan diferencias en cuanto al material granular de origen peptídico y tejido epitelial en diferentes regiones del conducto venenoso. Por lo que dividir el conducto venenoso de *Conus perplexus* en regiones y estudiarlo a detalle desde el punto de vista histológico, así como de sus características bioquímicas aportará información acerca de sus componenetes, de la posible síntesis y maduración de toxinas a lo largo de esta estructura.

#### IV. HIPÓTESIS

Diversos autores postulan la presencia de gránulos péptidos encontrados en diferentes de regiones del aparato venenoso, por lo tanto al analizar los componentes histológicos de *Conus perplexus*, se determinará una presencia y abundancia de gránulos proteínicos diferentes a lo largo del conducto venenoso, así como una variación en los componentes peptídicos de las conotoxinas.

## **V. OBJETIVO**

### **V.1. Objetivo General**

Analizar los componentes histológicos de los tejidos de la región proximal, media y distal del conducto venenoso de *Conus perplexus* para determinar la ubicación de gránulos peptídicos y comparar las conotoxinas presentes en el veneno.

### **V.2. Objetivos Específicos**

- Analizar los componentes histológicos de la región proximal, media y distal del conducto venenoso de *Conus perplexus*.
- Determinar el perfil cromatográfico de las conotoxinas presentes en el veneno de las diferentes regiones del conducto venenoso.
- Determinar si existen diferencias en el área bajo la curva y tiempo de retención de los perfiles cromatográficos de la región proximal, media y distal.
- Comparar las diferencias en relación masa/carga de péptidos presuntivos encontrados en las regiones proximal, media y distal del conducto venenoso.

## VI. METODOLOGÍA

### VI.1. Características de la Zona de Colecta

Bahía de Kino está situada en la costa del Mar de Cortés, en el centro del litoral sonorense. Cuenta con un tipo de playa arenosa y plana de arena blanca, dentro de la bahía la elevación de la marea es del orden de los 2 metros. La temperatura promedio en enero en Bahía de Kino es de 16 °C y en julio de 32 °C (SEMARNAT, 2006). Con base en la clasificación de Köppen modificada por García (SEMARNAT, 2006) se clasifica como muy árido. El área de estudio comprende la región marina costera de Bahía de Kino se encuentra en un rango latitudinal de 28.7896° y una longitud de -111.9148° (Figura 4).

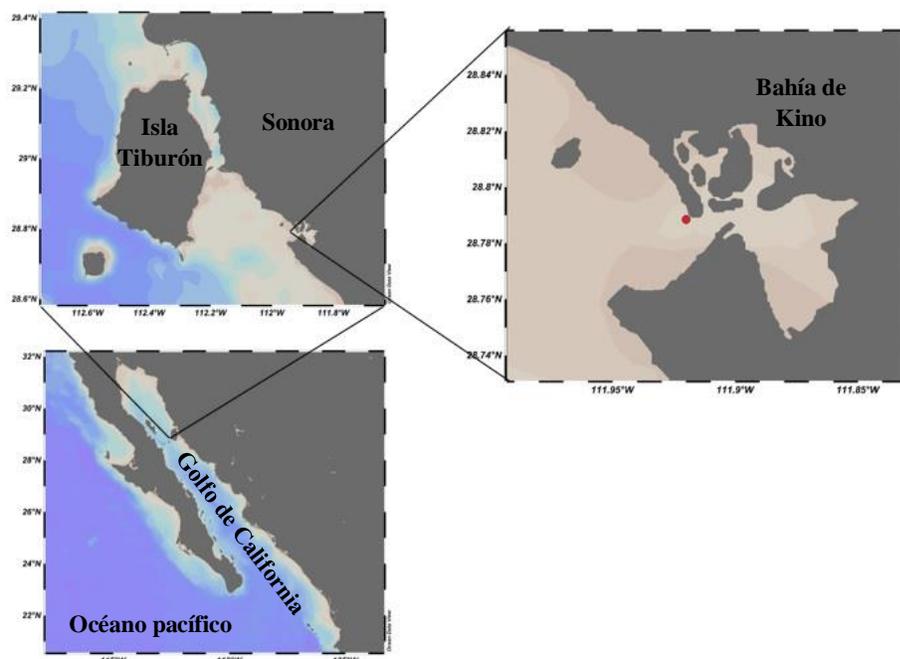


Figura 4. Mapa del área de muestreo en Bahía de Kino, Sonora (el punto rojo indica la zona de colecta).

## **VI.2. Colecta de Organismos**

Se colectaron 25 organismos de la especie *Conus perplexus* en el área intermareal superior de la zona sur de Bahía de Kino, Sonora, México (Figura 4). La colecta se realizó durante la mareas vivas bajas el día 29 de marzo del 2019; los organismos que quedaron descubiertos por la marea se colectaron de manera manual, de los organismos colectados, cinco se mantuvieron vivos para los análisis histológicos, el resto de las muestras de *C. perplexus* fueron colocados en bolsas (previamente etiquetadas para facilitar su identificación) y transportadas por tierra en hieleras al Laboratorio de Ecología Marina del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

## **VI.3. Disección del Aparato Venenoso**

El cuerpo blando de los organismos se extrajero con ayuda de una aguja de disección, una vez extraído se colocó en cajas petrí y se disectó. Se extrajo el aparato venenoso y el conducto venenoso el cual fue seccionado en tres partes iguales correspondientes a la región proximal, media y distal, a partir de la ubicación del bulbo (Figura 5). Los cortes obtenidos de las diferentes regiones fueron separados y colocados en tubos eppendorf para análisis posteriores.

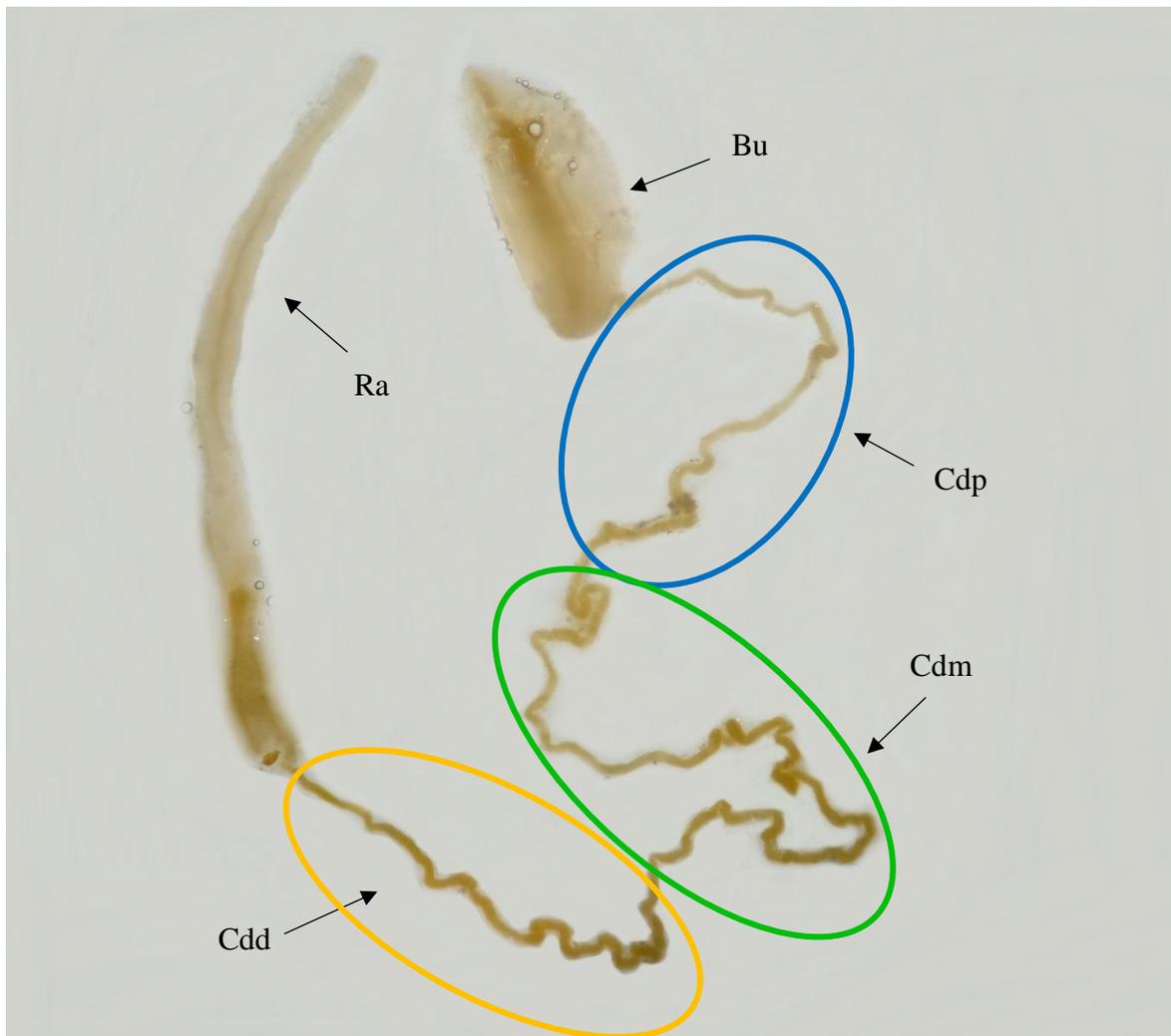


Figura 5.- Aparato venoso extraído de *Conus perplexus* (Bu= Bulbo; Cdp= Conducto proximal, azul; Cdm= Conducto medio, verde; Cdd= conducto distal, naranja; Rd= Rádula).

### **VI.3.1. Análisis Histológico del Conducto**

Se analizaron un total de 5 organismos, estos fueron sacrificados y disectados para extraer el aparato venenoso, las muestras fueron fijados en solución Davidson (alcohol 95%, formaldehído, ácido acético y agua) para evitar la descomposición de los tejidos. El conducto venenoso se seccionó en tres partes: región proximal, región media y región distal, las cuales fueron sometidas a un proceso de deshidratación con alcohol etílico en distintas concentraciones sucesivas (70, 80, 90 y 100%) para proceder a la aclaración con xileno (Marshall et al., 2002). Posteriormente se realizó la inclusión en parafina y se realizaron los cortes de las muestras con un grosor de 5  $\mu\text{m}$  para lo cual se utilizó un micrótopo de rotación y fueron teñidos con azul de toluidina (Gorrostieta-Hurtado et al., 2013). Las preparaciones se montaron en resina sintética con el fin de ser observadas al microscopio óptico marca Carl Zeiss acoplado a una cámara digital de 3.2 megapixels AxioCam ICc1, Axioscope, las micrografías se obtuvieron utilizando el Software AxioVision Release 4.8.2 SP2 (06-2012) y fueron comparadas con la descripción histológica disponible en la literatura para el género *Conus*.

### **VI.4. Extracción y Cuantificación del Veneno**

La extracción se realizó mediante la trituración de cada región del conducto venenoso por separado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido y hielo seco, se utilizó agua desionizada como solvente para resuspender la muestra, el extracto obtenido se colocó en tubos

ependorf y fueron centrifugados a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se colectó y se transfirió a tubos eppendorf (previamente pesados y secados) en un concentrador al vacío (SpeedVac Savant ISS110). Por diferencia de pesos se determinó el peso del veneno, posteriormente se agregó 1ml de agua desionizada por cada miligramo de muestra.

La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó con ayuda de un espectrofotómetro de microvolúmenes (BioSpec nano) a una longitud de onda de 280 nm. Adicionalmente, se realizó un barrido espectral dentro del rango del ultravioleta ( 220-320 nm) para verificar los maximos de absorción característicos de las proteínas (220 y 280 nm). Finalmente, la concentración de proteína de las 3 regiones se ajusto a un valor 1 mg/mL para pruebas posteriores.

## **VI.5. Caracterización Bioquímica**

### **VI.5.1. Fraccionamiento por RP-HPLC**

Las conotoxinas presentes en las muestras de cada región fueron separadas mediante RP-HPLC con una columna C18, se inyectaron 40µl de cada región por corrida a un flujo de 1 ml/min, las soluciones empleadas fueron 100% agua al 0.1% de TFA (solución A) por los primeros 10 minutos y acetonitrilo al 0.1% de TFA (solución B) en un gradiente lineal de 0 a 60% en 60 minutos (Figura 6). La detección de péptidos se realizó a las longitudes de onda de 220 a 280 nm.

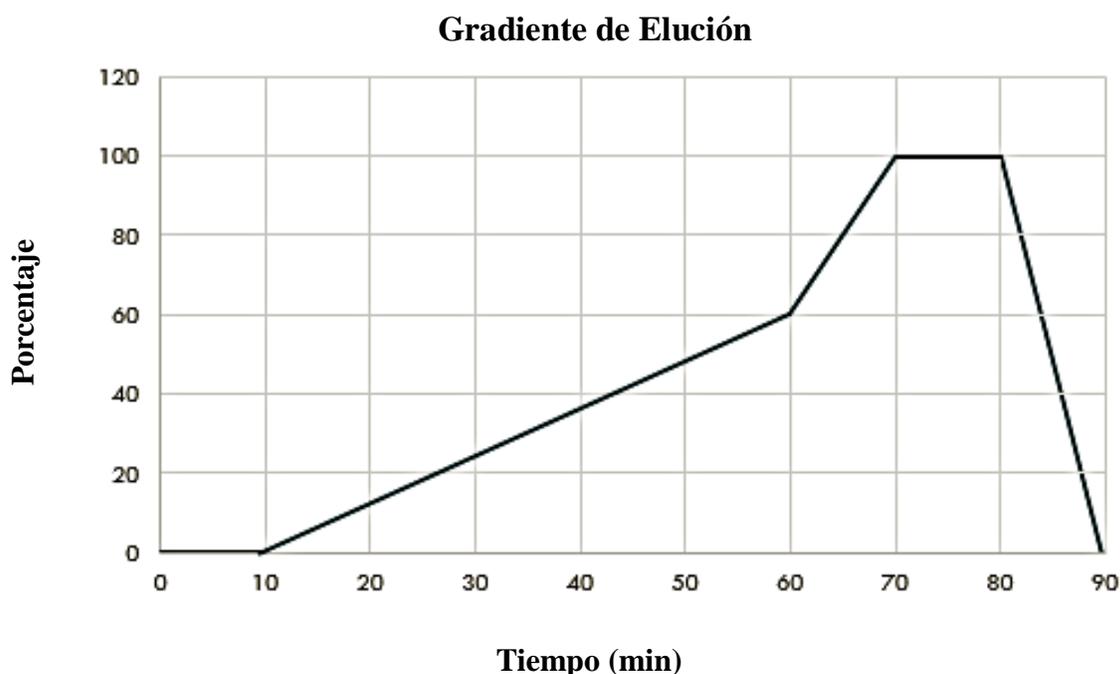


Figura 6. Gradiente de elución empleado en el fraccionamiento por RP-HPLC.

### VII.5.2. Espectrometría de Masas por MALDI-TOF

Se analizó 1  $\mu\text{g}$  de cada muestra para la obtención de la relación masa carga de los péptidos presentes en las diferentes regiones. Se realizó un análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight), con una matriz de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y ácido sinapínico (SA), en una relación matriz muestra de 5/1. Para la ionización de la muestra se utilizaron pulsos láser con fuente de nitrógeno y una longitud de onda de 337 nm. Los espectros obtenidos fueron posteriormente procesados y comparados en el software mMass.

## VII.6. Análisis Estadísticos

Se realizó un análisis exploratorio de datos con la mediana como medida de tendencia central y la distancia intercuartil como medida de dispersión.

Se realizaron las pruebas para determinar si se cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas para así determinar la prueba estadística utilizar (paramétrica o no paramétrica).

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar la existencias de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el área bajo la curva total de las fracciones presentes en cada región del conducto.

Todos los análisis se llevaron a cabo mediante la utilización de los paquetes estadísticos: Statistica 10.0 32-bit y NCSS 2007.

Para determinar si el área bajo la curva y el tiempo de retención de las fracciones individuales fueron significativamente distintas se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico (n-MDS), que se validó con una prueba de ANOSIM y un dendograma (análisis de cluster). El análisis se llevó a cabo en el programa Primer6+Permanova.

## **VII. RESULTADOS**

### **VII.1. Análisis Histológico del Conducto**

Se consideró como región proximal del conducto a la sección que parte del bulbo (Figura 7, A y B) en el cual se apreciaron cuatro componentes distintos, una capa exterior constituida de colágeno (Co), seguida de una lámina basal (Lb) que separa al colágeno de una capa de células epiteliales (Ep) y un lumen (Lu) al interior del ducto con una pequeña cantidad de gránulos peptídicos (Gr) teñidos de un color violeta intenso junto a un material de residuo celular (Rc).

En la región media (Figura 7, C y D) nuevamente se evidenció la capa colágeno (Co) que recubre el exterior del conducto venenoso, se detectó también la presencia de la lámina basal (Lb) entre el colágeno y las células epiteliales (Ep), en la figura 7 C se muestran diferencias respecto al epitelio al presentar una estructura cubica determinada, así como una gran cantidad de gránulos peptídicos (Gr) y residuos celulares (Rc) que cubren la mayor parte del lumen (Lu).

La región distal es la sección más apartada del bulbo (Figura 7, E y F), en esta región se aprecian limitaciones celulares más oscuras, lo anterior puede deberse a que las células se van destruyendo al realizar un proceso de secreción de holocrina, donde los gránulos teñidos de color violeta intenso en su interior pasan a formar parte del lumen del conducto, así mismo es la región con la mayor cantidad de gránulos (Gr) en el lumen (Lu).

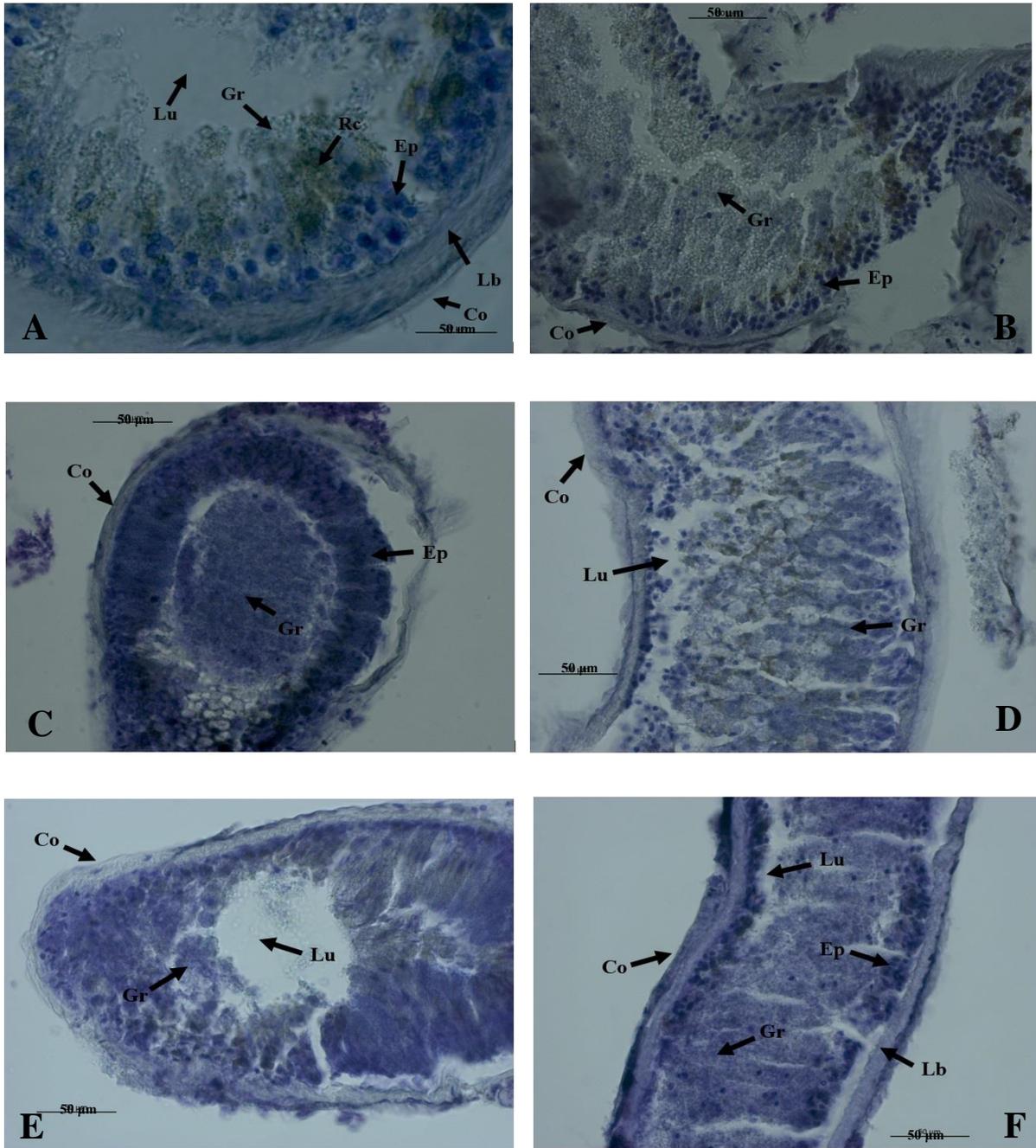


Figura 7. Micrograffías de los cortes histológicos del aparato venoso de *Conus perplexus*. Región proximal en vista transversal (A), en vista longitudinal (B); Región media en vista transversal (C), en vista longitudinal (D); Región distal en vista transversal (E), en vista longitudinal (F).

## VII.2. Caracterización bioquímica

### VII.2.1. Fraccionamiento por RP-HPLC

En la figura 8 se muestra el cromatograma correspondiente a la región proximal, en el cual se seleccionaron 13 fracciones representativas detectadas a una  $\lambda=220$  nm. Así mismo las fracciones con mayor absorbancia y con mejor resolución se encuentran en la región más hidrofílica, antes de los primeros 10 minutos.

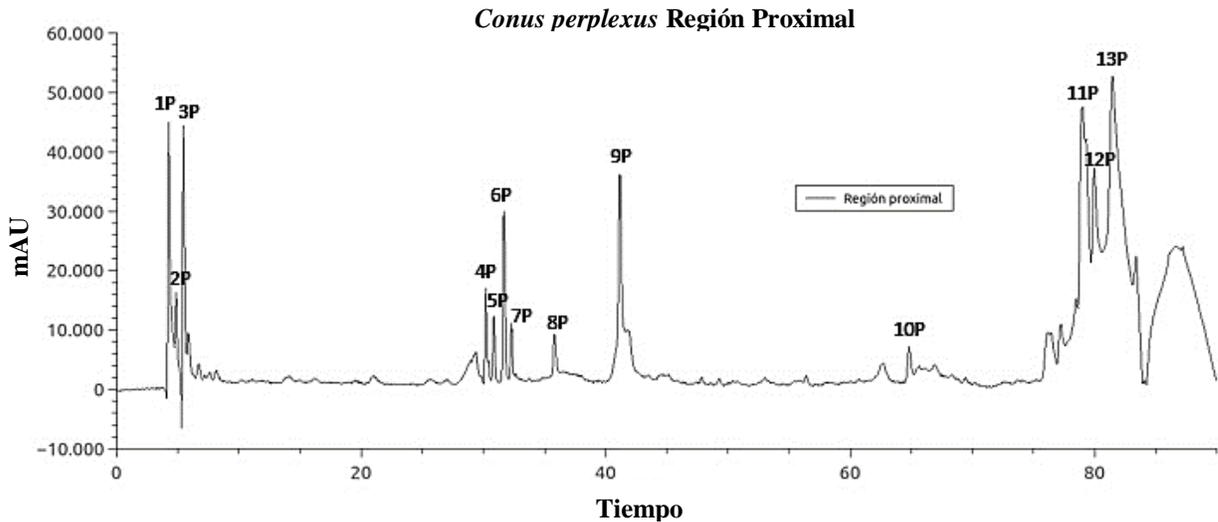


Figura 8. Cromatograma de la región proximal de *Conus perplexus* obtenido por RP-HPLC con una columna C18 a una longitud de onda de 220 nm.

De la región media del conducto se seleccionaron nuevamente 13 fracciones representativas, los cuales presentaron una absorbancia mayor a la de la región proximal, donde la fracción con mayor absorbancia también se encuentra en la región más hidrofílica, sin embargo en esta región llega a 130.000 mAU (Figura 9).

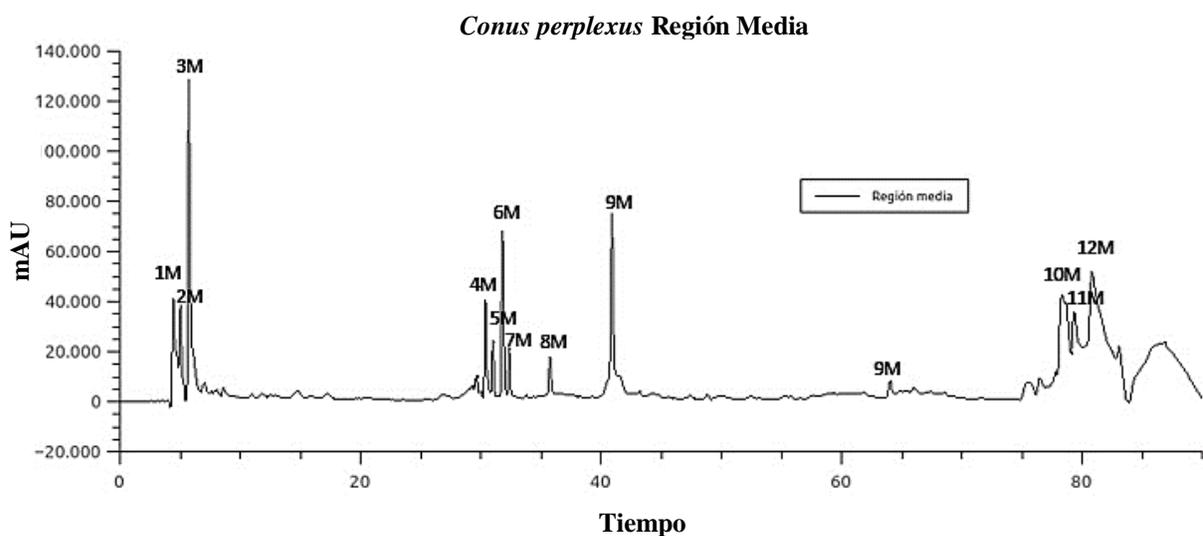


Figura 9. Cromatograma de la región media de *Conus perplexus* obtenido RP-HPLC con una columna C18 a una longitud de onda de 220 nm.

El perfil de la región distal del conducto se muestra un desfase respecto a los tiempos de retención de las otras dos regiones, consideraron un total de 13 fracciones representativas, además se logró apreciar una fracción no detectado en la región proximal o media, lo que muestra una clara diferencia en cuanto a las características del material peptídico en esta región (Figura 10).

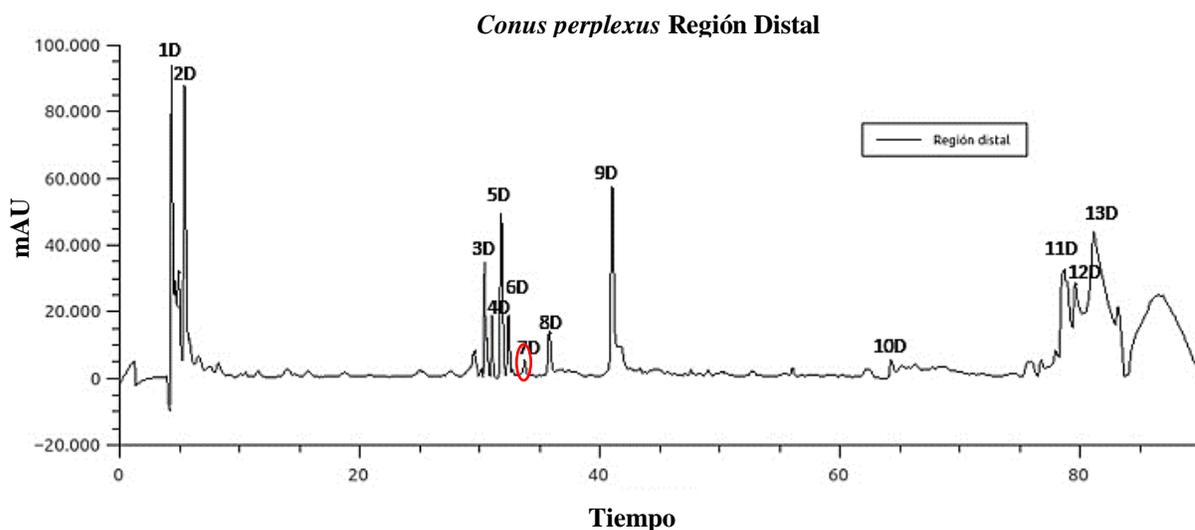


Figura 10. Cromatograma de la región distal de *Conus perplexus* obtenido RP-HPLC con una columna C18 a una longitud de onda de 220 nm (el círculo rojo señala el pico del cromatograma que no se observa en las regiones media y proximal).

En la figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de las regiones proximal, media y distal. Se observaron ligeras diferencias en las áreas de las fracciones, en la absorbancia, así como en los tiempos en los que fueron registrados.

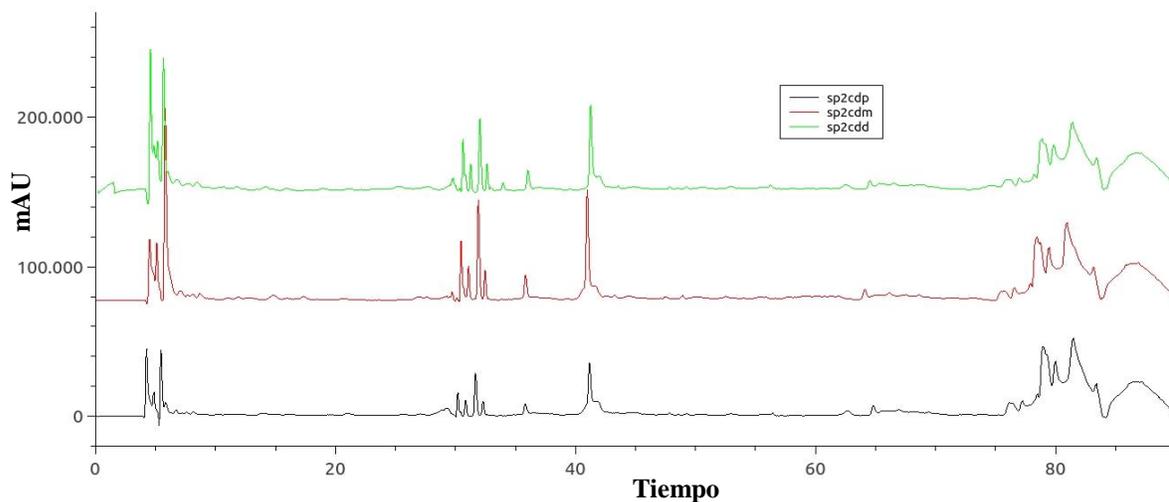


Figura 11. Comparación de los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC. Región proximal=negro; región media=rojo; región distal =verde.

## VII.2.2 Cuantificación y Comparación de Conotoxinas

Al comparar la suma de las áreas obtenidas en los cromatogramas de las regiones proximal, media y distal, se determinó que no hubo diferencias significativas en la cantidad total de toxinas presentes (ANOVA:  $p= 0.067047$ ), sin embargo, en los diagramas de caja y bigote (Figura 12) se logra apreciar que el área de la región media es ligeramente superior al área de las regiones proximal y distal.

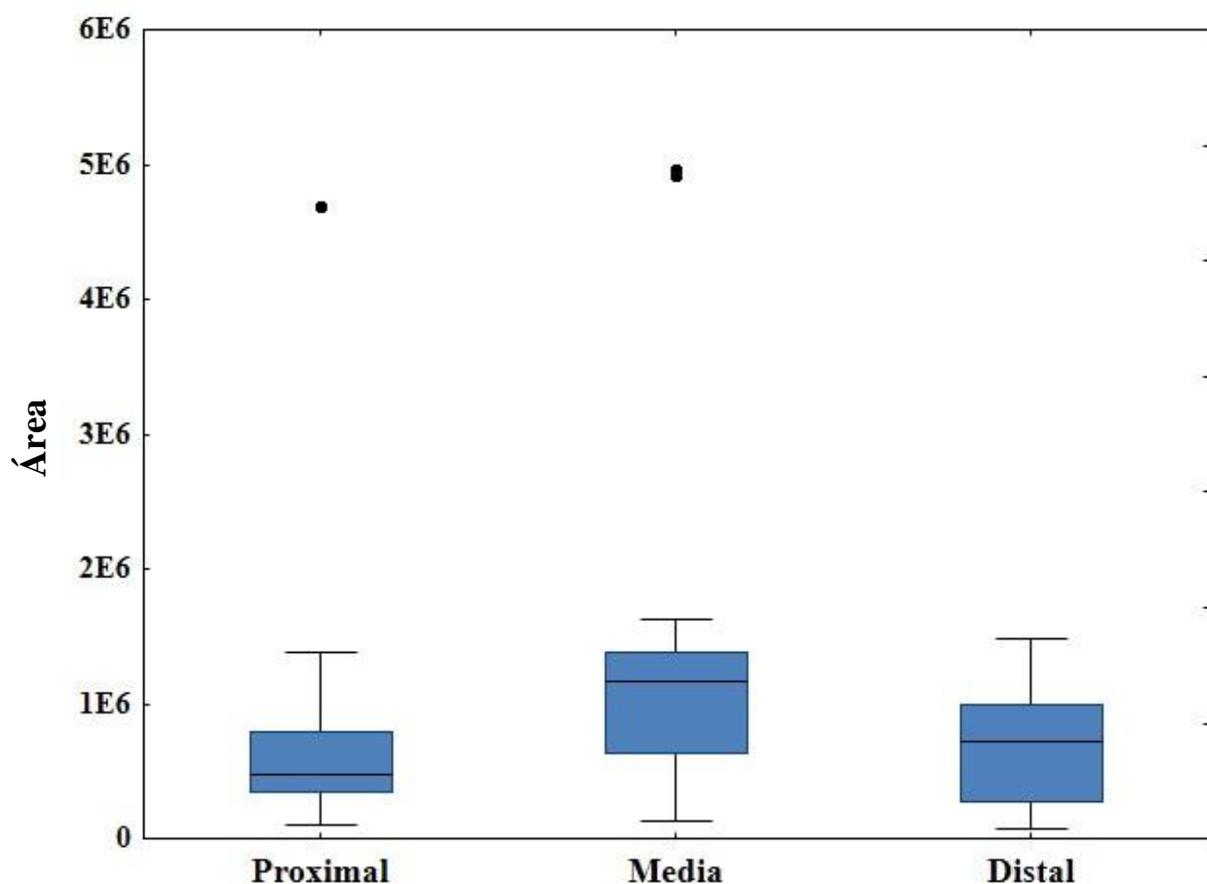


Figura 12. Diagrama de caja del área bajo la curva correspondientes a las regiones proximal, media y distal. La caja representa la mediana y el 50% de la dispersión de los datos, los bigotes son el límite de las cotas internas y los casos extraordinarios están representados con un punto.

Con base en el análisis NMDS (Figura 13), validado con una prueba de ANOSIM (Figura. 14) y un dendograma (Figura 15), se determinó la diferenciación del área bajo la curva y el tiempo de retención que se presentan las fracciones individuales de cada sección del conducto, así mismo se observó que las fracciones individuales en regiones proximal, media y distal se agruparon por región, lo que sugiere que las fracciones de cada región fueron similares entre sí. Lo anterior permite confirmar lo que se visualizó en los cromatogramas, es decir, que la composición peptídica de cada región es diferente.

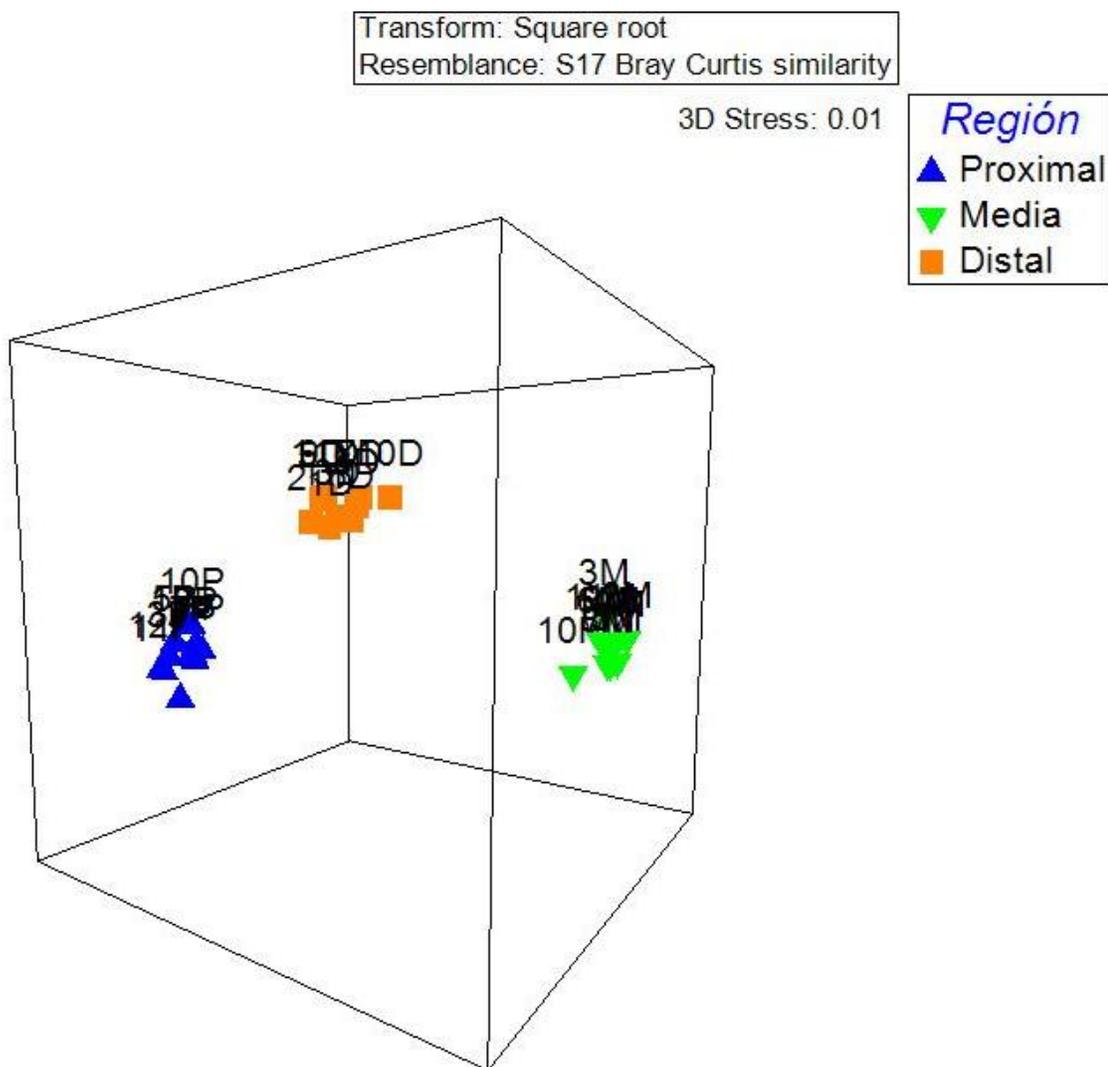


Figura 13. NMDS de las fracciones individuales obtenidas de las regiones proximal, media y distal del conducto venenoso de *Conus perplexus*.

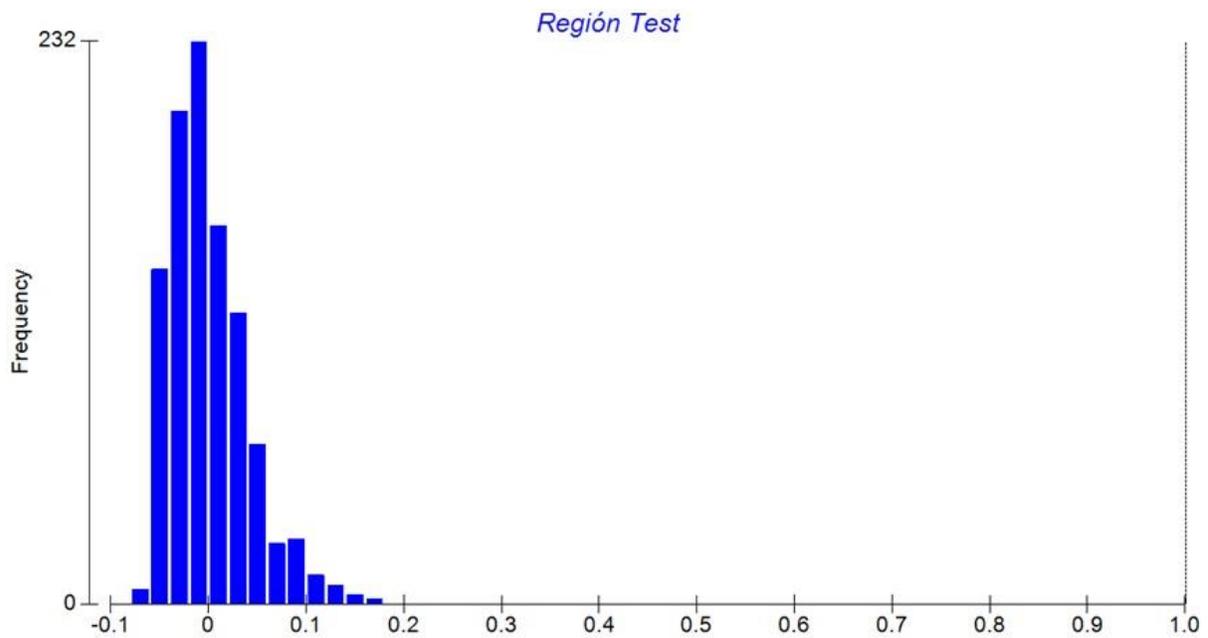


Figura 14. Histograma de frecuencias ANOSIM. El valor de R cae fuera del histograma de frecuencias lo que significa que existen diferencias significativas entre las regiones analizadas.

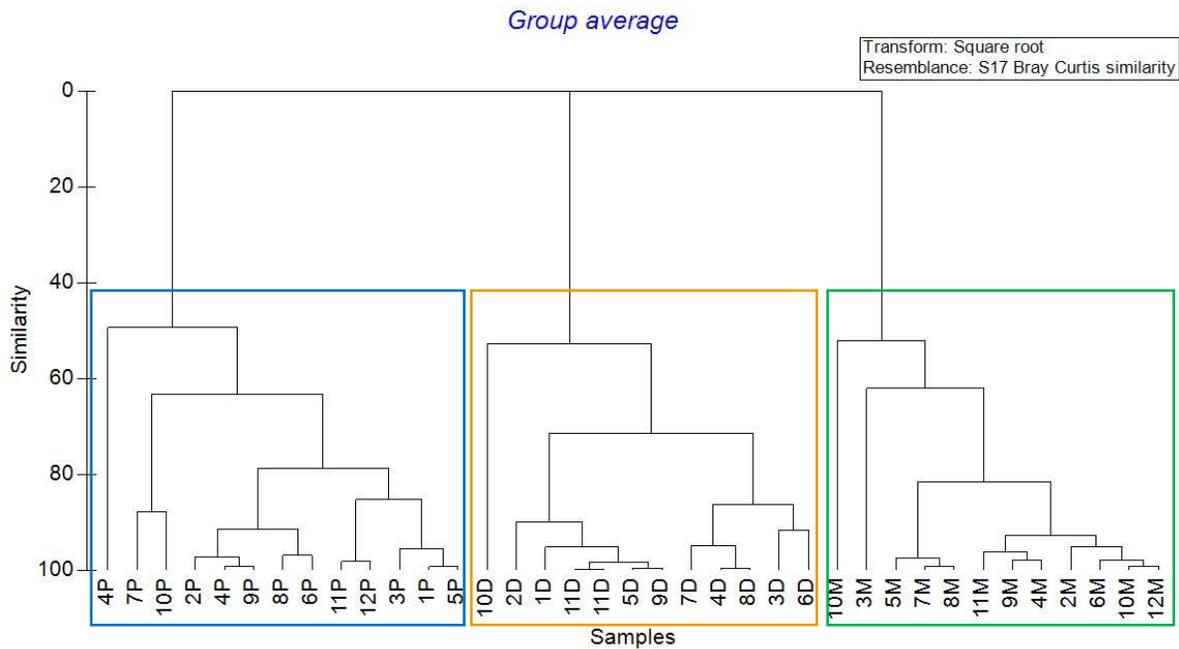


Figura 15. Cluster de similitud obtenido de las tres regiones del aparato venenoso (región proximal=azul; región media= naranja; región distal= verde).

### VII.2.3 Espectrometría de Masas por MALDI-TOF

En el espectro de masas de la región proximal (Figura 16) se detectaron tres péptidos presuntivos con gran intensidad en una relación masa/carga de 4003.9650 Da, 7218.9328 Da y 8415.9953 Da respectivamente.

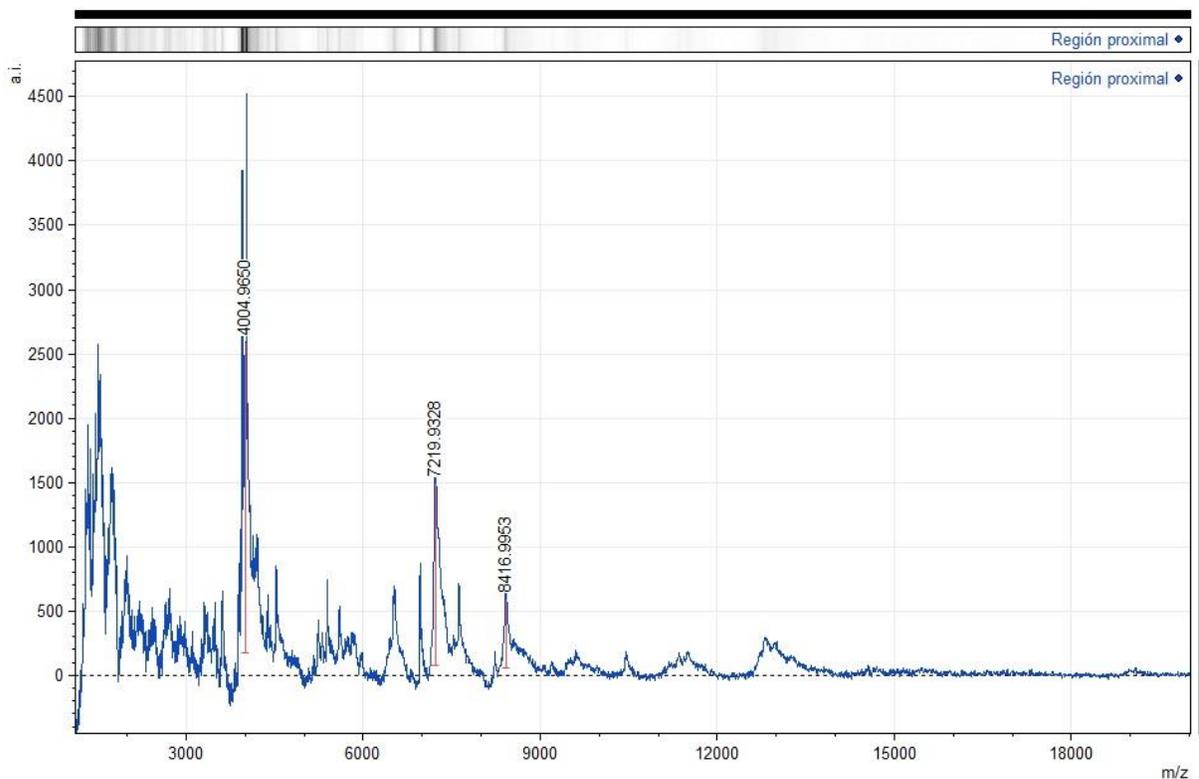


Figura 16. Espectro de masas de la región proximal obtenido por MALDI-TOF en una matriz de CHCA.

Los resultados obtenidos de la región media fueron analizados en una matriz de SA, se observó que la muestra solo ionizó en un rango de 4000 – 6000 m/z y se detectó un péptido con masa de 4823.2824 Da (Figura 17).

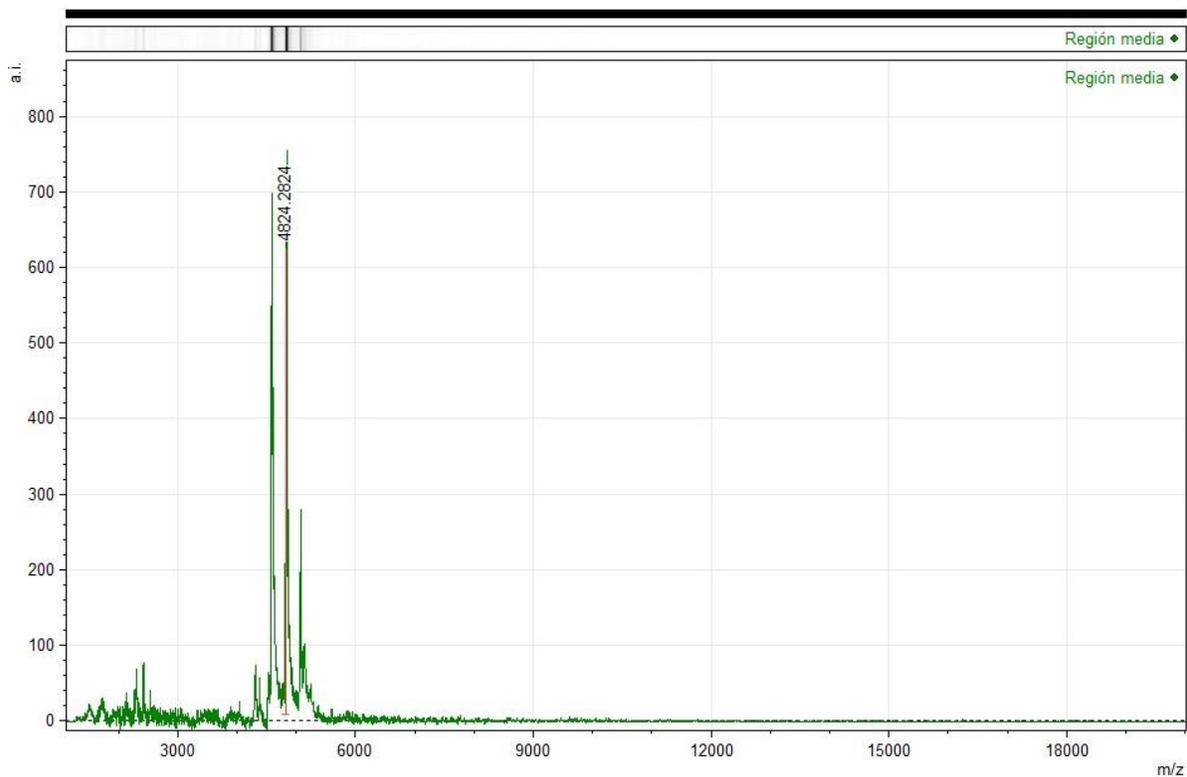


Figura 17. Espectro de masas de la región media obtenido por MALDI-TOF en una matriz de SA.

En el caso del espectro de la región distal se detectó el mayor número de picos. Se registraron cinco picos mayoritarios con masas de 3058.3642 Da, 4470.6783 Da, 6910.1298 Da, 8343.8426 Da, así como el pico con mayor masa 18970.5116 Da (Figura 18).

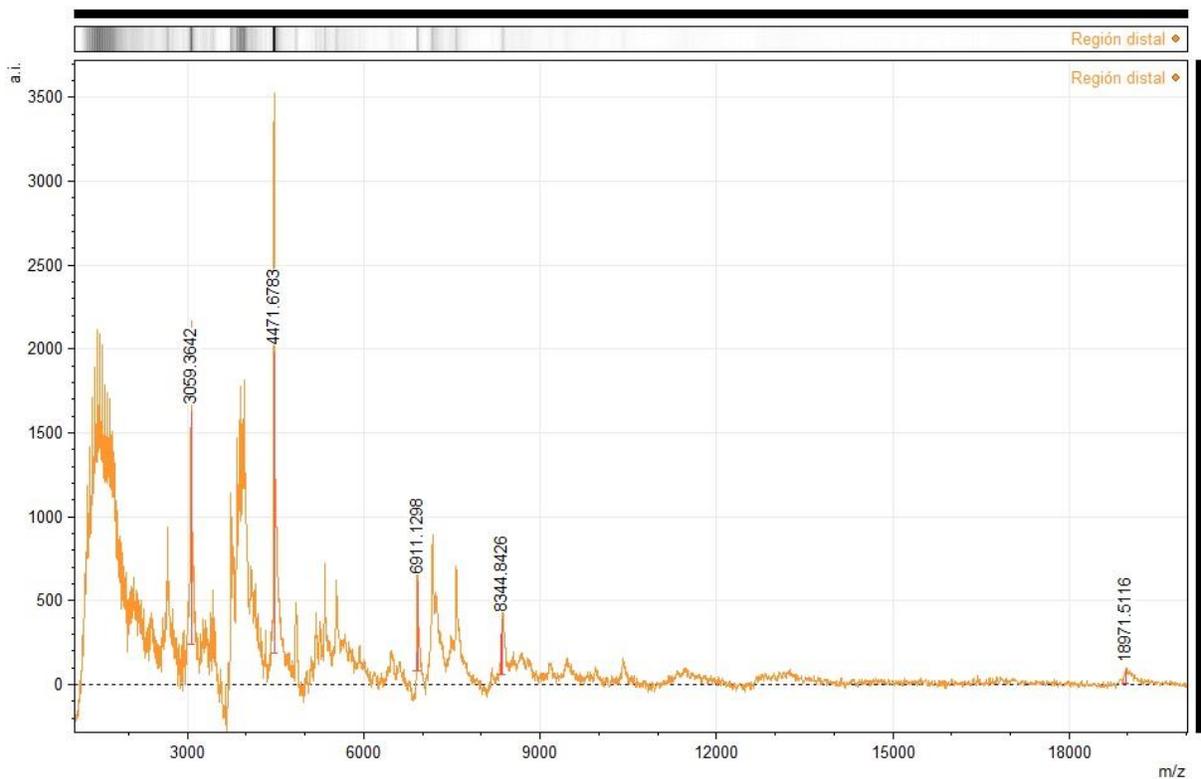


Figura 18. Espectro de masas de la región proximal obtenido por MALDI-TOF en una matriz de CHCA.

En la comparación de las tres regiones (Figura 19) se logra apreciar una clara diferencia en cuanto al número de moléculas ionizadas, así como la relación masa/carga que presentan, es evidente que no se encontraron péptidos representativos con la misma masa que se repitieran en alguna de las tres regiones.

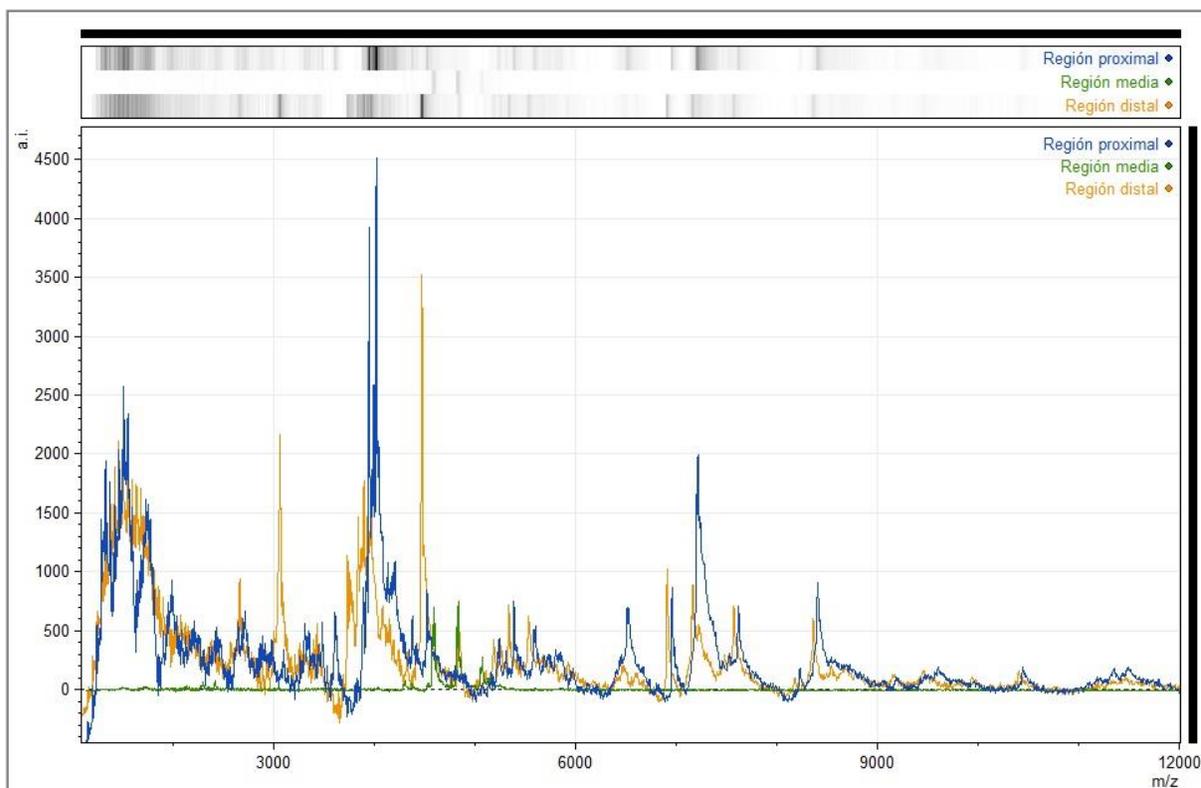


Figura 19. Comparación de los espectros de masas de las regiones proximal (azul), media (verde) y distal (naranja) de *Conus perplexus*. Software mMass en un rango de 0 – 12000 m/z.

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1. Estudio Histológico del Conducto Venenoso

Los estudios farmacológicos reportados previamente sobre el género *Conus* se han basado principalmente en el conducto del aparato venenoso, así mismo se ha reportado la presencia de compuestos bioactivos en otras partes del aparato venenoso con potencial en el área médica (Gorrostieta-Hurtado et al., 2013). Sin embargo, hay escasos estudios respectivos la presencia de toxinas, su posible síntesis y composición bioquímica en diferentes regiones del conducto venenoso.

Con base en los resultados se determinó que el conducto venenoso de *Conus perplexus* cuenta con una marcada diferenciación histológica, que comprende tres componentes principales; una capa exterior de colágeno reportada anteriormente por Marshall et al., (2002); seguida por una lámina basal que separa el colágeno de otra capa de epitelio columnar con gránulos presuntamente cargados de veneno (Safavi-Hemami et al., 2010), los cuales se encuentran dispersos en el lumen (Gorrostieta-Hurtado et al., 2013; Marsh, 1971; Marshall et al., 2002) y presentan variación respecto a su abundancia, conforme las regiones se acercan a la rádula y por ende estarían preparadas para su expulsión.

En investigaciones realizadas por (Gorrostieta-Hurtado et al., 2013) en *Conus purpurascens* se reportaron la presencia de un epitelio con glándulas unicelulares posiblemente exocrinas de secreción holócrina. Estas glándulas disminuyen al acercarse al esófago y recubren la periferia del lumen con una mayor abundancia de gránulos respecto a las regiones anteriores, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio, por lo que esta conformación puede deberse a que a lo largo del conducto se realizan los procesos tanto de transporte como de síntesis y posiblemente de maduración de las conotoxinas (Kaas et al., 2007).

## VIII.2. Caracterización Bioquímica

La extracción de toxinas para estudios de actividad se realiza principalmente en el conducto venenoso o mediante ordeña y la estimulación del caracol para que descargue la toxina (López-Vera et al., 2007), sin embargo, estudios previos reportan diferencias de material peptídico del conducto venenoso de *Conus*, así como la presencia de gránulos de veneno y propiedades farmacológicas de la región proximal y la distal (Bingham et al., 1996; Edean y Duchemin, 1967).

De igual manera se han estudiado los efectos de las distintas regiones del conducto venenoso de *Conus priceps* sobre el caracol marino *Planorbella tenue* (Gorrostieta-Hurtado et al., 2012), donde se observó que cada región presentó perfiles cromatográficos y un efecto del extracto crudo distinto según la región del conducto que se probó.

En el presente trabajo se realizó la caracterización bioquímica de tres regiones del conducto venenoso (proximal, medio y distal) de *Conus perplexus*, cuyo veneno no se había caracterizado previamente. Los análisis realizados por RP- HPLC concuerdan con lo reportado por Gorrostieta-Hurtado et al., (2012) ya que en los perfiles cromatográficos obtenidos de cada una de las tres regiones analizadas, así como en la comparación conjunta se observaron similitudes en cuanto al tiempo de retención de las fracciones detectadas entre la región proximal y media, pero diferencias respecto a la absorbancia y por otro lado, en la región distal se registraron fracciones ausentes en la región proximal y media, lo que establece una clara diferencia en cuanto al material peptídico.

Los resultados obtenidos en los diagramas de caja confirman lo observado en las imágenes de histología, donde se puede apreciar un aumento en la abundancia de gránulos de veneno en las regiones media y distal respecto a la región proximal, esto también se observa en las absorbancias obtenidas por RP-HPLC, al ser la región proximal la que presentó las mAU más bajas en comparación con el área bajo la curva total de los cromatogramas correspondientes al resto de las regiones.

El escalamiento multidimensional es una técnica de análisis multivariante no paramétrico que se basa en conceptos de objeto-estímulo, esta parte la similaridad–disimilaridad–distancia entre las variables analizadas, mediante las cuales se reflejan las similitudes observadas entre las muestras en cuestión. Las medidas de semejanza nos permiten expresar numéricamente el vínculo que existe entre los diferentes muestras (Linares, 1990). Con base en lo anterior se puede asegurar que el NMDS validó de manera cuantitativa los resultados obtenidos de los cromatogramas y que las tres regiones fueron distintas con base al agrupamiento que presentaron las distintas fracciones individuales entre regiones y la separación que se delimitó entre ellas respecto a las diferencias entre las variables analizadas de las fracciones presentes de cada región. Lo anterior se corroboró con los ensayos de similitud ANOSIM, donde el valor de R estableció diferencias significativas y en el cluster de similitud las fracciones analizadas se agruparon con base a sus similitudes y mostraron una clara separación en tres regiones representativas, lo cual apoya la hipótesis de que ocurren cambios bioquímicos a lo largo de las diferentes regiones del conducto venenoso.

### **VIII.3. Espectrometría de Masas por MALDI-TOF**

En la comparación de los espectros obtenidos por MALDI-TOF se aprecian las diferencias respecto a la composición de las tres regiones, tanto en el número de moléculas ionizadas, así como la relación masa/carga. Esto debido a que las masas detectadas de los péptidos presuntivos son diferentes y no se determinó la presencia compuestos ionizados con una misma masa repetida en alguna otra región, sin embargo, se pudieron observar ciertas tendencias respecto a los espectros obtenidos de las diferentes regiones, donde los picos con mayor intensidad relativa se encuentran ausentes en el resto de las regiones, lo cual concuerda con reportes previos por Marshall et al., (2002).

Los componentes mayoritarios identificados en *Conus perplexus* presentaron masas de 4003 Da; 4,823 Da y 4,470 Da respectivamente, lo que cae fuera del rango común reportado por Bingham et al., (1996), sin embargo, se han obtenido conotoxinas con masas similares como ca8a en *Conus characteristicus*, con una masa de 4,606 Da (Liu et al., 2008), s4a y s4b de *Conus striatus* con 4,080 y 4,974 Da respectivamente (Kelley et al., 2006). Adicionalmente se detectó un componente con masa molecular muy alta en la región distal del conducto venenoso de *Conus perplexus* (18,968 Da), la cual podría estar relacionada con actividades de fosfolipasa tipo A<sub>2</sub>, dado que en el estudio se realizó dicha prueba y las regiones proximal y media presentaron actividad, así mismo la masa presenta valores muy altos como la reportada en Conodipina-M aislada del veneno de *Conus magus* que presentó una masa de 13,600 Da (McIntosh et al., 1995).

Dutertre et al., (2013) discuten que el género *Conus* presenta una regionalización del conducto venenoso y reportaron en el caso de *Conus geographus* que el veneno de estos organismos puede alternar rápidamente entre venenos diferentes con base a la respuesta de estímulos depredadores o defensivos y que dichos venenos se originan en las regiones distales y proximales del conducto, lo cual podría explicar como se pueden generar dos venenos distintos con base en estímulos y así mismo las diferencias detectadas entre las masas de los péptidos presuntivos encontrados en las tres regiones del conducto venenoso estudiadas.

## IX. CONCLUSIONES

Histológicamente el conducto venenoso está compuesto por tres componentes principales: una capa externa de colágeno, seguida de una lámina basal y una capa de epitelio columnar con posible función de secreción holocrina que recubren un lumen con abundante presencia de gránulos de veneno en su interior.

En el perfil cromatográfico de las conotoxinas no se encontró diferencia significativa respecto a la concentración de total de la muestra al comparar el área bajo la curva de las diferentes regiones, sin embargo, se determinaron diferencias significativas en cuanto al área individual y tiempo de retención de cada fracción individual detectadas en cada región del conducto venenoso.

Los compuestos con mayor intensidad detectados en espectrometría de masas coinciden con conotoxinas reportadas anteriormente, por lo tanto se determinó la presencia de péptidos presuntivos diferentes en cada una de las regiones analizadas y no se detectó la presencia de algún componente con la misma relación masa/carga repetido en alguna región.

Lo anterior valida la hipótesis de que a lo largo del conducto del conducto se presentan diferencias tanto morfológicas como bioquímicas y sugiere cambios conformacionales en los péptidos a lo largo del conducto venenoso.

## X. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se recomienda orientarse en los siguientes estudios:

- Evaluación de las actividades biológicas tanto por región, como fracciones de interés para comprobar posibles aplicaciones farmacológicas.
- Profundizar en los componentes histológicos encontrados por medio de técnicas más sensibles como microscopia electrónica de transmisión (TEM).
- Evaluar los componentes de bulbo y rádula para obtener un panorama más profundo del proceso al que se ven sometidas las conotoxinas a lo largo del aparato venenoso.
- Aumentar el número de muestreos así como los puntos de colecta para observar variaciones en la producción de veneno relacionadas con el tiempo y el lugar.

## XI. LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. I., y M. T. Hearn. 1996. High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Methods in Enzymology* 279:3–26.
- Alamo V. y V. Valdivieso. 1987. Lista sistemática de moluscos marinos del Perú. *Boletín del Instituto del Mar de Perú*. 1- 205.
- Bingham, J. P., A. Jones, R. J. Lewis, P. R. Andrew y P. F. Alewood. 1996. *Conus* venom peptides (conopeptides): inter-species, intra-species and within individual variation revealed by ionspray mass spectrometry. 13–27 p. *Biomedical Aspects of Marine Pharmacology*. Alaken, Fort Collins.
- Brusca, R. C. y G. J. Brusca. 2005. *Invertebrados*. Hill, McGraw. México.
- Buczek, O., G. Bulaj y B. M. Olivera. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:3067–3079.
- Buczek, O., D. Wei, J. J. Babon, X. Yang, B. Fiedler, P. Chen, D. Yoshikami, B.M. Olivera, G. Bulaj y R. S. Norton. 2007. Structure and sodium channel activity of an excitatory II-superfamily conotoxin. *Biochemistry* 46:9929–9940.
- Bulaj, G. 2005. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology advances* 23:87–92.
- Castillo-Rodríguez, Z. G. 2014. Biodiversidad de moluscos marinos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85:419–430.
- Craig, G., P. Bandyopadhyay y B. M. Olivera. 1999. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *European Journal of Biochemistry* 264:271–275.
- Cruz, M. 1992. Estado actual del recurso malacológico (Bivalvos y Gasterópodos) de la zona infralitoral del Golfo de Guayaquil. *Acta Oceanográfica Del Pacífico* 7:41–68.

- Cruz J. L., y J. White. 1995. Clinical toxicology of *Conus* snail stings. *Clinical Toxicology of Animal Venoms* 117–127.
- Cruz, L. J., W. R. Gray, B. M. Olivera, R. D. Zeikus, L. Kerr, D. Yoshikami y E. Moczydlowski. 1985. *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *Journal of Biological Chemistry* 260:9280–9288.
- Cruz, L. J., W. R. Gray, D. Yoshikami y B. M. Olivera. 1958. *Conus* venoms: a rich source of neuroactive peptides. *Toxicology* 4:107–132.
- Davis, J., A. Jones y R. J. Lewis. 2009. Remarkable Inter- and IntraSpecies Complexity of Conotoxins Revealed by LC/MS. *Peptides* 30:1222–1227.
- Duda, T. F., A. J. Kohn y S. R. Palumbi. 2001. Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biological Journal of the Linnean Society* 73:391–409.
- Duterte, S., A. H. Jin, I. Vetter, B. Hmlton, K. Lavergne, V. Dutertre, B. G. Fry, A. Antunes, D. J. Venter, P. F. Alewood y R. J. Lewis. 2014. Evolution of separate predation-and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature communications* 5: 1-9.
- Endean, R. y C. Duchemin. 1967. The venom apparatus of *Conus magus*. *Toxicon* 4:275–284.
- England, L. J., J. Imperial, R. Jacobsen, A. G. Craig, J. Gulyas, M. Akhtar, J. Rivier, D. Julius y B. M. Olivera .1998. Inactivation of a serotonin- gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science* 281:575–578.
- Fainzilber, M., D. Gordon, A. Hasson, M. E. Spira y E. Zlotkin. 1991. Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile* neovicarius. *European Journal of Biochemistry* 202:589–595.
- Flecker, H. 1936. Cone shell mollusc poisoning, with report of a fatal case. *Medical Journal of Australia* 1:464–466.
- Finet, Y. 1985. Preliminary faunal listo of the marine mollusks of the Galápagos Islands.

Documents de Travail 20: 1-50

- Gorrostieta-Hurtado E., M.B. Aguilar-Ramírez, A. Falcón-Alcántara, E. Michel-Morfín, V. Landa- Jaime y E. P. Heimer de la Cotera. 2012. Perfil cromatográfico y efecto del extracto del conducto venenoso de *Ductoconus princeps* en *Planorbella tenue*. Boletín de Malacología Medica 18: 1-4.
- Gorrostieta-Hurtado, E., A. Falcón-Alcantará, L.Palma-Tirado, R. Hernández-Matehuala, A. Vuelvas-Solórzano, E. Michel-Morfín y V. Landa-Jaime. 2013. Descripción anatómica, histológica y cromatográfica del aparato venenoso de *Conus purpuracens*. Serie Oceanológica 13: 110–112.
- Gray, W. R., A. Luque, B. M. Olivera, J. Barrett y L. J. Cruz . 1981. Peptide toxins from *Conus geographus* venom. Journal of Biological Chemistry 256: 4734–4740.
- Greene, J. L., y A. J. Kohn, 1989. Functional morphology of the *Conus* proboscis (Mollusca: Gastropoda). Zoology 219: 487–493.
- Guo, D., C. T. Mant, A. K. Taneja, y R. S. Hodge .1986. Prediction of peptide retention times in reversed-phase high-performance liquid chromatography II. Correlation of observed and predicted peptide retention times factors and influencing the retention times of peptides. Chromatography 359: 519-532
- Halai, R., y D. J. Craik .2009. Conotoxins: Natural product drug leads. Natural Product Reports 26:526–536.
- Halstead, B. W. 1988. Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. Princeton: Darwin Press.
- Hermitte, L. C. D. 1946. Venomous marine molluscs of the genus *Conus*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 39:485–512.
- Kaas, Q., J. C. Westermann, R. Halai, C. K. Wang, y D. J. Craik. 2007. ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. Bioinformatics 24:445–446.

- Kaas Q., J. C. Westermann, y D. J. Craik. 2010. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon* 55:1491–1509.
- Kelley, W. P., J. R. Schulz, J. A. Jakubowski, W. F. Gilly, J. V Sweedler. 2006. Two Toxins from *Conus striatus* that Individually Induce Tetanic Paralysis. *Biochemistry* 45:14212–14222.
- Keen, K. A. 1971. Sea shells of tropical west America. California. Stanford University Press.
- Kerr, L. M., y D. Yoshikami. 1984. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 308:282–284.
- Kohn, A. J. 1990. Tempo and mode of evolution in Conidae. *Malacologia* 32:55–67.
- Kohn, A. J. 1998. Superfamily Conoidea. *Beesley* 5:846–854.
- Kohn, A. J., P. R. Saunders, y S. Wiener, N. Y. Ann. 1960. Studies on the venom of the marine snail *Conus californicus*. *Academy of Sciences*. 90:706–725.
- Lewis, R. J., S. Dutertre, I. Vetter, y M. J. Christie. 2012. *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacological Reviews* 64:259–298.
- Linares, G. 1990. Linares, G. (2013). Escalamiento multidimensional: conceptos y enfoques. *Investigación Operacional* 22: 173-183.
- Liu, L., X. Wu, D. D. Yuan, C. Chi, y C. Wang. 2008. Identification of a Novel S-Superfamily Conotoxin from Vermivorous *Conus characteristicus*. *Toxicon* 51:1331–1337.
- López-Vera, E., R. B. Jacobsen y M. Ellison. 2007. A novel alpha conotoxin ( $\alpha$ -PIB) isolated from *C. purpurascens* is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon* 49:1193–1199.
- Marsh, H. 1971. The foregut glands of the vermivorous cone shells. *Zoology*, 19:313–326.
- Marshall, J., W. P. Kelley, S. S. Rubakhin, J. P. Bingham, J. V. Sweedler y W. F. Gilly. 2002. Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. *Biological Bulletin*,

203:27–41.

- McIntosh, J. M., F. Ghomashchi, M. H. Gelb, D. J. Dooley, S. J. Stoehr, A. B. Giordani, S. R. Naisbitt y B. M. Olivera. 1995. Conodipine-M, a Novel Phospholipase A2 Isolated from the Venom of the Marine Snail *Conus magus*. *Biological Chemistry* 270:3518–3526.
- Miljanich, G. P. 2004. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Current Medicinal Chemistry* 11:3029– 3040.
- Newman, D. J., G. M. Cragg y K. M. Snader. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Natural Products* 66:1022–1037.
- Norton, R. S., y B. M. Olivera. 2006. Conotoxins down under. *Toxicon*, 48:780–798.
- Olivera, B. M. 1997. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Molecular Biology of Cell* 8:2101–2109.
- Olivera, B. M. 2000.  $\omega$ -Conotoxin MVIIA: From marine snail venom to analgesic drug. *Drugs from the Sea* 74–85.
- Olivera, B. M., W. R. Gray, R. Zeikus, J. M. McIntosh, J. Varga, J. Rivier, V. De Santos, J. L. Cruz. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230:1338–1343.
- Olivera, B. M. y R. W. Teichert. 2007. Diversity of the Neurotoxic *Conus* Peptides: A Model for Concerted Pharmacological Discovery. *Molecular Interventions*, 7:251–260.
- Olivera, B. M. 2002. *Conus* Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:25–47.
- Olivera, B. M. 2006. *Conus* Peptides: Biodiversity-based Discovery and Exogenomics. *Biological Chemistry* 281:31173–31177.
- Olivera, B. M., J. Rivier, C. Clark, C. A. Ramilo, G. P. Corpuz, F. C. Abogadie, E. E. Mena, S. R. Woodward, D. R. Hillyard y L. J. Cruz. 1990. Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249:257–263.

- Paredes C., P. Huaman, F. Cardoso, R. Vivar, y V. Vera. 1999. Estado actual del conocimiento de los moluscos acuáticos. Perú. *Revista Peruana de Biología* 6:5–47.
- Paredes, C., F. Cardoso, K. Altamirano, P. Baltazar y L. Romero. 2010. La familia conidae en el mar peruano. *Revista Peruana de Biología* 17:65–73.
- Puillandre, N., P. Bouchet, T. F. Duda, S. Kaufenstein, A. J. Kohn, B. M. Olivera, M. Watkins y C. Meyer. 2014. Molecular phylogeny and evolution of the cone snails (Gastropoda, Conoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 78: 290-303
- Puillandre, N., y M. Holford. 2010. The Terebridae and teretoxins: Combining phylogeny and anatomy for concerted discovery of bioactive compounds. *BMC Chemical Biology* 10: 7.
- Puillandre, N., M. V. Modica, Y. Zhang, L. Sirovich, M. C. Boisselier, C. Cruaud, M. Holford y S. Samadi. 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* 21:2671–2691.
- Puillandre, N., S. Samadi, M. C. Boisselier, A. V. Sysoev, Y. I. Kantor, C. Cruaud, A. Couloux, P. Bouchet. 2008. Starting to unravel the toxoglossan knot: molecular phylogeny of the “turrids” (Neogastropoda: Conoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47:1122–1134.
- Rigby, A. C., E. Lucas-Meunier, D. E. Kalume, E. Czerwiec, B. Hambe, I. Dahlqvist, P. Fossier, G. Baux, P. Roepstorff, J. D. Baleja, B. C. Furie y J. Stenflo. 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:5758–5763.
- Rivadeneira V. y C. Arias. 1999. Especies peruanas del subgenero *Ximeniconus* Emerson y Old Jr., 1962 (Mollusca, Gastropoda, Conidae). *Boletín de Lima* 118:87–93.
- Robinson, S., y R. Norton, 2014. Conotoxin gene superfamilies. *Marine Drugs*, 12:6058–6101.
- Regnier, F. E., y K. M. Gooding. 1990. *HPLC of Biological Macromolecules: Methods and Applications*. CRC Press. 51: 145-77.

- Shasky R. D. 1997. New range, depth and size for some Panamic Province gastropods. *The Festivus*, 29:45–52.
- Skoglund, C. 2002. Panamic province molluscan literature. Additions and changes from 1971 through 2001. III Gastropoda. *The Festivus* 33: 1-286.
- Safavi-Hemami, H., N. D. Young, N. A. Williamson y A. W. Purcell. 2010. Proteomic interrogation of venom delivery in marine cone snails: Novel insights into the role of the venom bulb. *Proteome Research* 9:5610–5619.
- SEMARNAT. 2006. Ordenamiento Ecológico Marino del Golfo de California. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México
- Sharpe, I. A., J. Gehrman, M. L. Loughnan, L. Thomas, D. A. Adams, A. Atkins, E. Palant, J. D. Craik, D. J. Adams, P. F. Alewood y R. J. Lewis. 2001. Two new classes of conopeptides inhibit the alpha1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neuroscience* 4:902–907.
- Spengler, H. A., y A. J. Kohn. 1995. Comparative external morphology of the *Conus osphradium* (Mollusca: Gastropoda). *Zoology* 235:439–453.
- Taylor, J. D. 1993. Foregut anatomy, feedings mechanisms and classification of the Conoidea (Toxoglossa)(Gastropoda). *Bulletin of the Natural History Museum of London (Zoology)* 59:125–170.
- Terlau, H., y B. M. Olivera. 2004. *Conus* venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews* 84:41–68.
- Terlau, H., K. J. Shon, M. Grilley, M. Stocker, W. Stuhmer, y B. M. Olivera. .1996. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* 381:148–151.
- Twyman, R. M. 2004. Principles of proteomics. Bios Scientific. Oxford.
- Utkin, Y. N. 2015. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *Biological Chemistry* 6: 28.

Wilce, M. C. J., M. I. Aguilar y M. T. W. Hearn. 1993. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins: CXXII. Application of experimentally derived retention coefficients to the prediction of peptide retention times: studies with myohemerythrin. *Chromatography* 632: 11-18.

Woodward, S. R., L. J. Cruz, B. M. Olivera y D. R. Hillyard. 1990. Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *The EMBO Journal* 9:1015–1020.

## XII. APENDICES

Apendice 1.- Tiempo de retencion y areas bajo la curva de las fracciones representativas de la región proximal del conducto venenoso de *Conus perplexus*.

| Pico | Tiempo de retención | Área bajo la curva |
|------|---------------------|--------------------|
| 1P   | 4.233               | 790926             |
| 2P   | 4.839               | 424563             |
| 3P   | 5.441               | 662882             |
| 4P   | 30.842              | 462069             |
| 5P   | 31.665              | 776488             |
| 6P   | 32.284              | 304024             |
| 7P   | 32.606              | 160588             |
| 8P   | 35.811              | 342902             |
| 9P   | 41.162              | 474104             |
| 10P  | 64.825              | 99340              |
| 11P  | 78.995              | 1284271            |
| 12P  | 79.979              | 1375458            |
| 13P  | 81.459              | 4691122            |

Apendice 2.- Tiempo de retencion y areas bajo la curva de las fracciones representativas de la región media del conducto venenoso de *Conus perplexus*.

| <b>Pico</b> | <b>Tiempo de retención</b> | <b>Área bajo la curva</b> |
|-------------|----------------------------|---------------------------|
| 1M          | 4.420                      | 1359246                   |
| 2M          | 5.020                      | 1622453                   |
| 3M          | 5.721                      | 4969061                   |
| 4M          | 30.380                     | 969625                    |
| 5M          | 30.999                     | 630596                    |
| 6M          | 31.822                     | 1275647                   |
| 7M          | 32.377                     | 581280                    |
| 8M          | 35.751                     | 563632                    |
| 9M          | 40.901                     | 1048434                   |
| 10M         | 64.023                     | 136076                    |
| 11M         | 78.365                     | 1160827                   |
| 12M         | 79.353                     | 1385332                   |
| 13M         | 80.856                     | 4915316                   |

Apendice 3.- Tiempo de retencion y areas bajo la curva de las fracciones representativas de la región distal del conducto venenoso de *Conus perplexus*.

| <b>Pico</b> | <b>Tiempo de retención</b> | <b>Área bajo la curva</b> |
|-------------|----------------------------|---------------------------|
| 1D          | 4.356                      | 1153750                   |
| 2D          | 5.447                      | 1480044                   |
| 3D          | 30.422                     | 537347                    |
| 4D          | 30.626                     | 277171                    |
| 5D          | 31.824                     | 997300                    |
| 6D          | 32.424                     | 383467                    |
| 7D          | 33.747                     | 227265                    |
| 8D          | 35.821                     | 280976                    |
| 9D          | 41.056                     | 983073                    |
| 10D         | 64.320                     | 74478                     |
| 11D         | 78.663                     | 934417                    |
| 12D         | 78.945                     | 724896                    |
| 13D         | 79.650                     | 1146811                   |