

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PÉPTIDOS PRESENTES EN EL
CONDUCTO VENENOSO DEL CARACOL MARINO

Conus (Conasprella) ximenes



VALERIA MALENY MORENO RODRÍGUEZ

Hermosillo, Sonora

octubre 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 APROBACION

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

Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros
Director de Tesis

Dra. Perla Urquidez Bejarano
Sinodal Secretario

M. en C. Erick José Ponce Manjarrez
Sinodal

Dr. Sergio Agustín Román González
Sinodal Suplente

Dr. Miguel Cuevas Cruz
Sinodal Externo

DEDICATORIA

Dedico a este trabajo a las personitas que más quiero, mis padres Teclo y Migdalia quienes siempre están llenos de consejos, enseñanzas y mucho amor. Todos mis logros siempre estarán dedicados a ustedes, gracias por siempre confiar y creer en mí. A mis hermanos y al resto de mi familia, abuelos, tíos y primos, gracias por su valioso e incondicional apoyo que siempre me acompaña.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por permitirme realizar mis estudios de licenciatura.

Al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis investigaciones en sus instalaciones.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros por aceptarme en su laboratorio y permitirme ser parte de su equipo, por su apoyo y por guiarme durante el desarrollo de la tesis.

Al M. en C. Erick José Ponce Manjarrez y a la Dra. Perla Urquidez Bejarano por introducirme al mundo de *Conus*, su apoyo desde el comienzo, sus recomendaciones y tiempo extra dedicado a esta tesis.

Al Dr. Sergio Agustín Román González y al Dr. Miguel Cuevas Cruz por su paciencia, enseñanzas, ánimos, apoyo en todo momento, por introducirme al bello mundo de la química y por su valiosa amistad.

A los integrantes del laboratorio de Biomacromoléculas por su amistad y por hacer mi pequeña estancia en la ciudad de México una muy linda experiencia llena de buenos momentos y mucho cariño.

A los integrantes del laboratorio de Ecología Marina de la UNISON por su amistad y buenos deseos.

A mis amigos más cercanos Mariana, Selma, Valeria, Jorge, Eduardo, Juan, Chuy, Daniel, mis amigos de la licenciatura y mis amigos Regis por brindarme su amistad, cariño, escucharme cuando me quejaba, apoyo y en algunos casos consejos.

A Richo por su amor y por desvelarse todas las noches para hacerme compañía.

CONTENIDO

FORMATO DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Toxinas en Organismos Marinos	3
II.1.1. Características generales del género <i>Conus</i>	4
II.1.2. Anatomía del aparato venenoso	5
II.2. Veneno de <i>Conus</i>	6
II.2.1. Estructura bioquímica del veneno de <i>Conus</i>	7
II.2.2. Conotoxinas y conopéptidos	7
II.2.3. Síntesis de veneno	8
II.2.4. Modificaciones postraduccionales	11
II.2.5. Farmacología y fisiología	12
II.3. Técnicas Analíticas para el Estudio de Toxinas	14
II.3.1. Purificación de péptidos por HPLC de fase reversa	14
II.3.2. Espectrometría de masas	15
II.3.3. Secuenciación de péptidos	16
II.3.4. Alineamiento de secuencias	17
II.4. Características Generales de la Especie <i>Conus (Conasprella) ximenes</i>	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22

V.1. Objetivo General	22
V.2. Objetivos Específicos	22
VI. METODOLOGÍA	23
VI.1. Colecta de Material Biológico	23
VI.2. Disección del Aparato Venenoso	24
VI.3 Extracción de Veneno y Determinación de Peso Seco	25
VI.4. Cuantificación del Veneno	25
VI.5. Análisis por HPLC de Fase Reversa	26
VI.5.1 Análisis Estadístico	26
VI.6. Determinación de Masas por Espectrometría de Masa	27
VII. RESULTADOS	28
VII.1. Características Morfológicas de los Organismos	28
VII.2. Cuantificación del Veneno	30
VII.3. Análisis por HPLC de Fase Reversa	31
VII.4. Análisis Estadístico	35
VII.5. Análisis por Espectrometría de Masas	39
VIII. DISCUSIÓN	44
IV. CONCLUSIÓN	48
X. RECOMENDACIONES	49
XI. LITERATURA CITADA	50

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Estadística descriptiva de las medidas de los individuos colectados de la especie <i>Conus ximenes</i>	29
Tabla II	Peso seco de cada una de las secciones del conducto venenoso.	30
Tabla III	Valores obtenidos por cuantificación en Nanodrop a una longitud de onda de 280 nm.	31
Tabla IV	Resumen estadístico del análisis de varianza entre las tres regiones del conducto.	35
Tabla V	Resumen estadístico del área bajo la curva de las tres regiones del conducto venenoso de <i>Conus xiemenes</i> .	35
Tabla VI	Péptidos presuntivos mostrados en el espectro de masas MALDI-TOF de la región proximal, media y distal del conducto venenoso.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura anatómica general del aparato venenoso de caracol marino del género <i>Conus</i> .	5
Figura 2	Esquematación del proceso de maduración de un conopéptido.	10
Figura 3	Diferentes modificaciones postraduccionales de aminoácidos en péptidos sintetizados con caracoles marinos del género <i>Conus</i> .	12
Figura 4	Proceso que ocurre durante la elución de un componente en RP-HPLC.	15
Figura 5	Fotografía de <i>Conus (Conasprella) ximenes</i> .	19
Figura 6	Área de colecta en Puerto Peñasco, Sonora, México.	24
Figura 7	Gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo al 0.1% de TFA en 120 minutos utilizado para el análisis por RP-HPLC.	26
Figura 8	Organismos de la especie <i>Conus ximenes</i> colectados en Puerto Peñasco, Sonora, México.	28
Figura 9	Fotografía del cuerpo blando de la especie <i>Conus ximenes</i> ,	29
Figura 10	Fotografía del aparato venenoso de la especie <i>Conus ximenes</i> .	30
Figura 11	Cromatograma de fase reversa obtenido de la región proximal del conducto venenoso de <i>Conus ximenes</i> a una longitud de onda de 220 nm.	32
Figura 12	Cromatograma de fase reversa obtenido de la región media del conducto venenoso de <i>Conus ximenes</i> a una longitud de onda de 220 nm.	32
Figura 13	Cromatograma de fase reversa obtenido de la región distal del conducto venenoso de <i>Conus ximenes</i> a una longitud de onda de 220 nm.	33

Figura 14	Comparación de los cromatogramas de fase reversa obtenidos de las tres regiones del conducto venenoso (proximal, media y distal) de <i>Conus ximenes</i> a una longitud de onda de 220 nm.	34
Figura 15	Diagrama de caja y bigote del área total de las fracciones en las tres regiones del conducto venenoso.	36
Figura 16	NMDS del área y tiempo de retención de las distintas fracciones encontradas en la región proximal, media y distal del conducto venenoso.	37
Figura 17	Análisis ANOSIM (A) y Cluster (B) del área y tiempo de retención de las distintas fracciones encontradas en la región proximal (azul), media (naranja) y distal (verde) del conducto.	38
Figura 18	Espectro de masas MALDI-TOF de la región proximal del conducto venenoso donde se utilizó la matriz CHCA a una escala de 0 a 9000 m/z.	40
Figura 19	Espectro de masas MALDI-TOF de la región media del conducto venenoso donde se utilizó la matriz CHCA a una escala de 0 a 9000 m/z.	40
Figura 20	Espectro de masas MALDI-TOF de la región distal del conducto venenoso donde se utilizó la matriz CHCA a una escala de 0 a 9000 m/z.	41
Figura 21	Espectro de MALDI-TOF donde las tres secciones del conducto venenoso.	43

RESUMEN

El género *Conus* es el género más grande de invertebrados marinos con más de 500 especies descritas, poseen un aparato venenoso adaptado para la producción de veneno el cual es utilizado para la captura de presas o como mecanismo de defensa. El veneno de estos organismos está compuesto de péptidos con actividades específicas sobre receptores de membrana y canales iónicos, por lo que son fuente de compuestos bioactivos de alto potencial farmacéutico. El objetivo del presente trabajo fue determinar las diferencias en la composición peptídica de las tres regiones del conducto venenoso (proximal, media y distal) de *Conus (Conasprella) ximenes*. Se colectaron 15 individuos en las costas de Puerto Peñasco, Sonora, México. De cada región del conducto se realizó un perfil cromatográfico de alta resolución en fase reversa, se determinó la relación masa/carga utilizando espectrometría de masas tipo MALDI-TOF y se compararon los péptidos más abundantes obtenidos por cromatografía mediante análisis estadísticos. En cuanto a los resultados, se encontró una diferencia en la composición peptídica de las tres regiones del conducto de esta especie. Los cromatogramas indicaron la presencia de 16 fracciones de mayor resolución en la región proximal, 14 en la región media y 11 en la región distal, sin embargo, estos no presentaron diferencias significativas ($p=0.2395$) entre la concentración total de cada región, a partir del análisis de escalamiento multidimensional se determinó que las fracciones individuales si fueron significativamente distintas en cada región. Estas diferencias también se aprecian en los espectros obtenidos por MALDI-TOF donde la relación masa/carga de los componentes es diferente en cada región. Los resultados indican una posible biosíntesis de conotoxinas específicas según la región del conducto venenoso para su uso ya sea como defensa o para capturar presas como se ha observado en otras especies de este género.

I.INTRODUCCIÓN

El medio marino es una de las principales fuentes de recursos naturales para una gran cantidad de especies marinas, estos recursos han sido aprovechados por los seres humanos para cubrir necesidades básicas como alimentación, intereses decorativos y el desarrollo de tratamientos contra enfermedades. Las especies que habitan en el medio marino presentan propiedades químicas- biológicas que se han aplicado para la investigación dentro del área de estas ciencias (Terlau y Olivera, 2004). En particular, el estudio de moléculas producidas por especies marinas ha llevado al entendimiento de las transmisiones nerviosas (estudios realizados con axones de calamar), propiedades de la visión en tiburones y del funcionamiento celular en la reproducción celular (estudiado en gónadas de erizos de mar). Además, una gran cantidad de compuestos bioactivos se han aislado de varias especies marinas como de las esponjas, bryozoa, tunicados, cnidarios y moluscos (Jha y Zi-rong, 2004) estos compuestos son de gran interés farmacológico por su gran diversidad fisiológica y su amplio potencial principalmente para el desarrollo de fármacos de uso terapéutico.

En el caso de los moluscos gasterópodos, específicamente el género *Conus*, se han aislado péptidos con una actividad biológica específica, dicha característica se ha utilizado para el desarrollo de nuevos fármacos y para el estudio del comportamiento de la transmisión neuronal. Uno de los compuestos bioactivos aislado del veneno de *Conus magus* mejor conocido por nombre comercial Ziconitide o Prialt es utilizado en el tratamiento del dolor crónico como analgésico ya que es un bloqueador específico de canales de calcio dependientes de voltaje (Hernández et al., 2014).

Los caracoles marinos más estudiados pertenecen a la superfamilia Conoidea, esta superfamilia está compuesta por gasterópodos marinos, con un aproximado de 17 familias actuales validadas con alrededor de 10,000 especies descritas de las cuales 4000 son especies vivientes (Puillandre et al., 2008). Su tamaño promedio va de los 3 a los 50 mm (Puillandre et al., 2008), todos son depredadores y se clasifican en tres grupos según su tipo de alimentación en: vermívoros si se alimentan de gusanos, piscívoros si se alimentan de peces y molusquívoros

si se alimentan de moluscos. Se distribuyen en una amplia diversidad de ambientes, desde los trópicos hasta los polos en diferentes profundidades y sustratos como fondos rocosos, arenosos, fangosos, arrecifes de coral y fondos cubiertos de vegetación (Paredes et al., 2010). Dentro de esta superfamilia se encuentran tres familias clasificadas de acuerdo con las características de su concha larval; Conoidea, Terebridae y Turridae, sin embargo, clasificaciones más recientes incluyen la morfología de la rádula y datos moleculares donde se utilizan ADN mitocondrial (Pullandre et al., 2008).

Las especies del género *Conus* generan un veneno con una compleja mezcla de péptidos, estos suelen ser muy diversos y son clasificados en familias estructurales según su estructura primaria y en familias farmacológicas por su función característica en el sistema nervioso de la presa, características que los hacen farmacológicamente importantes (Lewis y Garcia, 2003). Estos péptidos son producidos en el aparato venenoso el cual está compuesto por un bulbo, un conducto venenoso y un saco radular, cada una de estas secciones tiene una función específica: el bulbo actúa como bomba peristáltica, en el conducto venenoso se sintetiza y madura el veneno y el saco radular tiene la función de cargar los dientes radulares de veneno ya maduro para su uso como método de defensa o para caza (Dutertre et al., 2014). Debido a que la síntesis del veneno se lleva a cabo en el conducto venenoso, esta sección contiene una mayor diversidad de péptidos que otras secciones del aparato venenoso (Gorrostieta-hurtado et al., 2013), además, se ha encontrado la presencia de distintos péptidos según la región del aparato venenoso (Garrett et al., 2005). El conocimiento que se tiene de organismos del género *Conus* y sus compuestos bioactivos es muy reducido (se estima que se conoce menos del 0.1%) por lo que se requiere mayor atención al estudio fisiológico y bioquímico de estos organismos marinos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar las diferencias en la composición peptídica de las tres regiones del conducto venenoso de *Conus (Conasprella) ximenes* con la finalidad de aportar información al poco conocimiento que se tiene de estas moléculas biológicamente activas que estos organismos producen.

II. ANTECEDENTES

II.1 Toxinas en Organismos Marinos

Los organismos marinos presentan una gran diversidad de propiedades biológicas las cuales han llevado al desarrollo de avances importantes dentro de las ciencias biológicas y químicas. Con la ayuda de técnicas biotecnológicas se ha llegado al aislamiento de aproximadamente 10,000 metabolitos de los cuales algunos han presentado propiedades farmacológicas (Jha y Zi-rong, 2004), para así contribuir al desarrollo de nuevos fármacos. Entre los organismos marinos más estudiados por sus toxinas se encuentran los poríferos, tunicados, cnidarios y moluscos (Lewis y Garcia, 2003), un ejemplo de lo anterior serían las esponjas, dentro de este grupo se han encontrado metabolitos bioactivos en alrededor 11 géneros de los cuales algunos han mostrado actividad anticancerígena y antiinflamatoria (Jha y Zi-rong, 2004), así como también algunos compuestos de la especie de tunicado *Aplidium albicans* presenta actividad anticancerígena (Haefner, 2003). Compuestos provenientes de cnidarios como las anemonas, medusas y corales se ha determinado la presencia de actividad antibacteriana, antiinflamatoria, analgésica y antitumoral. En el caso de los moluscos se han encontrado compuestos bioactivos en varias especies, pero las de mayor interés por su diversidad peptídica y su capacidad neurotóxica son las especies que pertenecen al género *Conus* y cabe resaltar que a estas toxinas se les ha dado un uso analgésico por su interacción con el sistema nervioso debido a que estas toxinas actúan como inhibidores de canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje (Jha y Zi-rong, 2004).

II.1.1 Características generales del género *Conus*

La superfamilia Conoidea se divide en 15 familias: Clavatulidae, Drilliidae, Pseudomelatomidae, Horaiclavidae, Strictispiridae, Terebridae, Turridae, Cochlespiridae, Borsoniidae, Miutromorphidae, Clathurellidae, Conidae, Conorbidae, Rapthitomidae y Mangeliidae (Bouchet et al., 2011). El género *Conus* se encuentra dentro de la familia Conidae la cual se distribuye principalmente en zonas tropicales en el Indopacífico y el Pacífico occidental predominantemente en agua someras (menos de 5 metros) pero se han encontrado especies en profundidades mayores de 1000 metros como es el caso de la especie *C. teramachii* (Paredes et al., 2010; Peters et al., 2013), además, es el género con mayor abundancia de especies y se considera el género más grande de invertebrados marinos con más de 500 especies descritas (Dutertre et al., 2016), estas pueden ser clasificadas con pruebas moleculares donde se utilizan principalmente genes mitocondriales como citocromo C o por los dientes radulares que a pesar de ser similares morfológicamente (Paredes et al., 2010), presentan ornamentaciones y tamaños lo suficientemente distintos para poder diferenciar el tipo de alimentación y la especie.

Los caracoles *Conus* se caracterizan por ser depredadores carnívoros nocturnos, sin embargo, presentan la desventaja de poseer una movilidad y velocidad de desplazamiento muy reducida por lo que poseen aparatos venenosos complejos (Figura 1) que sintetizan péptidos que utilizan como método de defensa y para inmovilizar para sus presas (Olivera, 2002), el aparato venenoso actúa en conjunto ya que el bulbo se encarga de impulsar los componentes bioactivos que son sintetizados por las células epiteliales del conducto venenoso lo que permite que un diente en forma de arpón se cargue de veneno dentro del saco radular para después ser impulsado por la probóscide y de esta manera atacar a su presa. Las toxinas que son inyectadas a la presa tienen la capacidad de afectar el sistema nervioso y dejar a la presa paralizada, en algunos casos se ha visto que, cuando la presa es paralizada, esta es ingerida por completo por la boca del organismo (se puede expandir para poder ingerir al organismo completo) (Safavi-hemami et al., 2010; Olivera, 2002).

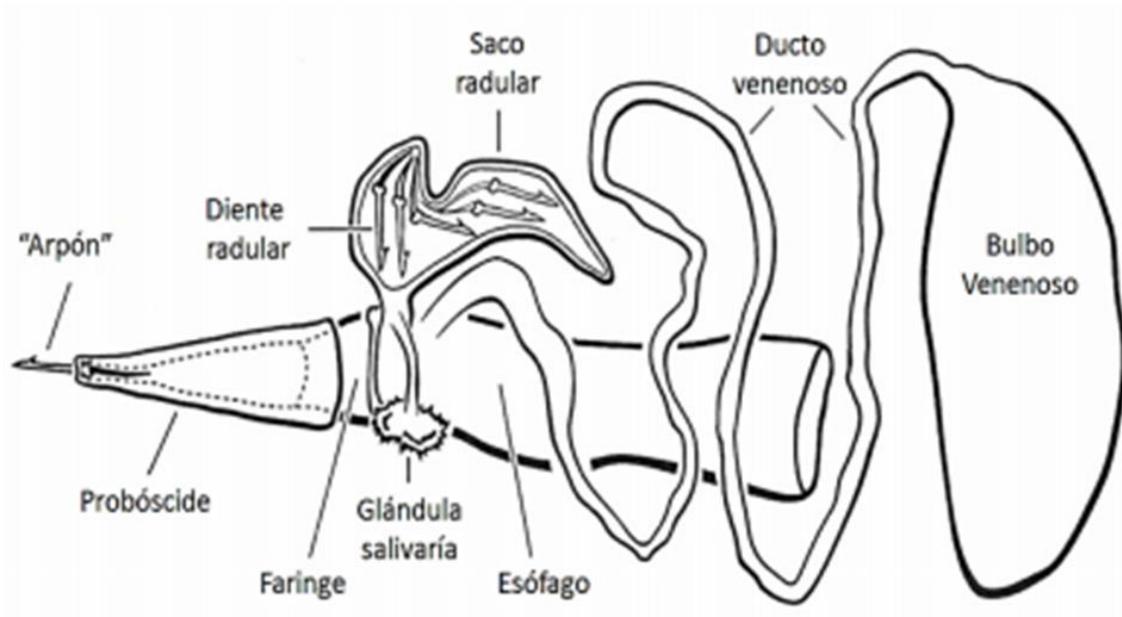


Figura 1. Estructura anatómica general del aparato venenoso de caracol marino del género *Conus* (modificada de Olivera, 2002).

II.1.2. Anatomía del aparato venenoso

La anatomía del aparato venenoso se ha determinado por observación directa de muestras en fresco y por medio de cortes histológicos (Marshall et al., 2002). Para analizar un tejido por medio de cortes histológicos se debe de disectar el organismo con el fin de obtener la región específica que se desea observar, esta debe de pasar por un proceso de fijación, deshidratación, inclusión en parafina y tinción (García-López et al., 2007). Los colorantes frecuentemente utilizados en el proceso de tinción son el azul de toluidina, (Gorrostieta-hurtado et al., 2013), el azul de metileno (Marshall et al., 2002) y la Hematoxilina-Eosina (García-López et al., 2007), lo anterior permite observar la composición celular de los tejidos de las regiones del aparato venenoso.

A partir de la implementación de estos métodos, se ha determinado que el bulbo tiene una función relacionada con el transporte del veneno ya que actúa como una bomba peristáltica, esto se puede inferir debido a que el bulbo presenta distintas capas de musculatura de tejido conjuntivo con fibras de colágeno desordenadas en forma de red similar a las observadas en calamares y otros animales que realizan contracciones de su manto muscular para la expulsión de material mediante rápidas contracciones, esto permite transportar el veneno por el conducto y en dirección a la rádula para ser expulsado (Safavi-hemami et al., 2010). El conducto venenoso está constituido por tejido conectivo, epitelio columnar con glándulas unicelulares y gránulos proteicos los cuales cambian en cuanto a tamaño y abundancia según la región del conducto debido a que en la región del conducto proximal al bulbo se observan gránulos proteicos (Gorrostieta-hurtado et al., 2013) en menor cantidad que es regiones cercanas al esófago o saco radular (Marshall et al., 2002), se cree que estos gránulos están relacionados con la producción y secreción de conopéptidos y conotoxinas por lo que esta sección del aparato venenoso se ha definido como la estructura de biosíntesis de las toxinas. Otra estructura que comprende el aparato venenoso es el saco radular, este consta de un brazo largo el cual contiene un gran número de dientes radulares en distintas etapas de maduración y un brazo corto que se encarga de almacenar los dientes radulares maduros y listos para ser utilizados (Dutertre et al., 2014). Al comparar morfológicamente el conducto venenoso con el saco radular se pueden observar similitudes que indican que los dientes radulares están precargados con compuestos peptídicos antes de ser pasados a la probóscide para su uso (Marshall et al., 2002). El diente radular o rádula tiene una forma de arpón y una función de aguja hipodérmica para introducir el veneno (Olivera, 2002), cuando la probóscide toca un organismo causa que sus músculos se relajen para después atacar con la rádula la cual es propulsada por presión generada dentro del bulbo.

II.2. Veneno de *Conus*

II.2.1. Estructura bioquímica del veneno de *Conus*

El veneno sintetizado por caracoles marinos del género *Conus* está constituido por diferentes péptidos a los que se les ha denominado como conotoxinas o conopéptidos, estos péptidos pueden estar formados, en su mayoría, de 12 a 30 aminoácidos (López-Vera et al., 2006), por esta razón, se considera que los péptidos de *Conus* son pequeños comparados con otras toxinas polipeptídicas de otros organismos con alrededor de 40-80 aminoácidos, es importante mencionar que se han reportado secuencias de 8 (Kass et al., 2010) hasta 110 aminoácidos de longitud como es en el caso de la toxina CR-1 de la especie *Conus regularis* (Román-Gonzales, 2017). Una de las características del veneno de los caracoles *Conus* es que cuenta con la presencia de varios residuos del aminoácido cisteína (Cys) en su estructura primaria lo cual permite la formación de enlaces disulfuro dentro de la molécula, proporcionándole así una alta estabilidad y conformación, los enlaces disulfuro están presentes en patrones definidos según el arreglo de Cys, esta característica ayuda a clasificar a los péptidos de acuerdo con estos patrones. Debido a la diversidad y variedad de péptidos que son expresados, se estima una cantidad de alrededor de 100,000 posibles conotoxinas las cuales pueden ser organizadas en familias y superfamilias según su secuencia y blanco molecular específico, (Olivera, 2002) el número de conotoxinas varía de 50 a 200 por especie (Kaas et al., 2010).

II.2.2. Conotoxinas y conopéptidos

Las toxinas de caracoles marinos del género *Conus* se dividen en dos grandes grupos, a partir de la cantidad de puentes disulfuro que poseen, los péptidos pobres en puentes disulfuro son aquellos que contienen uno o ningún puente disulfuro y los péptidos ricos en puentes disulfuro contienen más de uno. Los péptidos pobres en puentes disulfuro se dividen en ocho grupos y a estos se les denomina conopéptidos, los cuales, son clasificados según nomenclatura propuesta

en 1985 (Craig et al., 1999) (Halai y Craik., 2009) donde se categorizan los péptidos en superfamilias según su secuencia y en familias farmacológicas tomando en cuenta el blanco molecular con el que interactúan y el efecto de la toxina sobre este blanco (Halai y Craik et al., 2009). Los péptidos ricos en puentes disulfuro se denominan conotoxinas, este es un grupo muy amplio y el de mayor interés. Las conotoxinas presentan una nomenclatura particular y se utiliza una letra griega para indicar la familia farmacológica a la que pertenece, una o dos letras que indican de que especie fue obtenida por primera vez y un número romano para indicar el arreglo de cisteína que presentan en la región del péptido maduro, sin embargo, estas reglas de nomenclatura están en constante cambio (Kaas et al., 2010). La clasificación de las conotoxinas en superfamilias se basa en la secuencia conservada en el propéptido y el arreglo de cisteína en la región del péptido maduro, en algunos casos también se toma en cuenta el blanco farmacológico del péptido, la mayoría de los péptidos de *Conus* que han sido caracterizados poseen dos o tres puentes disulfuro (Olivera, 2002), con algunos casos de hasta 8 puentes disulfuro.

II.2.3. Síntesis del veneno

Los precursores de conotoxinas están formados de aproximadamente 60 a 90 aminoácidos y poseen tres regiones definidas : una secuencia señal en el N-terminal, una región intermedia propéptido y una región de péptido maduro (Aguilar et al., 2012), dichas regiones poseen diferentes niveles de conservación, por ejemplo, la secuencia señal N-terminal es la más conservada, la región propéptido es un poco divergente y la región del péptido maduro es la región con mayor nivel de variedad lo cual que favorece a la diversidad funcional de los péptidos (Olivera, 1997). La región señal N-terminal está conformada de aproximadamente veinte aminoácidos (Olivera y Cruz, 2001) y uno o dos residuos de cisteína a diferencia de la región de propéptido intermedia conformada por un número variable de aminoácidos mientras que la región del péptido maduro está conformada por 10 a 30 aminoácidos y no contienen ningún

residuo de cisteína (Olivera, 1997). En algunas superfamilias la secuencia señal, la región pro péptido y la región de la toxina madura están separadas una de la otra por intrones, donde los intrones pueden modular los eventos de replicación y recombinación (Olivera y Cruz, 2001; Kaas et al., 2010) y estas conotoxinas se expresan inicialmente como precursores de pre-pro péptidos los cuales pasan por un proceso de traducción para llegar a su forma madura.

Los genes de los conopéptidos son transcritos a mRNA y traducidos a precursores proteicos, estos también pasan por algunos procesos de proteólisis de la secuencia señal, de regiones pro del precursor y pasan por modificaciones postraduccionales para poder llegar a la forma madura final del conopéptido y finalmente tomar su estructura tridimensional (Figura 2). La secuencia precursora proteica del conopéptido puede ser predicha utilizando el mRNA o la secuencia de DNA genómica; los conopéptidos maduros funcionales son producidos de precursores proteicos donde se lleva a cabo la escisión proteolítica de las regiones N- y C-terminal dirigida por la región pro del péptido en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, así como también algunas modificaciones postraduccionales de algunos aminoácidos, los conopéptidos maduros en su estado funcional tienen una longitud de secuencia de 12 a 30 aminoácidos (López-Vera et al., 2006) con una longitud promedio de 26 aminoácidos (Kaas et al., 2010).

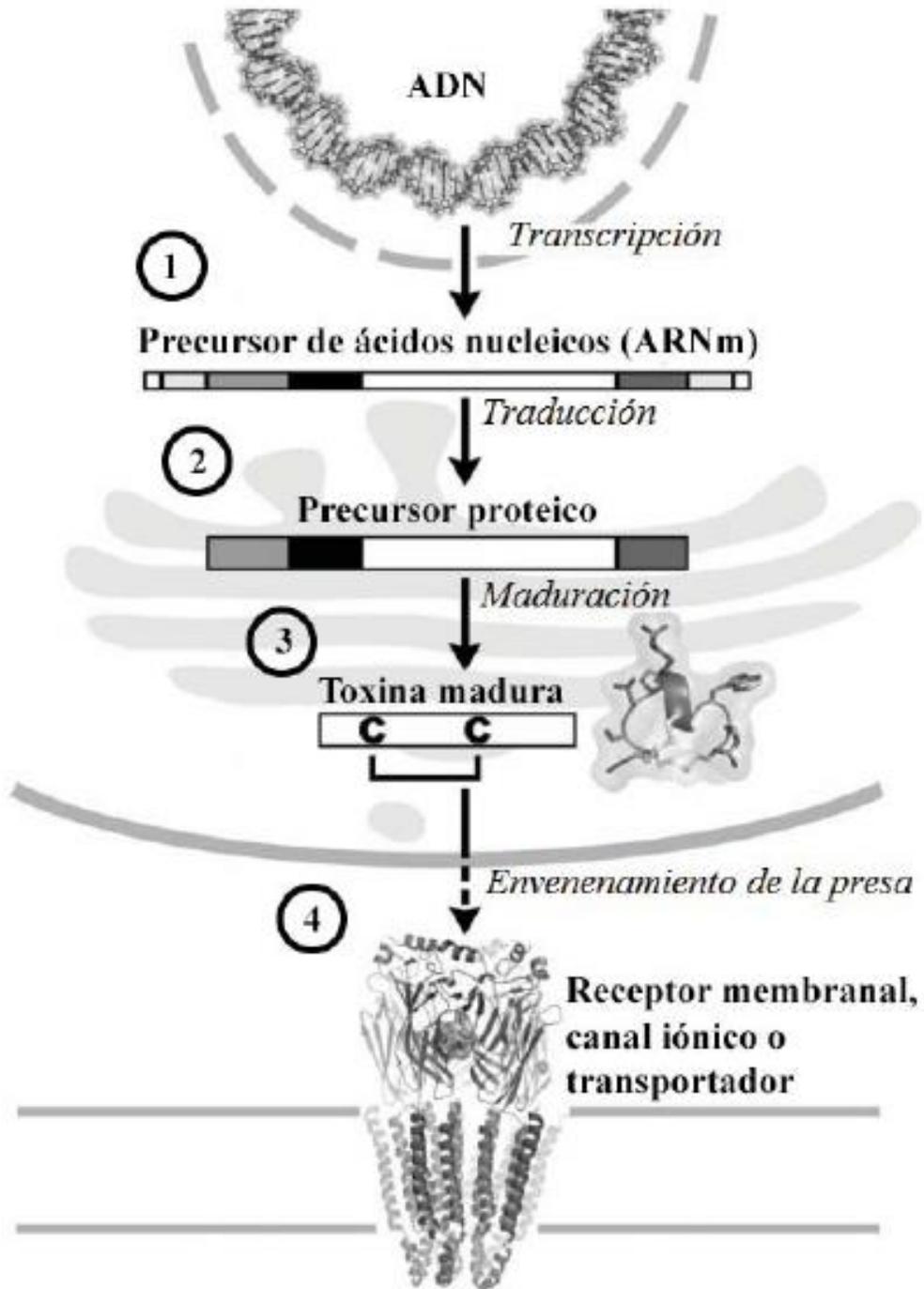


Figura 2. Esquematización del proceso de maduración de un conopéptido. (Modificada de Kass, 2010).

II.2.4. Modificaciones postraduccionales

Las conotoxinas del caracol marino *Conus* presentan alta similitud entre sí en las secuencias señal del N- terminal, sin embargo, entre las regiones no conservadas se presenta una alta tasa de mutación y una gran cantidad de modificaciones postraduccionales, lo cual, se traduce en una alta diversidad entre estas regiones de péptido maduro (Aguilar et al., 2013; Kass et al., 2010; Wu et al., 2013). Las modificaciones postraduccionales son llevadas a cabo por maquinarias enzimáticas altamente especializadas que reconocen la secuencia señal, en la región pro-péptido del N-terminal del precursor peptídico, para así indicar a las enzimas específicas el tipo de modificación que se llevara a cabo y que residuos de aminoácidos de la región de la toxina madura tienen que ser modificados, para así generar diversos tipos de modificaciones postraduccionales (Kass et al 2010) (Figura 3). Las modificaciones postraduccionales más comunes en los conopéptidos y conotoxinas es la formación de enlaces disulfuro y la amidación de la región C-terminal, además existen otros tipos de modificaciones como la conversión de glutamato a γ -carboxiglutamato, hidroxilación de prolina a 4-hidroxiprolina, la bromación de triptófano y la isomerización de triptófano (Craig et al., 1999; Kaas et al., 2010). En algunos casos los conopéptidos o conotoxinas presentan pocas modificaciones postraduccionales, sin embargo, también se pueden presentar diversas modificaciones, pero en la mayoría de los casos los conopéptidos o conotoxinas altamente modificadas son los más pequeños (Buczek et al., 2005) aunque la función de estas modificaciones no es clara, se cree que puede facilitar el plegamiento o aumentar la afinidad y especificidad del péptido hacia sus blancos moleculares (Kaas et al., 2010).

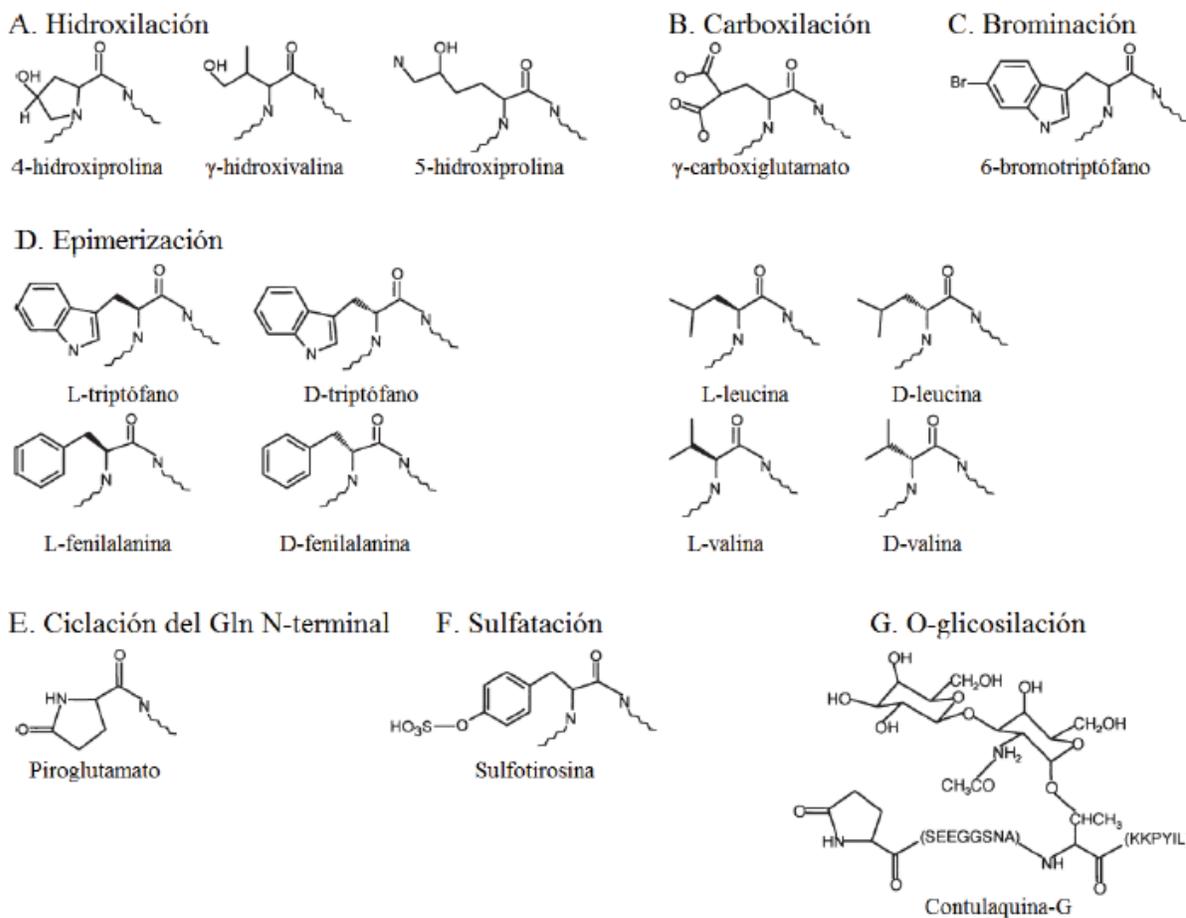


Figura 3. Diferentes modificaciones postraduccionales de aminoácidos en péptidos sintetizados con caracoles marinos del género *Conus* (Modificada de Buczek, et al., 2005).

II.2.5. Farmacología y fisiología

La biología y la historia evolutiva de los caracoles del género *Conus* han provocado la generación de péptidos con una bioquímica y fisiología particular, es decir, estos caracoles marinos inyectan una gran cantidad de conopeptidos y conotoxinas altamente específicos a través de un diente radular (Olivera, 1997; Terlau y Olivera, 2004; Halai y Craik, 2009). Se le

conoce como “toxin cabal” al grupo de conopéptidos que actúa de una forma coordinada para llegar a inmovilizar a su presa y se ha observado la presencia de dos tipos de “toxin cabals” en especies piscívoras, el primero llamado “lightning-strike cabal”, el cual causa inmovilización inmediata de la presa, esto es debido al uso de péptidos que inhiben los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje lo que lleva a la despolarización masiva de axones cercanos al sitio de ataque lo que da como resultado un efecto de electrocución sobre la presa; el segundo tipo que se lleva a cabo después del primero en forma consecutiva y este se denomina “motor cabal”, este es más lento pero inhibe totalmente la transmisión neuromuscular, a diferencia de “lightning- strike cabal” estos péptidos actúan en sitios lejos del sitio de ataque e inmovilizan la presa al inhibir los canales presinápticos de Ca^{2+} que controlan la liberación de neurotransmisores, los receptores nicotínicos postsinápticos y los canales de Na^+ que restringen la acción muscular (Terlau y Olivera, 2004)

Las conotoxinas presentan una gran variedad de mecanismos de acción y una alta especificidad hacia sus blancos moleculares por lo que estas se pueden clasificar de acuerdo con su especificidad hacia ciertos blancos moleculares ya sea canales iónicos activados por ligando como son los receptores nicotínicos de acetilcolina o canales iónicos dependientes de voltaje como son los canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ y receptores acoplados a proteínas G (Kaas et al., 2010). Las conotoxinas que bloquean la transmisión sináptica, a través de la inhibición de receptores nicotínicos de acetilcolina de tipo neuronal y muscular se clasifican como α -conotoxinas, las ψ -conotoxinas se caracterizan por ocasionar el retraso o inhibición de la activación de canales de Na^+ activados por voltaje, lo cual genera hiperexcitación eléctrica, y por otro lado las ω -conotoxinas se caracterizan por inhibir canales de Ca^{2+} activados por voltaje, los cuales modulan la liberación de neurotransmisores y causan la contracción muscular (Essack et al., 2012).

II.3. Técnicas Analíticas para el Estudio de Toxinas

II.3.1 Purificación de péptidos por HPLC de fase reversa

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es uno de los métodos más utilizados para el análisis de péptidos por su versatilidad, corto tiempo de análisis y alta resolución (Mant y Hodges, 1996). El uso de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés) involucra separación de moléculas según su hidrofobicidad, esta es una técnica ampliamente utilizada para la purificación de biomoléculas como proteínas debido a que su alta resolución permite separar polipéptidos de secuencias muy similares (Aguilar et al., 1996). El mecanismo por el cual interactúan los polipéptidos con la superficie de fase reversa es importante para entender la separación de polipéptidos por esta técnica, la separación de polipéptidos se debe a la absorción de las moléculas del soluto de la fase móvil en la superficie hidrofóbica de la fase estacionaria la cual actúa como adsorbente, esto se mantiene así, hasta que la concentración del solvente orgánico de la fase móvil es incrementada y cambia la capacidad de adsorción de la fase estacionaria (Figura 4) (Carr y Nguyen, 2013).

La separación de los polipéptidos puede ser manipulada por la modificación de la curva de gradiente, temperatura de operación, el modificador iónico o la composición del solvente orgánico y la selectividad cromatográfica la cual puede ser modificada por el cambio de las características de la fase estacionaria para la obtención de las moléculas deseadas, sin embargo, una desventaja del RP-HPLC es que se puede provocar la desnaturalización de algunas proteínas, lo que provoca una disminución en la tasa de recuperación del material biológico en su forma activa (Carr y Nguyen, 2013).

La técnica de cromatografía de fase reversa ha permitido determinar una amplia diversidad de péptidos en el bulbo, conducto y saco radular del aparato venenoso de caracoles marinos del género *Conus* y la diversidad de péptidos encontradas específicamente en el conducto que se relaciona con la biosíntesis peptídica (Gorrostieta et al. 2013). Esta técnica también se ha utilizado para mostrar diferencias en el método de obtención de veneno ya que si

este es obtenido por disección o por ordeña del organismo vivo influye en la abundancia, diversidad y tipos de péptidos obtenidos (Biass et al. 2015).

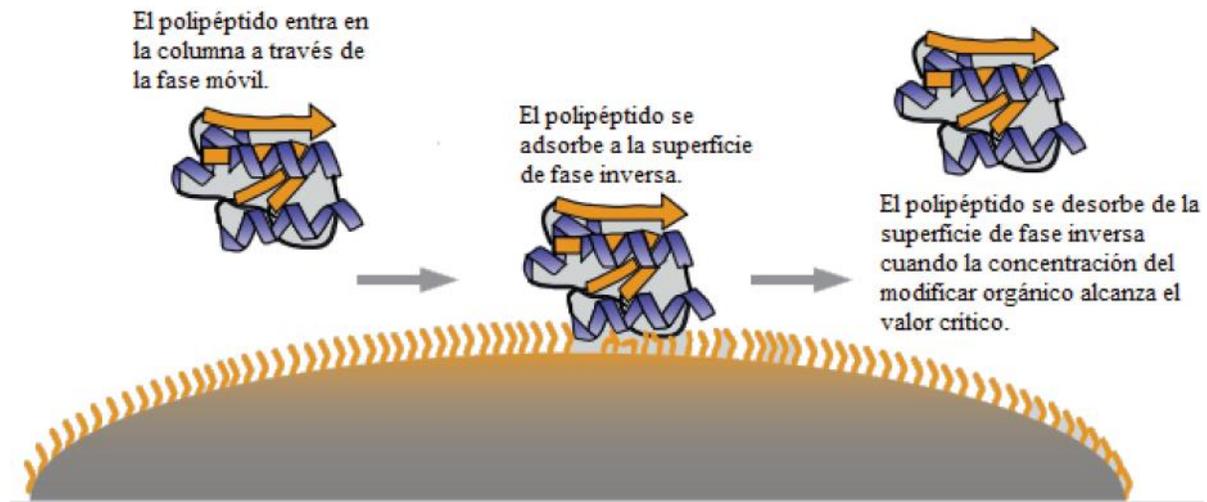


Figura 4. Proceso que ocurre durante la elución de un componente en RP-HPLC. (Modificada de Carr y Nguyen, 2013).

II.3.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se utiliza para la identificación y caracterización de biomoléculas, es fundamental en el análisis de péptidos y proteínas ya que este instrumento permite determinar la estructura primaria y masa molecular de una muestra o un analito (Abián y Gay, 2008). En el análisis por espectrometría de masas se utilizan principalmente péptidos individuales o puros para identificar sus características. La espectrometría de masas tiene tres componentes principales: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector de iones, cada uno de estos componentes tiene una función particular: la fuente de iones tiene la función de convertir el analito en partículas gaseosas cargadas (iones), estos iones formados viajan a través de un campo eléctrico hacia el analizador de iones, el cual los separa según su relación masa/carga

(m/z) y, finalmente, el detector de iones registra la carga inducida por el impacto de cada uno de los iones en el detector (Twyman, 2014).

En estudios de proteómica se utiliza ampliamente la cromatografía líquida de alta resolución acoplada con un espectrómetro de masas (LC-MS/MS), este es un método analítico que combina la capacidad de separación de la cromatografía líquida con la capacidad de detección de la masa molecular de la espectrometría de masas lo que permite la identificación, caracterización y cuantificación de los componentes de una muestra (Rodríguez et al., 2015). Para crear compatibilidad entre la cromatografía líquida y el espectrómetro de masas se tiene una interfase que transfiere los componentes ya separados por la columna de cromatografía líquida hacia la fuente de iones del espectrómetro de masas (Vogeser et al., 2007).

La espectrometría de masas se ha utilizado ampliamente en el estudio del veneno de los caracoles marinos del género *Conus* por su capacidad de diferenciar péptidos por sus masas lo que ha llevado a la identificación de nuevos péptidos (Vianna-Braga et al., 2013), en donde, se ha observado una diferencia entre pre-pro-péptidos y péptidos maduros y se ha demostrado la diferencia entre los péptidos encontrados en el veneno obtenido por disección y péptidos obtenidos por ordeña de estos organismos vivos (Biass et al., 2015).

II.3.3. Secuenciación de Péptidos

La secuenciación determina la estructura primaria de un péptido o de una proteína que este aislada y pura (Twyman, 2014). Una de las técnicas más utilizada para determinar la secuencia a partir del amino terminal en péptidos y proteínas es por el método de degradación de Edman, para este tipo de secuenciación se requiere el reactivo de Edman (fenilisotiocianato o PITC), este reacciona con el aminoácido del extremo N-terminal de un polipéptido en condiciones alcalinas para la formación de feniltricarbamilo (PTC), el producto obtenido se trata con TFA lo cual corta el residuo N-terminal y genera un derivado de tiazolinona, se utiliza un solvente

orgánico para convertir la tiazolinona-aminoácido al derivado de feniltiohidantoina (PTH) para después ser identificado por métodos cromatográficos (Jollès y Jörnvall, 2013). El método de secuenciación por degradación de Edman es utilizado en péptidos de 10 a 50 residuos de aminoácidos, si se utiliza para la secuenciación de proteínas mayores a 50 residuos de aminoácidos la degradación ya no es eficiente por lo que la proteína se debe de fraccionar en segmentos más pequeños para que se pueda llevar a cabo (Twyman, 2014).

El método de degradación de Edman se utiliza en estudios del género *Conus* para la identificación y caracterización de los péptidos encontrados en el veneno, utilizando la secuencia del amino terminal se ha logrado determinar nuevas secuencias peptídicas de péptidos con posible actividad terapéutica aislados del veneno de estos caracoles marinos (Vianna-Braga et al., 2013).

II.3.4. Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias es una herramienta necesaria para el análisis de secuencias de péptidos y proteínas, este análisis compara dos o más secuencias para inferir relaciones entre secuencias, estas pueden tener relaciones estructurales, funcionales o evolutivas (Nguyen et al., 2016). La alineación múltiple se utiliza para detectar homologías y residuos de aminoácidos altamente conservados y también puede predecir su plegamiento para la creación de modelos estructurales. Existen diferentes tipos de métodos bioinformáticos que se pueden utilizar para el alineamiento de secuencias, estos utilizan diferentes parámetros y algoritmos dependiendo de lo que se desea analizar (Lambert et al., 2015).

Con el uso del alineamiento de secuencias para comparar los péptidos aislados obtenidos del veneno de caracoles marinos del género *Conus*, se puede predecir si estos presentan alguna actividad biológica, sus posibles blancos moleculares, y su posible correlación con alguna

familia de conotoxinas o conopéptidos a la que pertenecen (Biass et al., 2015; Vianna-Bargas et al., 2013; Puillandre et al., 2008).

II.4. Características Generales de la Especie *Conus (Conasprella) ximenes*

El caracol marino *Conus (Conasprella) ximenes* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Gastropoda

Subclase: Caenogastropoda

Orden: Neogastropoda

Superfamilia: Conoidea

Familia: Conidae

Género: *Conus*

Especie: *C. ximenes*

La especie *Conus (Conasprella) ximenes* fue descrita por Gray en 1839 (Figura 5). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el Golfo de California, Panamá, las islas Galápagos y Provincias del Guayas, Ecuador hacia Sechura, Perú. Estos organismos habitan en el infralitoral areno-fangoso y se han observado especies hasta los 91.4 metros de profundidad (Paredes et al., 2010). Su descripción se basa en su concha, esta presenta una longitud promedio de 48.4 mm y un diámetro promedio de 23.1 mm. La concha es lisa con una serie de manchas horizontales pequeñas de una forma cuadrada o rectangular de color café oscuro desde el espiral hasta la

punta final de la concha, la punta final de la concha es blanca con algunas bandas irregulares oscuras. El interior es de un color lavanda pálido. Presenta siete surcos espirales y espaciados que van desde el labio columelar al borde del labio externo, su espiral es un poco cóncava y mide aproximadamente la cuarta parte de la longitud del resto de la concha terminando en hombros no carenados (Paredes et al., 2010).



Figura 5. Fotografía de *Conus (Conasprella) ximenes*.

III. JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de toxinas peptídicas con propiedades bioactivas de caracoles marinos del género *Conus* ha permitido el desarrollo de la investigación de los diversos tipos de interacciones que existen entre los receptores neuronales. Esto ha proporcionado información prometedora para la industria farmacéutica en el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Actualmente en México se conocen alrededor de 50 especies del género *Conus*, de las cuales pueden poseer alrededor de 50 a 200 conotoxinas por especie. Por lo anterior, es de suma importancia explorar este campo ya que además de aportar información para el entendimiento de esta especie, podría aportar al descubrimiento de nuevos fármacos y a la investigación del funcionamiento de las interacciones neuronales.

IV. HIPÓTESIS

Se ha mostrado evidencia de la biosíntesis del veneno de caracoles marinos del género *Conus* en el conducto venenoso y una diferencia en la composición peptídica según la sección del conducto venenoso, por lo tanto, al analizar el conducto venoso de *Conus (Conasprella) ximenes* se obtendrá una diferencia peptídica en las distintas regiones del conducto analizado.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Determinar las diferencias en la composición peptídica de las tres regiones del conducto venenoso del caracol marino *Conus (Conasprella) ximenes*.

V.2. Objetivos Específicos

- Realizar un perfil cromatográfico mediante el empleo de HPLC en fase reversa de las distintas secciones del conducto venenoso de *Conus (Conasprella) ximenes*.
- Determinar diferencias significativas entre los péptidos más abundantes obtenidos por HPLC de fase reversa en las distintas secciones del conducto venenoso de *Conus (Conasprella) ximenes*.
- Determinar la masa molecular de los péptidos encontrados en el extracto de las distintas secciones del conducto venenoso de *Conus (Conasprella) ximenes*.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Colecta del Material Biológico

Se colectaron 15 organismos de la especie *Conus (Conasprella) ximenes* durante el mes de abril 2019 de forma aleatoria en Puerto Peñasco, Sonora, México. El área de estudio se encuentra localizada en la costa noroccidental del estado de Sonora, en la parte norte del Golfo de California entre Bahía la Choya y Playa Encanto (localidad señalada por un punto rojo) entre las coordenadas 31° 19' 33" N y los 113 36' 41" W y los 31° 17' 36" N y 113° 31' 32" W (Figura 6). El clima del área de estudio es seco semicalido con escasas lluvias durante los meses de octubre a diciembre y la precipitación media anual de 60.1 mm y temperatura media anual de 21.2° C, Puerto Peñasco se caracteriza por presentar zonas intermareales rocosas y áreas arenosas; el régimen de mareas de esta área presenta mareas bajas de hasta -1.5 metros (Mateo-Cid et al., 2006). Los organismos fueron colectados en áreas arenosas en periodos de marea baja en la zona intermareal. Posteriormente fueron etiquetados y trasladados en hielo al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) ubicado en Hermosillo, Sonora, México. En el laboratorio, los caracoles fueron identificados utilizando claves dicotómicas de Keen (1971) y Brusca et al (2003).

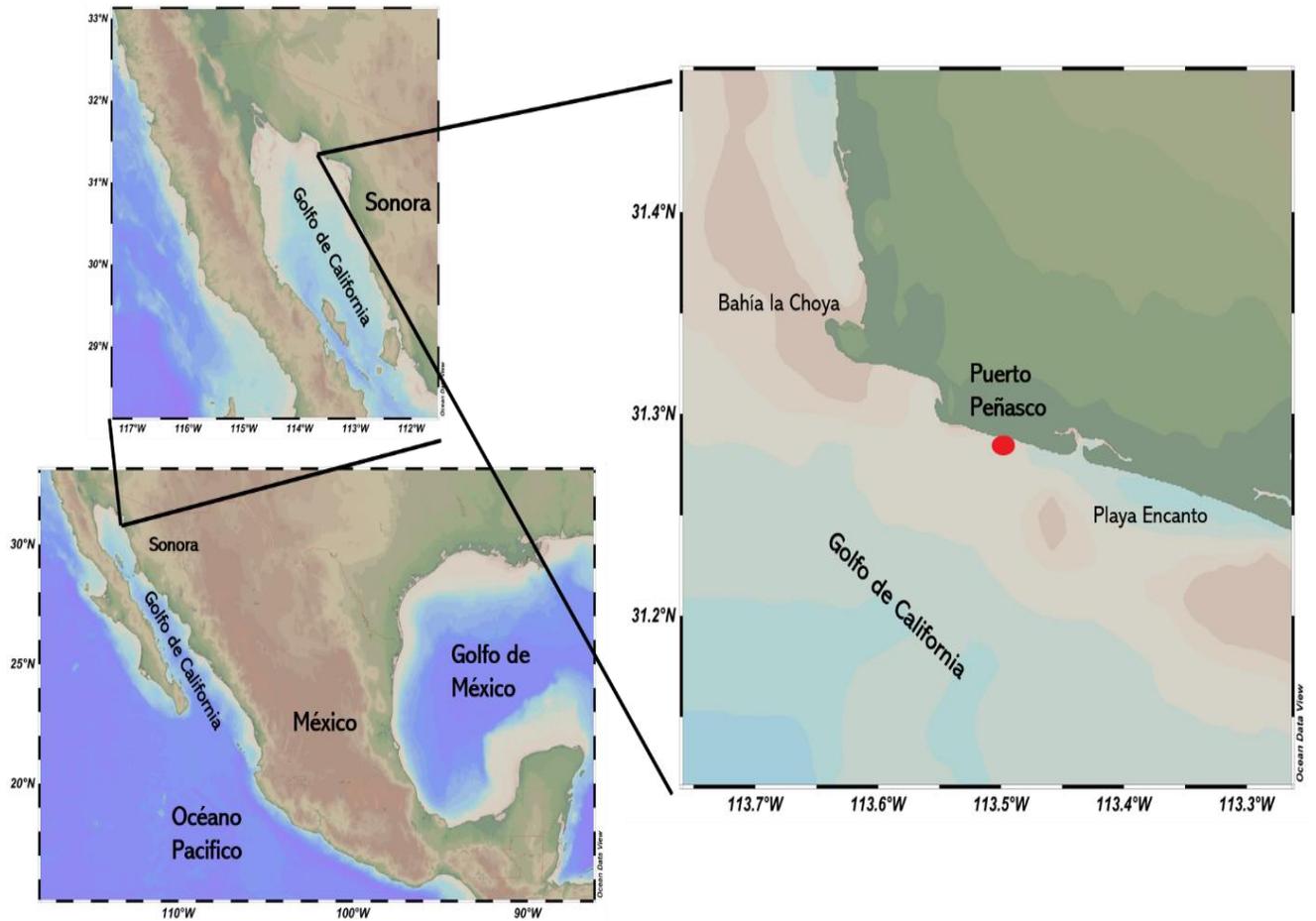


Figura 6. Área de colecta en Puerto Peñasco, Sonora, México.

VI.2. Disección del Aparato Venenoso

El cuerpo del caracol se extrajo mediante centrifugación o de forma mecánica con ayuda de pinzas de disección, se realizaron movimientos suaves para asegurar la extracción del organismo completo. Posteriormente por medio de disección se obtuvo el aparato venenoso completo utilizando un estereoscopio (CARL ZEISS Stemi 305) para realizar un corte con precisión. El aparato venenoso fue seccionado para aislar el conducto, este se fraccionó en tres secciones:

conducto proximal (más cercano al bulbo), conducto medio y conducto distal (más lejano al bulbo).

VI.3. Extracción de Veneno y Determinación de Peso Seco

Se realizó una extracción acuosa con agua desionizada de cada una de las tres secciones del conducto, para la extracción, se trituraron en un mortero las muestras con hielo seco para facilitar el proceso de trituración, posteriormente las muestras fueron centrifugadas (centrifuga Biofuge primo R Heraeus) a 19065 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se colocó en un tubo eppendorf de peso conocido. El sobrenadante obtenido de la extracción fue secado en un concentrador al vacío (SpeedVac Savant ISS110 de Thermo Scientific) y por diferencia de pesos se determinó el peso seco.

VI.4. Cuantificación del Veneno

La cuantificación del veneno se realizó mediante el empleo de un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Lite de Thermo Scientific) partir del método para cuantificación de proteínas con BSA como estándar, a una longitud de onda de 280 nm. Las tres extracciones se re-suspendieron en 20 µl de agua desionizada y se tomaron 5 µl para su cuantificación por Nanodrop.

VI.5. Análisis por HPLC de Fase Reversa

Para el análisis peptídico de las muestras se realizó una cromatografía de fase reversa (HPLC Shimadzu con detectores SPD-20A utilizando el software LCSolution). Los eluyentes empleados para estos experimentos fueron A (agua desionizada al 0.1% de TFA) y B (acetonitrilo al 0.1% de TFA). Todas las muestras fueron llevadas a la misma concentración de 705 $\mu\text{g/ml}$ y fueron sometidas a una separación por una columna analítica C-18 (Synchronis C-18 Thermo Scientific, 3 x 250 mm, 5 μm tamaño de partícula) a temperatura ambiente, con un gradiente lineal de 0 al 60% de acetonitrilo al 0.1% de TFA en 120 minutos (Figura 7) a un flujo de 0.5 ml/min.

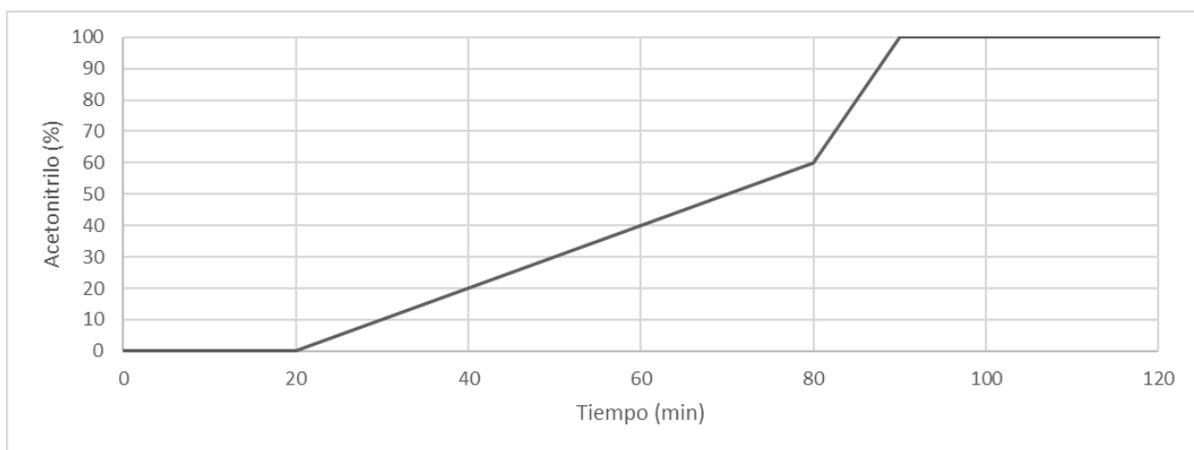


Figura 7. Gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo al 0.1% de TFA en 120 minutos utilizado para el análisis por RP-HPLC.

VI.5.1. Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un análisis exploratorio de datos y se realizaron las pruebas de normalidad y homocedasticidad de varianza para así definir la prueba estadística que se utilizaría (paramétrica

y no paramétrica). Para determinar si se presentaron diferencias significativas en total del área bajo la curva de las fracciones de cada una de las regiones, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y diagramas de caja y bigote. Los análisis se realizaron con los softwares NCSS 2007 y STATISTICA 10.0. Para determinar si el área bajo la curva de cada fracción individual y el tiempo de retención eran distintos en cada región del conducto, se realizó un análisis de escalonamiento multidimensional no métrico (NMDS) validado con una prueba de ANOSIM y un Cluster (Clarke, 1993), mediante el software PRIMER6.

IV.6. Determinación de Masas por Espectrometría de Masa

La determinación de las masas moleculares se realizó en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) (Bruker Microflex). Se analizaron los componentes de las tres regiones del conducto (proximal, media y distal). Se utilizaron como matrices los ácidos orgánicos ácidos sinapínico (SA) para la región distal y α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) para las regiones proximal y media a una relación 5:1 (matriz: muestra), esto fue depositado en placas de acero inoxidable a temperatura ambiente hasta ser evaporadas completamente para la formación de cristales. La duración, intensidad y número de pulsos aplicados se ajustaron dependiendo de la matriz y de la facilidad de ionización de la muestra. Los espectros obtenidos como resultados se analizaron en un programa llamado mMass 5.5.0.

VII. RESULTADOS

VII.1. Características Morfológicas de los Organismos

De acuerdo con las características descritas en la literatura los organismos fueron identificados como *Conus (Conasprella) ximenes* (Figura 8). Se midieron las conchas de los 15 organismos de los cuales se obtuvo un promedio de 3.8 cm de longitud y 1.7 cm de diámetro (Tabla I). Estos fueron removidos de su concha obteniendo el cuerpo blando (Figura 9) para la obtención de su aparato venenoso a partir del cual se aisló el conducto venenoso y se seccionó en región proximal, media y distal (Figura 10).



Figura 8. Organismos obtenidos de la especie *Conus ximenes* colectados en Puerto Peñasco, Sonora, México.

Tabla I- Estadística descriptiva de las medidas de los individuos colectados de la especie *Conus ximenes*.

	Promedio (cm)	Desv. Est.	Máximo	Mínimo
Longitud	3.827	0.281	4.4	3.5
Diámetro	1.767	0.123	2	1.6



Figura 9. Fotografía del cuerpo blando de la especie *Conus ximenes*,

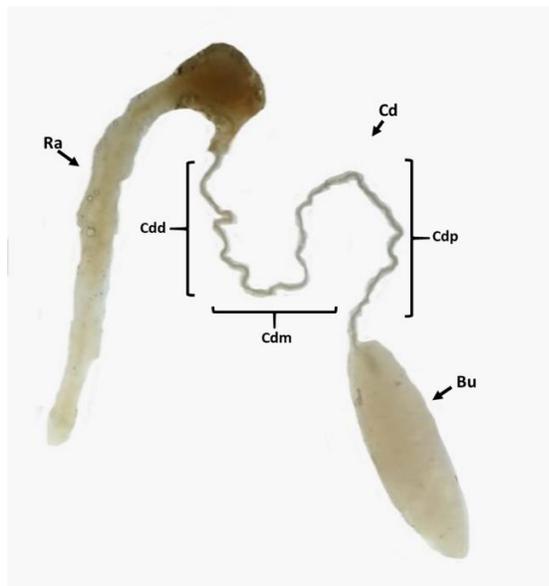


Figura 10. Fotografía del aparato venenoso de la especie *Conus ximenes*. Bulbo (Bu), conducto (Cd) dividido en proximal (cdp), medio (cdm) y distal (cdd) y una rádula (Ra).

VII.2. Cuantificación del Veneno

A cada sección del conducto venenoso se le realizó una extracción para obtener el peso seco de cada muestra, como se puede observar en la tabla II, los valores de peso seco más altos fueron obtenidos de la extracción de la región media del conducto (2.4 mg) al igual que en concentración de proteína (6311.74 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla III). La concentración más baja fue la de la región proximal (705.19 $\mu\text{g/ml}$) por lo que todas las muestras fueron llevadas a esa concentración a los análisis posteriores.

Tabla II- Peso seco de cada una de las secciones del conducto venenoso.

Región proximal	Región media	Región distal
2.3 mg	2.4 mg	2 mg

Tabla III- Valores obtenidos por cuantificación en Nanodrop a una longitud de onda de 280 nm.

Región del conducto	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
Proximal	705.19
Media	6311.74
Distal	5957.38

VII.3. Análisis por HPLC de Fase Reversa

A partir de los cromatogramas obtenidos se eligieron las fracciones mayoritarias con mejor simetría para realizar el análisis estadístico, en el caso de la región proximal se tomaron 16 fracciones (Figura 11), de la región media se tomaron 14 fracciones (Figura 12) y de la región distal 11 fracciones (Figura 13). En los cromatogramas de las distintas regiones se observa una diferencia en cuanto a cantidad de picos y tiempos de retención por lo que se propone que no hay una similitud en cuanto contenido peptídico de las tres regiones según su polaridad (Figura 14).

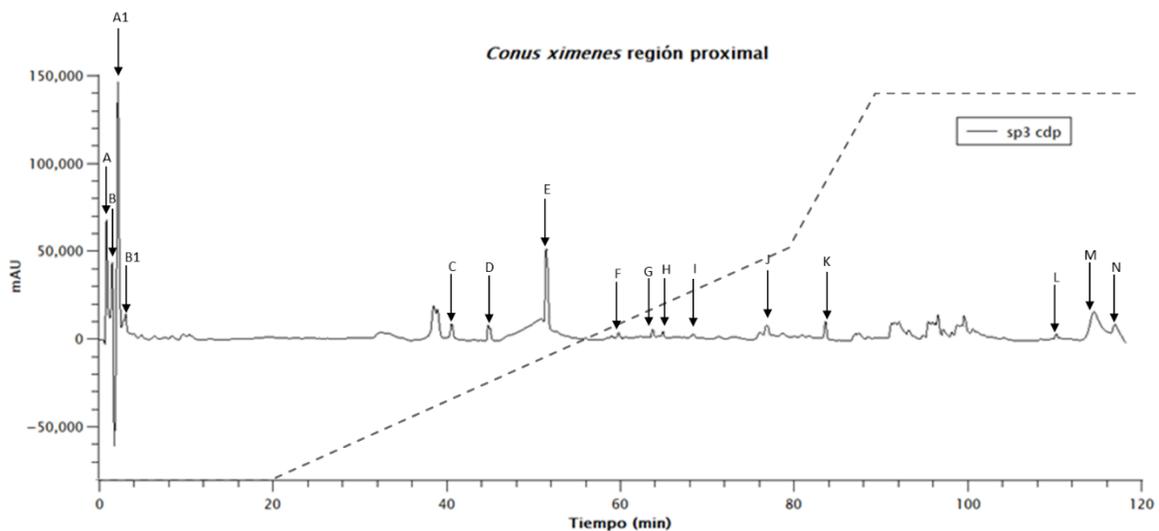


Figura 11. Cromatograma de fase reversa obtenido de la región proximal del conducto venenoso de *Conus ximenes* a una longitud de onda de 220 nm. La línea punteada indica el gradiente utilizado y las flechas indican las 16 fracciones utilizadas para el análisis estadístico.

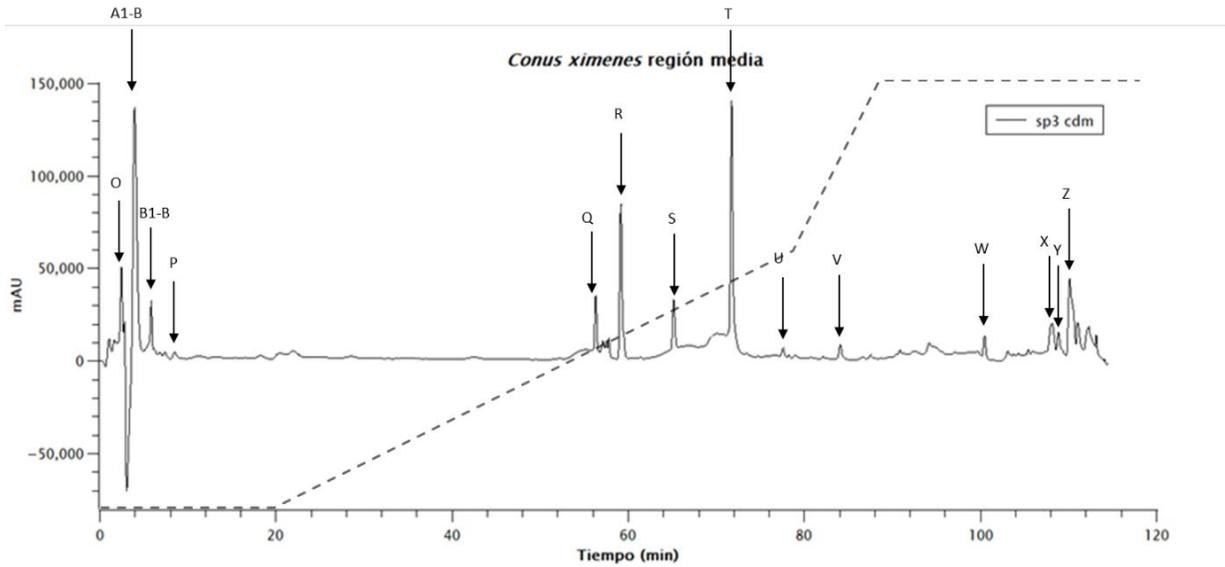


Figura 12. Cromatograma de fase reversa obtenido de la región media del conducto venenoso de *Conus ximenes* a una longitud de onda de 220 nm. La línea punteada indica el gradiente utilizado y las flechas indican las 14 fracciones utilizadas para el análisis estadístico.

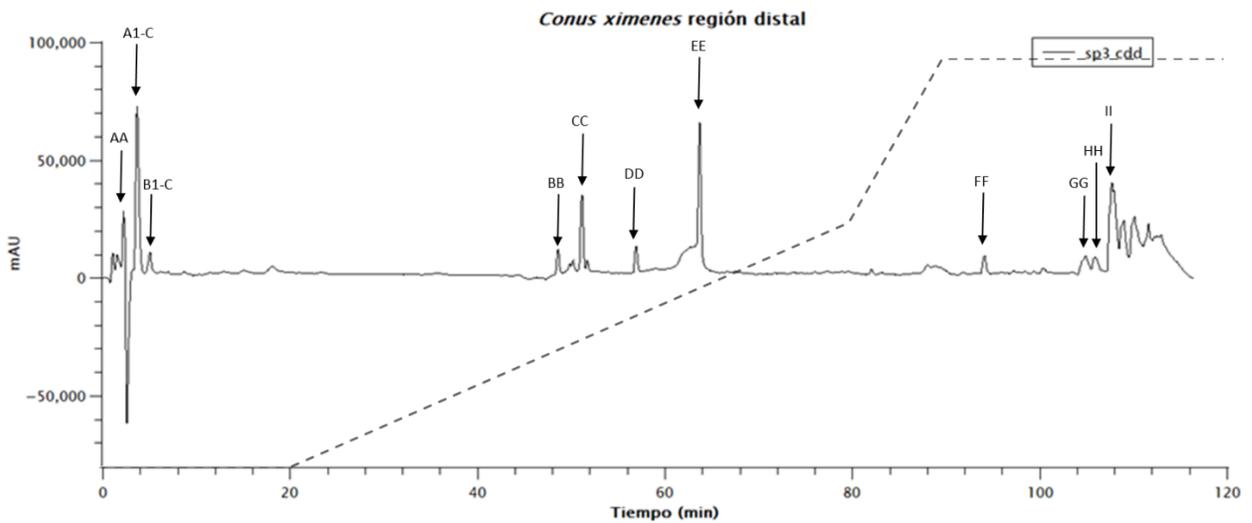


Figura 13. Cromatograma de fase reversa obtenido de la región distal del conducto venenoso de *Conus ximenes* a una longitud de onda de 220 nm. La línea punteada indica el gradiente utilizado y las flechas indican las 11 fracciones utilizadas para el análisis estadístico.

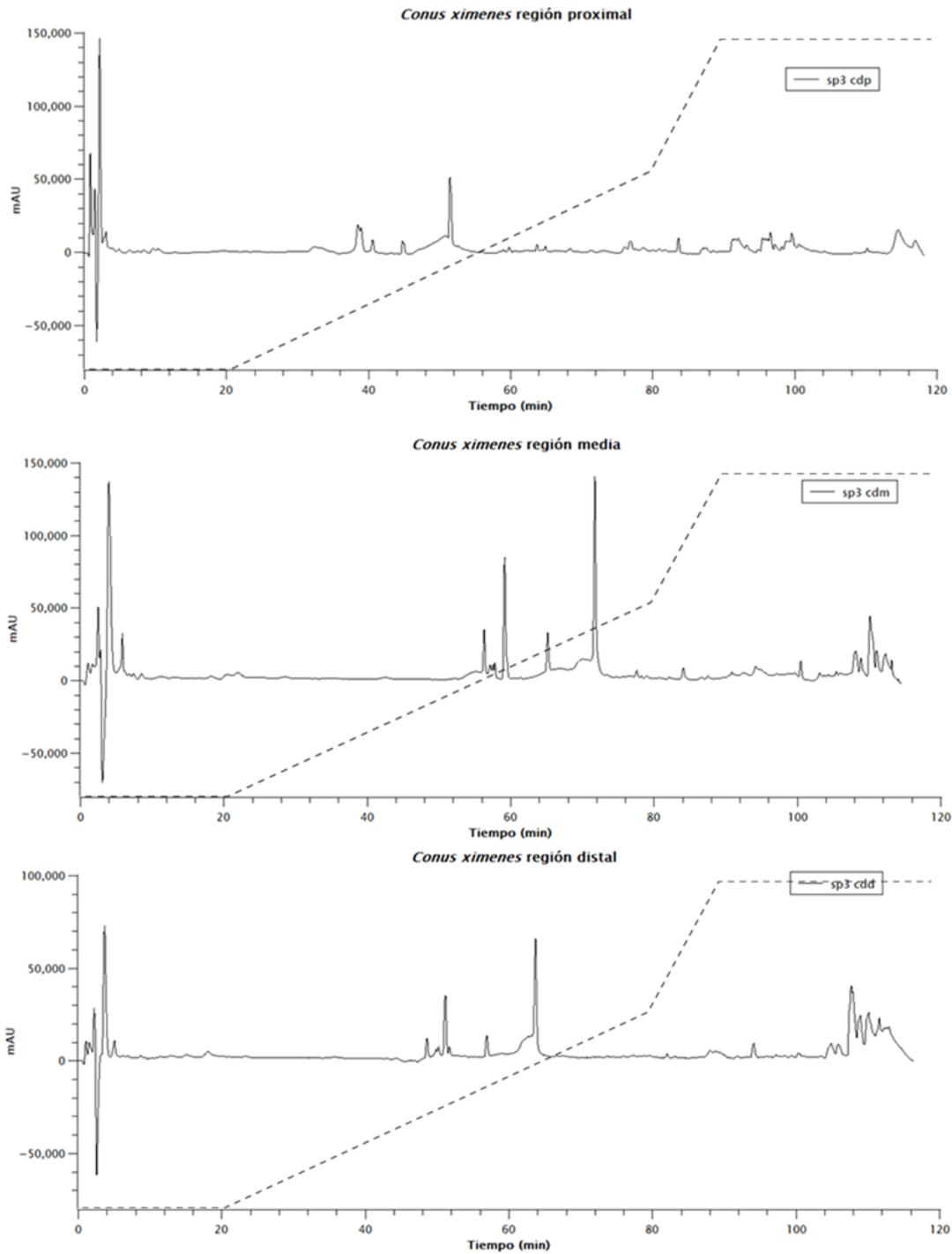


Figura 14. Comparación de los cromatogramas de fase reversa obtenidos de las tres regiones del conducto venenoso (proximal, media y distal) de *Conus ximenes* a una longitud de onda de 220 nm. La línea punteada indica el gradiente cromatográfico.

VII.4. Análisis Estadístico

Se determinó que no existieron diferencias significativas en cuanto al área de cada una de las regiones del conducto venenoso (ANOVA $p=0.2395$) (Tabla IV), sin embargo, en los diagramas de caja y bigote se pudo apreciar un ligero aumento del área bajo la curva en el área proximal en comparación a la media y distal, la región media también presenta un ligero aumento a comparación de la región distal (Figura 15) (Tabla V). Sin embargo, con base en el NMDS se determinó que hay diferencias entre todas las fracciones individuales de cada región (Figura 16) esto fue validado utilizando una prueba ANOSIM (Figura 17 A) y Cluster (Figura 17 B) donde también se muestra que no hay fracciones con área y tiempo de retención similar entre las regiones.

Tabla IV- Resumen estadístico del análisis de varianza entre las tres regiones del conducto.

Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad
8.095054E+11	4.047527E+11	0.07	0.060328
2.038166E+14	5.508558E+12		
2.046261E+14			

Tabla V- Resumen estadístico del área bajo la curva de las tres regiones del conducto venenoso de *Conus xiemenes*.

	Promedio	Desv.Est.	Máximo	Mínimo
Región proximal	2123857.00	1596965.67	5012897.00	71183.00
Región media	1974642	2937465.9	10608928	82967
Región distal	1766710.91	2365148.29	7990854	201940

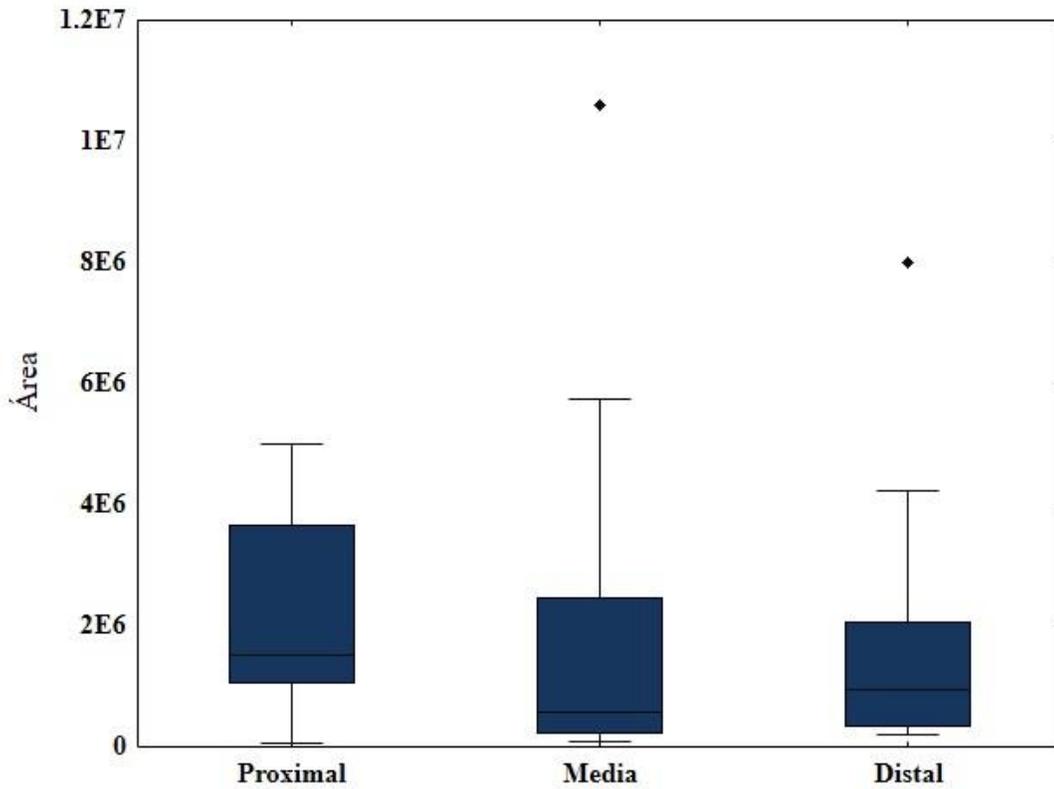


Figura 15. Diagrama de caja y bigote del área total de las fracciones en las tres regiones del conducto venenoso. La caja representa la mediana y el 50% de la dispersión de los datos, los bigotes son el límite de las cotas internas y los casos extraordinarios están representados con un rombo.

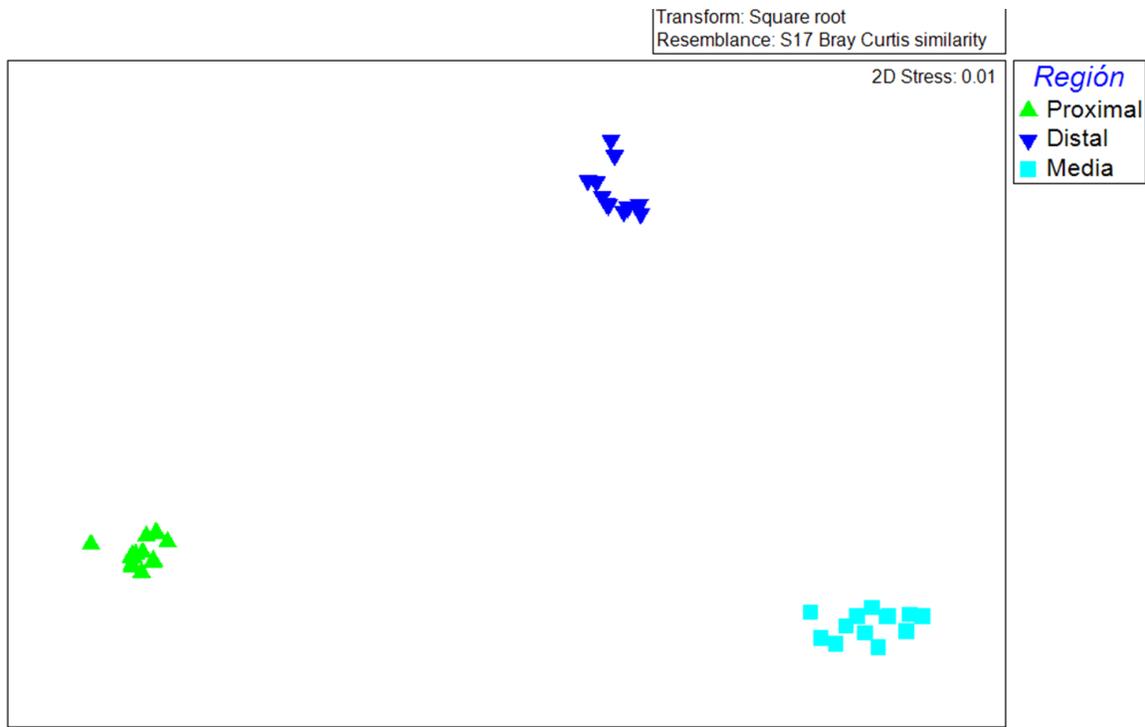


Figura 16. NMDS del área y tiempo de retención de las distintas fracciones encontradas en la región proximal, media y distal del conducto venenoso.

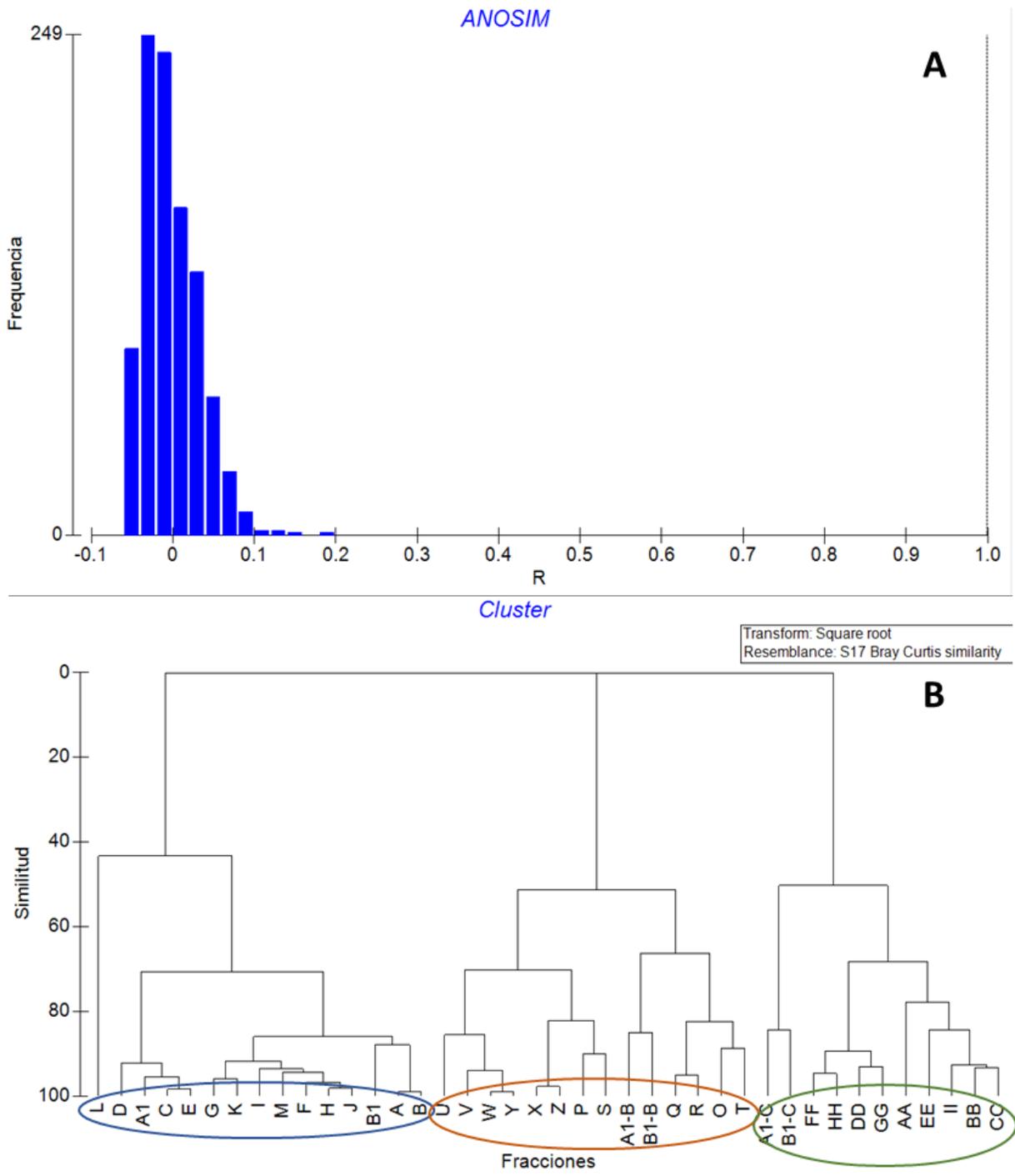


Figura 17. Análisis ANOSIM (A) y Cluster (B) del área y tiempo de retención de las distintas fracciones encontradas en la región proximal (azul), media (naranja) y distal (verde) del conducto.

VII.5. Análisis por Espectrometría de Masas

En los espectros obtenidos por MALDI-TOF se puede apreciar el complejo cóctel de componentes que comprenden el veneno de *Conus ximenes* de la región proximal (Figura 18), media (Figura 19) y distal (Figura 20) cada región mostro una clara diferencia en cuanto a la relación masa/carga de los péptidos presuntivos mayoritarios (Tabla VI), en la Figura 21 donde se muestran los espectros de las tres secciones sobrepuestos se puede observar cómo los valores de masa/carga no coinciden entre la región proximal, media y distal validando que los componentes mayoritarios encontrados en las tres regiones del conducto venenoso no son los mismos.

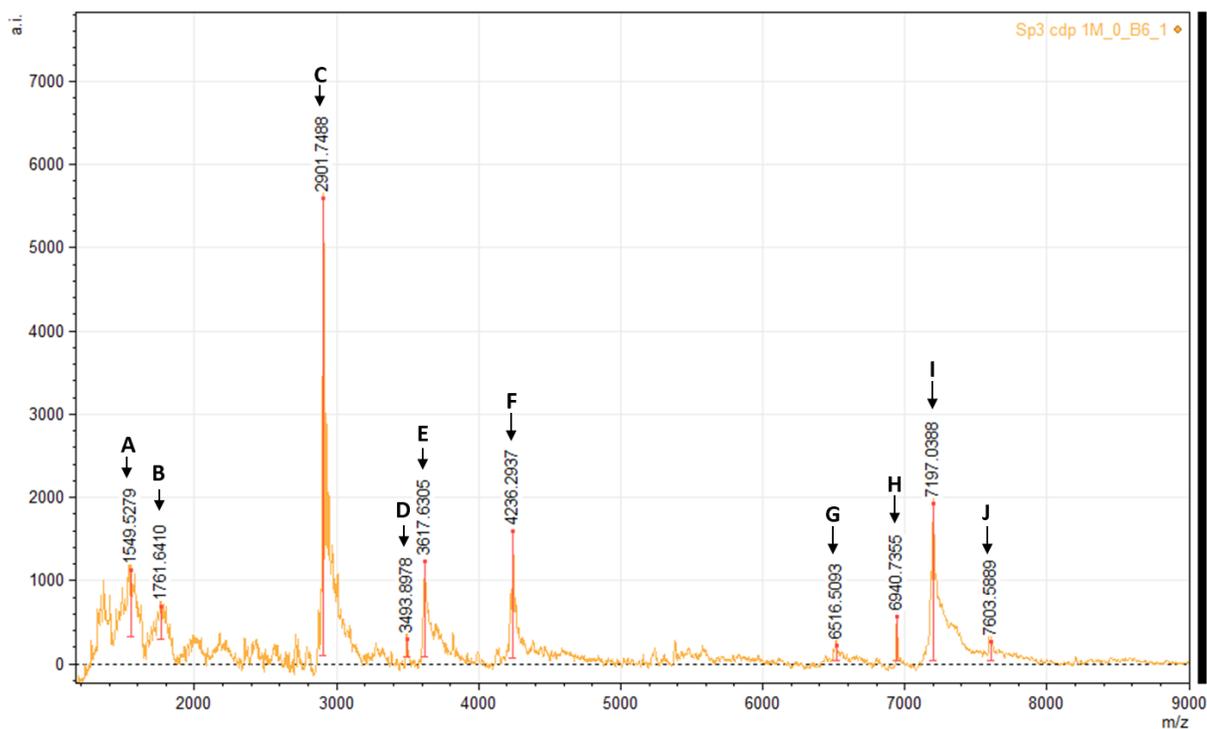


Figura 18. Espectro de masas MALDI-TOF de la región proximal del conducto venenoso donde se utilizó la matriz CHCA a una escala de 0 a 9000 m/z.

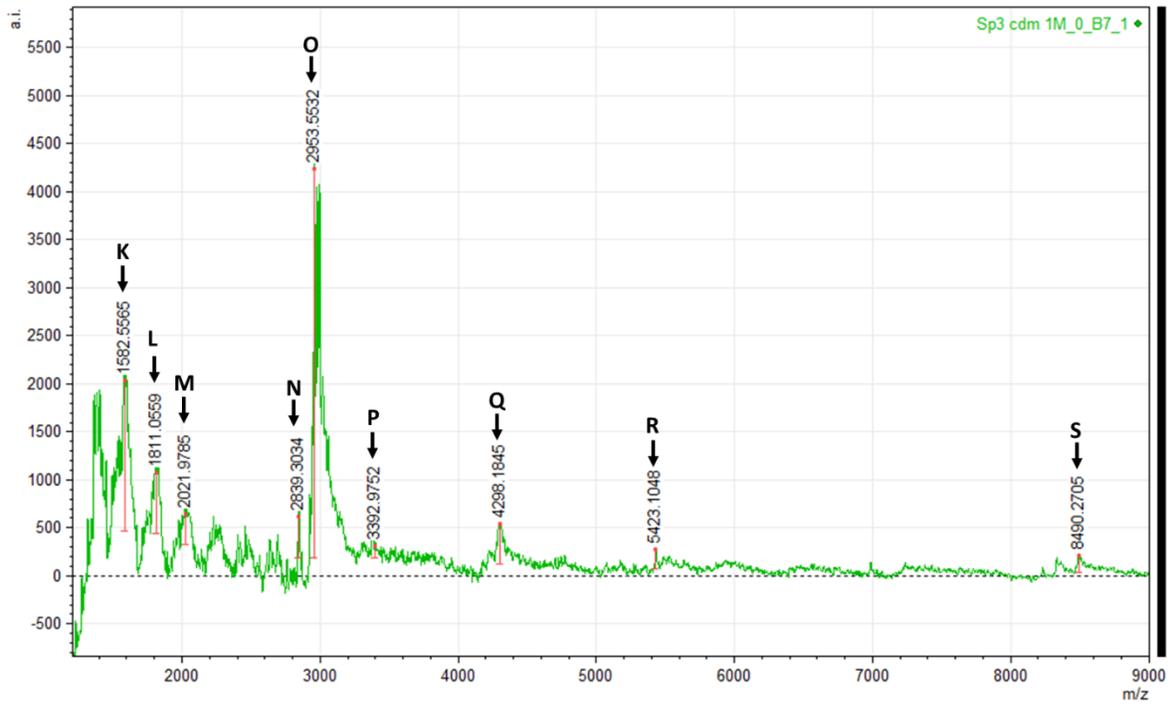


Figura 19. Espectro de masas MALDI-TOF de la región media del conducto venenoso donde se utilizó la matriz CHCA a una escala de 0 a 9000 m/z.

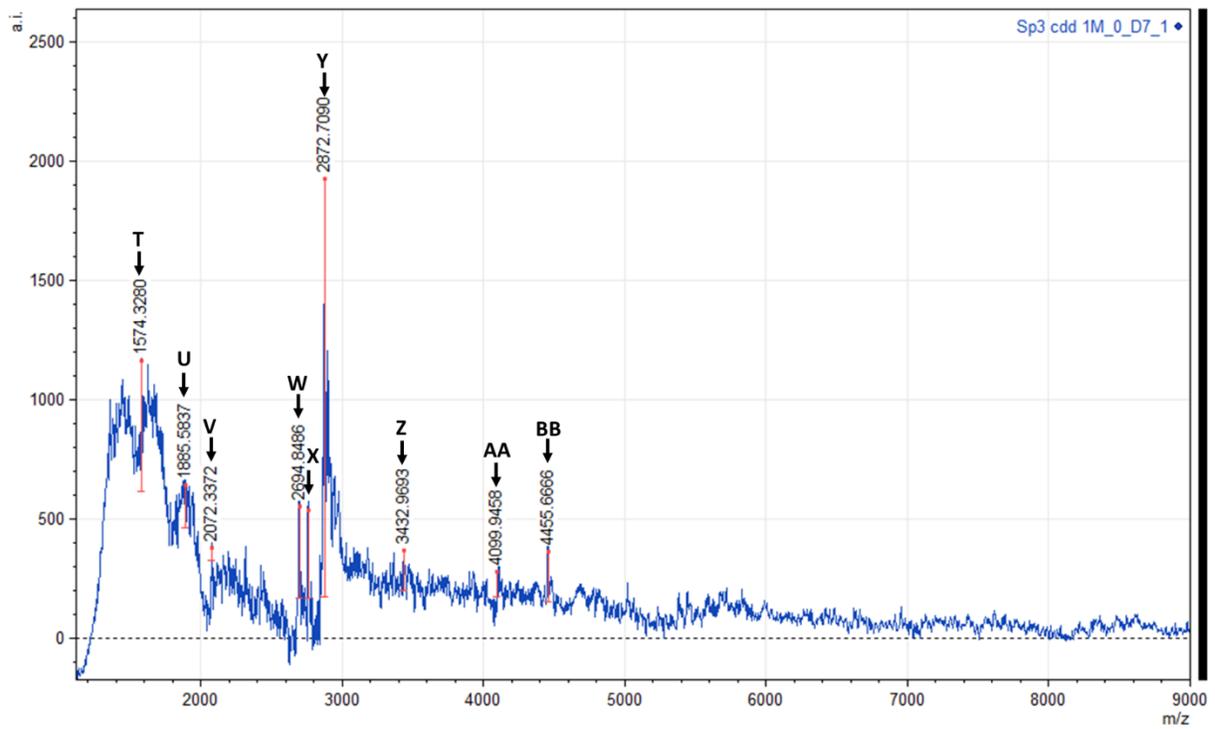


Figura 20. Espectro de masas MALDI-TOF de la región distal del conducto venenoso donde se utilizó la matriz SA a una escala de 0 a 9000 m/z.

Tabla VI- Péptidos presuntivos mostrados en el espectro de masas MALDI-TOF de la región proximal, media y distal del conducto venenoso.

Péptido presuntivo	m/z	Abundancia relativa
A	1549.52	788
B	1761.64	403
C	2901.74	5504
D	3493.89	202
E	3617.63	1143
F	4236.29	1516
G	6516.50	182
H	6940.73	525
I	7197.03	1883
J	7603.58	222
K	1582.55	1577
L	1811.05	636
M	2021.97	324
N	2839.30	434
O	2953.55	4047
P	3392.97	123
Q	4298.18	425
R	5423.10	200
S	8490.27	171
T	1574.32	551
U	1885.58	177
V	2072.33	48
W	2694.84	384
X	2757.09	370
Y	2872.70	1751
Z	3432.96	172
AA	4099.94	108
BB	4455.66	212

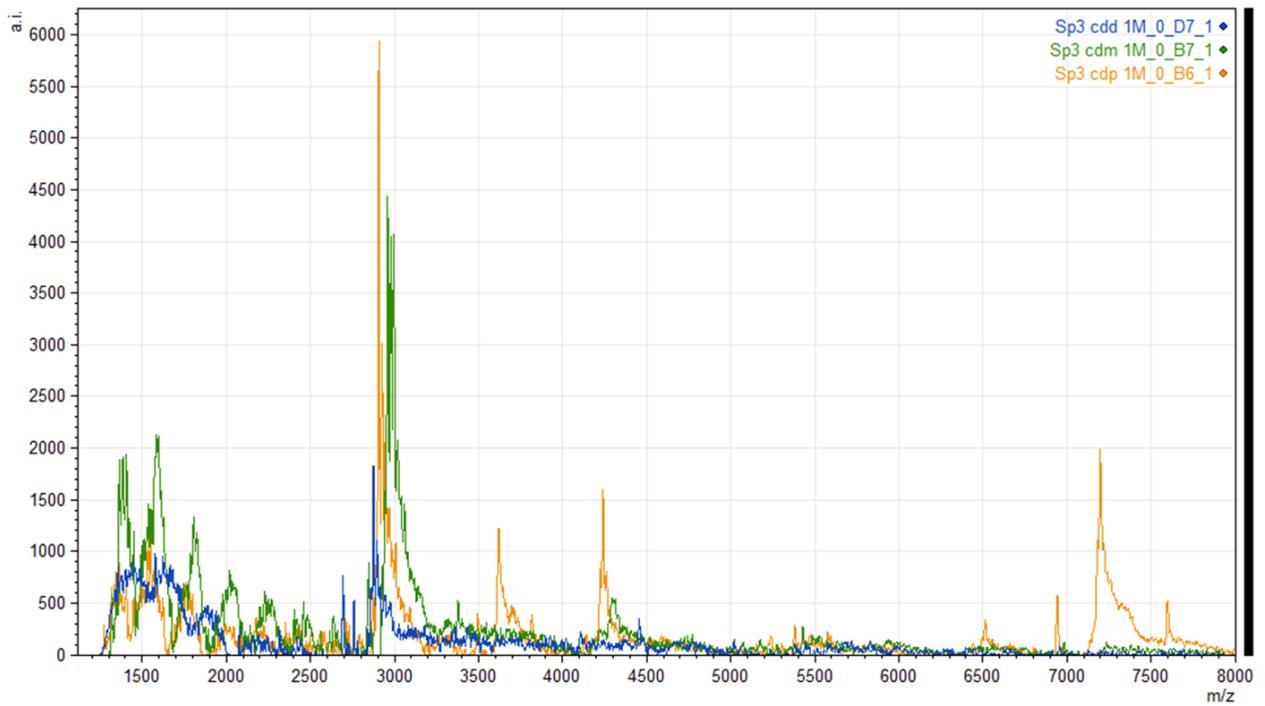


Figura 21. Espectro de MALDI-TOF donde las tres secciones del conducto venenoso fueron sobrepuestas donde el conducto proximal se representa de color naranja (cdp), el conducto medio se representa de color verde (cdm) y el conducto distal de color azul (cdd) a una escala de 0 a 8000 m/z para su comparación.

VIII. DISCUSIÓN

Estudios anteriores han reconocido que la producción de veneno por caracoles del género *Conus* no es homogénea a lo largo del conducto venenoso, diferencias significativas a lo largo del conducto de varias especies del género *Conus* se han determinado mediante el uso de cromatografía en fase reversa y espectrometría de masas (Garret et al., 2005; Tayo et al., 2010; Hu et al., 2012). Estas diferencias se puede apreciar en la especie *Conus (Conasprella) ximenes* al comparar los tres cromatogramas obtenidos de las tres regiones del conducto venenoso ya que presentaron diferencias entre los tiempos de retención de las fracciones, esto fue validado al momento de comparar el área bajo la curva y el tiempo de retención de las fracciones individuales donde a través de un NMDS se determinó la formación de tres grupos completamente separados, lo que confirmó que en las tres regiones no hay fracciones similares en cuanto al área bajo la curva y tiempo de retención. Resultados similares se ha observado en el caso del caracol molusquívoro *Conus textile* donde se determinó que la diversidad de conotoxinas encontradas en las distintas regiones del conducto venenoso no es uniforme debido a que las células secretoras, también llamados gránulos proteicos, localizadas en cada uno de estos segmentos del conducto son especializadas en la expresión y secreción de grupos específicos de conotoxinas lo cual indica una especialización bioquímica en la biosíntesis de conotoxinas (Garret et al., 2005), además análisis histológicos han reportado que estos gránulos van cambiando a lo largo del conducto ya que se ha observado un aumentando en cuanto a cantidad y tamaño conforme la región se acerca al saco radular (Marshall et al., 2002; Edean y Duchemin, 1967) por lo que dichas diferencias también se podrían relacionar a una diferenciación peptídica.

Por otro lado, análisis transcriptómicos y proteómicos han demostrado la regionalización del conducto por la presencia y expresión de genes de conotoxinas específicas. Es estos estudios se obtuvieron espectros diferentes para cada región analizada mediante espectrometría de masas lo que coincide con los espectros obtenidos por MALDI-TOF de las tres regiones del conducto venenoso de *C. ximenes*, donde se apreció una clara diferencia en cuanto a la relación masa/carga de los péptidos presuntivos mayoritarios en cada región. Lo anterior coincidió con los resultados

obtenidos en las especies *C. textile* y *C. geographus* donde, se detectó la presencia de conotoxinas pertenecientes a las superfamilias M y T en la región proximal del conducto de *C. textile* (Garret et al., 2005; Tayo et al., 2010) mientras que en el caso de *C. geographus* se observaron en niveles altos de expresión las conotoxinas pertenecientes a las superfamilias T,J,O3,S,O2 de la región distal (Hu et al., 2012), esto puede indicar diferencias interespecíficas en cuanto a producción de relacionadas a su tipo de alimentación (Terlau y Olivera, 2004), además de indicar una diferencia en cuanto a presencia y abundancia de conotoxinas específicas.

En el caso de la abundancia peptídica de cada región del conducto de *C. ximenes*, la región proximal mostró la mayor cantidad de péptidos presuntivos, es decir, en el caso de la región media y distal a pesar de que los cromatogramas obtenidos son similares, la cantidad de péptidos presuntivos mayoritarios seleccionados fue mayor en el caso de la región media, con 14 fracciones en comparación con las 11 de la región distal. Estas diferencias en abundancia peptídica se han descrito para la especie *C. textile* (Tayo et al., 2010) donde al igual que para la especie *C. ximenes* se encontró un menor número de conotoxinas en la región distal.

Se cree que especialización de estas conotoxinas en las distintas secciones del conducto venenoso como lo observado en *C. ximenes* y las modificaciones post-traduccionales contribuyen a la producción de un coctel de conotoxinas específico según la situación en la que se requiere el veneno, está siendo defensa o para captura de presa (Tayo et al., 2010). Se ha visto que la razón de esta diferenciación entre las regiones del conducto venenoso está relacionada con el uso que se le dará al veneno ya que se cree que los caracoles marinos del género *Conus* tienen una habilidad rápida y reversible de activar la biosíntesis de conotoxinas de diferentes secciones del conducto como respuesta estímulos de defensa o depredación (Dutertre et al., 2014). La presencia de conotoxinas específicas según su uso fue apreciado por primera vez en estudios utilizando el veneno del caracol piscívoro *C. geographus* donde se muestra diferente actividad según la región del conducto, al probar el veneno de la región distal en ratones no se logró apreciar algún efecto, mientras la región proximal mostraba efectos letales causando parálisis muscular (Whyte y Endean, 1962), estas diferencias en cuanto a presencia, abundancia y expresión de conotoxinas específicas a ciertas regiones del conducto se ha mostrado en diferentes especies del género *Conus* (Garret et al., 2005; Tayo et al., 2010; Hu et al., 2012) incluyendo a *C. ximenes* como fue observado en los cromatogramas y los espectros obtenidos por MALDI-TOF. Por medio de análisis proteómicos, en el caso de *C. geographus*, se

encontraron superfamilias de conotoxinas con actividad sobre canales iónicos dependientes de voltaje encontrados en mamíferos en la región proximal y una mayor diversidad de conotoxinas con altos niveles de expresión en la región distal lo cual podría estar relacionado a conotoxinas específicas según la presa (Hu et al., 2012), estas diferencias en cuanto a toxicidad según la región del conducto también se han visto en otras especies como *C. textile* donde se encontraron conotoxinas de mayor toxicidad en la región proximal a comparación con las conotoxinas obtenidas en la región distal (Tayo et al., 2010).

Experimentos electrofisiológicos llevados a cabo con veneno obtenido para depredación de *C. geographus* mostraron que este veneno contenía toxinas específicas al uso para la captura de presas ya que estas tenían una actividad muy baja en canales iónicos de mamíferos mientras que el veneno obtenido como respuesta de defensa contenía altos niveles de conotoxinas paralizantes en estos mismos canales iónicos (Dutertre et al., 2014), con lo observado en estas especies de *Conus* se infiere que en la región proximal se produce el veneno para su uso como defensa y en la región distal se produce veneno utilizando para la captura de presas. Experimentos electrofisiológicos utilizando el veneno de *C. ximenes* podrían mostrar resultados similares debido a que ambas especies presentan componentes específicos a cada región del conducto venenoso. El mecanismo propuesto por los autores indica que el estímulo es detectado de forma mecánica, visual o química lo cual es captado por el ganglio cerebral rodeando el esófago, esto decide la activación de la biosíntesis específica de la región del conducto venenoso ya sea para su uso en la captura de presas (región proximal) o para defensa (región distal) (Dutertre et al., 2014; Dutertre et al., 2016).

En el caso de la especie *Conus (Conasprella) ximenes* se puede definir que los compuestos encontrados en el veneno obtenido de las tres regiones del conducto venenoso (proximal, media y distal) no son los mismos lo cual fue validado con análisis cromatográficos, análisis estadísticos y por espectrometría de masas, estos resultados pudieran indicar la biosíntesis de distintas conotoxinas específicas a cada región del conducto venenoso como se ha observado en *C. textile* y *C. geographus* por cromatografía y espectrometría de masas (Garret et al., 2005; Tayo et al., 2010; Hu et al., 2012). Estas conotoxinas específicas de cada región pueden ser sintetizadas y expresadas por el organismo dependiendo de su uso ya sea como defensa o para la captura de presa como se ha apreciado en las especies *C. geographus* y *C. mamoreus* (Dutertre et al., 2014). Actualmente solo se ha caracterizado un conopeptido de esta especie el cual ha

mostrado actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (Figueroa-Montiel et al., 2018) a bajas concentraciones, este conopéptido pertenece a la superfamilia I1 la cual presenta afinidad hacia canales iónicos dependientes de voltaje de Na⁺. De esta especie también se conoce el transcriptoma completo del veneno total encontrado en el conducto venenoso donde se encontraron secuencias similares a las de otras especies del mismo género a porcentajes de identidad mayores que el 50% (Figueroa-Montiel et al., 2018), el estudio del transcriptoma de las distintas regiones del conducto venenoso se podría utilizar para identificar las conotoxinas o conopéptidos específicos de cada región y su posible uso terapéutico.

IX. CONCLUSIÓN

En conclusión, el caracol marino *Conus (Conasprella) ximenes* presenta una amplia cantidad de compuestos en su veneno como ha sido reportado en otras especies del género *Conus*.

Cada región del conducto venenoso presenta un perfil cromatográfico distinto, que varía en la cantidad y concentración de péptidos presuntivos.

La concentración total de cada región no presenta diferencias significativas, sin embargo, las fracciones individuales son distintas en cada región del conducto, lo que indica una diferencia en la composición peptídica de las tres regiones del conducto de esta especie.

La relación masa/carga de los componentes encontrados en el veneno de *Conus (Conasprella) ximenes* es distinta según la región del conducto venenoso.

Los componentes encontrados a lo largo del conducto venenoso de *Conus (Conasprella) ximenes* son diferentes, esto está posiblemente relacionado a la biosíntesis específica de conotoxinas según la región del conducto venenoso.

X. RECOMENDACIONES/ PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas de crecimiento en cautiverio para posteriormente utilizar la estrategia de “ordeñamiento” para la obtención de veneno constante.
- Realizar análisis histológico de las distintas regiones del conducto venenoso de *Conus (Conasprella) ximenes*.
- Caracterizar péptidos de mayor abundancia y determinar su blanco molecular.
- Realizar análisis de cromatografía acoplada a masas de las distintas regiones del conducto para determinar diferencias en la diversidad de conotoxinas.
- Realizar pruebas electrofisiológicas de corrientes totales en canales de calcio y potasio del veneno de *Conus (Conasprella) ximenes* para observar diferencias en actividad según la región.

XI. LITERATURA CITADA

- Abián, J. y M. Gay. 2008. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica* 2: 16–35.
- Aguilar, M., E. Ortiz, Q. Kaas, E. López-Vera, B. Becerril, L. Possani, y E. de la Cotera. 2013. Precursor De13.1 from *Conus delessertii* defines the novel G gene superfamily. *Peptides* 41(1): 17-20.
- Aguilar, M. I. y M. T. W. Hearn. 1996. High resolution reversed phase high performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Meth. Enzymol* 270(1): 3-26.
- Biaass, D., A. Violette y N. Hulo. 2015. Uncovering Intense Protein Diversification in a Cone Snail Venom Gland Using an Integrative Venomics Approach. *J. Proteome. Research* 14(2): 628-638.
- Buczek, O., G. Bulaj y B. M. Olivera. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell. Mol. Life. Sci.* 62(1): 3067-3079.
- Brusca, R., G. Brusca y N. Haver. 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates. 2da Edición. Sunderland, Massachusetts 453-495 p.
- Bouchet, P., Y. I. Kantor, A. Sysoev y N. Puillandre. 2011. New Operational Classification of the Conoidea (Gasteropoda). *Journal of Molluscan Studies*. 2011(77): 273-308.
- Carr, D. y R. Nguyen. 2013. Protein and peptide analysis and purification, Vydac Reversed phase handbook. GRACE. 5 ed. Maryland, Estados Unidos. 91.
- Craig, A. G., P. Bandyopadhyay y B. M. Olivera. 1999. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *Eur. J. Biochem.* 264(2): 271–275.
- Dutertre S., J. Griffin y R. J. Lewis. 2016. *Phyla Molluska: The Venom Apparatus of Cone*

- Snails. 327-340 p. En: P. Gopalakrishnakone, J. V. Haddad, A. Tubaro, E. Kim y W. Kem (eds.) *Marine and Freshwater Toxins*. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Dutertre, S., A. Jin, I. Vetter, B. Hamilton, K. Sunagar y V. Lavergne. 2014. Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nature Communications* 5(1): 1-9.
- Endean, R., y C. Duchemin. 1967. The venom apparatus of *Conus magus*. *Toxicon* 4(4): 275-284.
- Essack, M., V. B. Bajic y J. A. C. Archer. 2012. Conotoxins that Confer Therapeutic Possibilities. *Mar. Drugs* 10(6): 1244–1265.
- Figuroa-Montiel, A., J. Bernáldez, S. Jiménez, B. Ueberhide, L. González y A. Licea-Navarro. 2018. Antimycobacterial Activity: A New Pharmacological Target for Conotoxins Found in the First Reported Conotoxin from *Conasprella ximenes*. *Toxins* 10(2): 51.
- García-López, A., E. A. Uría-Galicia y E. Ortiz-Ordóñez. 2007. Estudio Histológico de Boca, Esófago, Estómago e Intestino de *Polystira albida* (Gastropoda: Turridae). *Int. J. Morphol* 25(4): 767–774.
- Garrett, J., O. Buczek, M. Watkins, B. Olivera y G. Bulaj. 2005. Biochemical and gene expression analyses of conotoxins in *Conus textile* venom ducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328(1): 362-367.
- Gorrostieta-hurtado, E., A. Falcón-alcantara, L. Palma-tirado, R. Hernandez-matehuala, A. Vuelas-solórzano y E. Michel-morfín. 2013. Descripción anatómica, histológica y cromatográfica del aparato venenoso de *Conus purpurascens*. *Serie Oceanológica* 13: 110–122.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural. *Drug Discovery Today* 8(12): 536–544.
- Halai, R., y D. J. Craik. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 26(4): 526-536.

- Hernández, L., E. López-Vera y M. Aguilar-Ramírez. 2014. El veneno de los caracoles marinos y su paradójico uso médico. *Revista Digital Universitaria* 15(11): 2-11.
- Hu, H., P. Bandyopadhyay, B. Olivera y M. Yandell. 2012. Elucidation of the molecular envenomation strategy of the cone snail *Conus geographus* through transcriptome sequencing of its venom duct. *BMC Genomics* 13(1): 284.
- Jha, R. K., y X. Zi-rong. 2004. Biomedical Compounds from Marine Organisms. *Marine Drugs* 2(3): 123–146.
- Jollès, P., y H. Jörnvall. 2013. *Proteomics in Functional Genomics*. Birkhäuser Basel. Basilea, Suiza. 100-106 p.
- Kaas, Q., J. Westermann y D. J. Craik. 2010. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon* 55(8): 1491–1509.
- Keen, A. 1971. *Seashells of tropical west America*. Stanford University Press. 2da Edición Stanford, California. 660-670.
- Lambert, C., J. V. Campenhout, X. Debolle, E. Depiereux, R. D. Bruxelles y B. Namur. 2015. Review of Common Sequence Alignment Methods: Clues to Enhance Reliability. *Current Genomics* 4(2): 131-146.
- Lewis, R. J., y M. L. García. 2003. Therapeutic potencial of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery* 2(10): 790-802.
- López-Vera, E., M. B. Aguilar, E. P. Heimer de la Cotera. 2006. Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. *Revista Ciencia* 57(3): 47-51.
- Mant, C. T. y R. S. Hodges. 1996. Analysis of peptides by high performance liquid chromatography. *Meth. Enzymol.* 271(1): 3-50.
- Marshall, J., W. P. Kelley, S. S. Rubakhin, J. Bingham, J. V. Sweedler, W. F. Gilly. 2002.

- Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus*. *Bio. Bull* 203(1): 27–41.
- Mateo-Cid, L. E., A. C. Mendoza-González, R. Aguilar-Rosas, y L. E. Aguilar-Rosas. 2006. Algas marinas bentónicas de Puerto Peñasco, Sonora, México. *Hidrobiológica* 16(1): 45-65.
- Nguyen, K., X. Guo, y. Pan. 2016. Multiple Biological Sequence Alignment: Scoring Functions, Algorithms and Evaluation. John Wiley & Sons, Hoboken, Estados Unidos. 1-88 p.
- Olivera, B. M. 1997. *Conus* Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell* 8(11): 2101-2019.
- Olivera, B. M. 2002. *Conus* Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Rev. Ecol. System* 33(1): 25-47.
- Olivera, B. M., y L. J. Cruz. 2001. Conotoxins, in retrospect, *Toxicon* 39(1): 7–14.
- Paredes, C., F. Cardoso, K. Altamirano, P. Baltazar y L. Romero. 2010. The family Conidae from Peruvian Sea La familia Conidae en el mar peruano The family Conidae from Peruvian Sea. *Rev. Peru. Biol.* 17(1): 065-073.
- Puillandre, N., S. Samadi, M. Boisselier, y A. Sysoev. 2008. Starting to unravel the toxoglossan knot: Molecular phylogeny of the Starting to unravel the toxoglossan knot: Molecular phylogeny of the “turrids” (Neogastropoda: Conoidea). *Molecular phylogenetics and evolution* 47(3): 1122-1134.
- Rodriguez, A., S. Dutertre, R. Lewis, y F. Marí. 2015. Intraspecific variations in *Conus purpurascens* injected venom using LC/MALDI-TOF-MS and LC-ESI-TripleTOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(20): 6105-6116.
- Román-González, S. A. 2017. Caracterización Bioquímica y Fisiológica de los componentes del

veneno de *Conus regularis*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

- 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. *Journal of Proteome Research* 2010(9): 5610–5619.
- Tayo, L., B. Lu, L. Cruz y J. Yates. 2010. Proteomic Analysis Provides Insights on Venom Processing in *Conus textile*. *Journal of Proteome Research* 9(5): 2292-2301.
- Terlau, H. y B. M. Olivera. 2004. *Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiological Reviews* 84(1): 41-68.
- Twyman, R. M. 2014. *Principles of Proteomics*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. Nueva York, Estados Unidos.
- Vianna-Braga, M.C., A. Andrade-Nery, H. Ulrich, K. Konno, J. Mozer-Sciani y D. Carvalho-Pimenta. 2013. α -RgIB: A Novel Antagonist Peptide of Neuronal Acetylcholine Receptor Isolated from *Conus regius* Venom. *International Journal of Peptides* 2013: 1–9.
- Vogeser, M., K. G. Parhofer, E. Clin y E. Diabetes. 2007. Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS / MS) – Technique and Applications in Endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007(115): 559–570.
- Whyte, J., y R. Edean. 1962. Pharmacological investigation of the venoms of the marine snails *Conus textile* and *Conus geographus*. *Toxicon* 1(1): 25-31.