



UNIVERSIDAD DEL MAR
Campus Puerto Ángel

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS COMPONENTES
MAYORITARIOS DEL VENENO DE *Conus princeps* Linnaeus,
1758 DEL PACÍFICO SUR MEXICANO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA**

PRESENTA

JOAQUIN LOPEZ CARRILLO

DIRECTOR

DR. ALEXEI FEDOROVISH LICEA NAVARRO

CIUDAD UNIVERSITARIA, PUERTO ÁNGEL, OAXACA, MÉXICO 2019

Dedicatoria

A madre Guadalupe.

Por responder sin falta alguna a un “estamos en problemas”. Gracias por todo tu amor y motivación, sin ti nada de esto sería posible.

A mi padre Joaquín

Por creer en mí y apoyarme durante toda esta trayectoria. Gracias por todas las enseñanzas y valores que has dejado en mí y en mis hermanos.

A mi hermano Antonio.

Por tu apoyo incondicional y por ser un gran ejemplo para mí. Gracias por ser una guía en mi camino.

A mi hermana Diana.

Por todo tu amor y apoyo. Gracias por tu ánimo, buen humor y por ese buen “cafecito” que nunca faltó.

Mi corazón es una ciencia inexacta que a regañadientes pacta con la razón.

Joaquín Sabina

Agradecimientos

A la Dra. Nieves Trujillo Tapia por orientarme en la elección de esta área de investigación y por su apoyo en la iniciación de este proyecto.

Al Dr. Alexei Licea Navarro por darme un lugar en el Departamento de Innovación Biomédica y por su apoyo en la elaboración de este proyecto.

A la M. en C. Samanta Mireya Jiménez Flores por su apoyo y paciencia en la enseñanza de métodos necesarios para la elaboración de este proyecto. Gracias por tu constante ánimo y motivación.

A la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia por su apoyo y por aceptarme desde un inicio en CICESE para la elaboración de mis estancias. Gracias por confiar en mí.

Al M. en C. Fernando Diaz por su apoyo en la parte de espectrometría de masas y por sus consejos para la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Ivonne Santiago Morales y a la M. en C. Yolanda Huante González por ayudarme a mejorar la calidad de mi escrito.

A mis tíos: Maria Carrillo y Albino Fuentes y a mis primas: Miley y Kimberly por estar siempre con nosotros. Gracias por las risas y por cada momento en el que aprendí de ustedes.

A mi madrina Ofelia Maces García y a toda su familia. Gracias por apoyarnos siempre, son parte importante de nuestra familia.

A todos los Carrillos, gracias por enseñarme la importancia de la unión familiar.

A mis amigos: Crista, Sam, Yessica, Israel, Juan Pablo, Polenghi, Uriel, Axel, Christopher, Karla, Yasmín y Bany. Gracias por su amistad, compañía y por todos esos partidos de waterpolo. De cada uno de ustedes me llevo algo, pues aprendí mucho a su lado.

A mis amigos del DIB: Lesly, Daniela, Aurora, Erick, Edith y Alejandra. Gracias por acompañarme durante todo este proyecto y por enseñarme todos esos lugares hermosos de Ensenada. Como les dije antes, los llevo en el corazón.

A mis perros: Chane y Yul y a las mascotas que me acompañaron y regalaron muchos momentos felices: Chito, Marley, Chavela y Mila.

Resumen

Los caracoles del género *Conus* comprenden uno de los grupos de invertebrados marinos más grande, ya que cuenta con aproximadamente 850 especies registradas. Los caracoles cónidos producen un veneno único formado por una variedad de componentes biológicamente activos. El veneno de los cónidos está formado por péptidos con importancia farmacológica, cuyo tamaño va de 10 a 40 aminoácidos y masas moleculares desde 847 a 9, 445 Da. Estructuralmente, las conotoxinas se clasifican con base a: (1) la identidad su péptido señal (superfamilia), (2) patrón o fragmentos de cisteínas en su región madura (familia) y (3) a su blanco molecular (familia farmacológica). Las caracterizaciones del veneno de la especie *Conus princeps* son escasas, por lo que se desconoce la conformación estructural de los péptidos que lo componen. En el presente trabajo se caracterizaron los componentes mayoritarios del veneno de *Conus princeps* del Pacífico Sur mexicano. Se purificaron siete compuestos mayoritarios por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), su masa molecular fue determinada por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (LC-ESI-MS), encontrando masas de 500 a 18, 000 Da. La secuencia peptídica de tres compuestos fue determinada por degradación autónoma de Edman, encontrando tres posibles patrones de cisteínas: I (CC-C-C), VI/VII (C-C-CC-C-C) y XV (C-C-CC-C-C-C-C). Por último, ninguna de las secuencias corresponde a algún conopéptido o conotoxina registrada anteriormente, por lo que puede tratarse de péptidos con interés biomédico.

Palabras clave: *Conus princeps*, conotoxina, conopéptido, cromatografía, espectrometría de masas.

Abstract

The cone snails of genus *Conus* form one of the largest marine invertebrate group. This genus has approximately 850 registered species. The cone snails have a unique venom that is conform by biological active compounds. The venom of this snails it is formed by peptides with pharmacological importance. The size of these peptides it is of 10 to 40 amino acids with molecular masses of 847 to 9,445 Da. The conotoxins are classified in three groups based on: (1) the identity of their signal peptide (superfamily), (2) cysteine framework in the mature region (structural family) and (3) the molecular target (pharmacological family). The characterizations of the venom of *Conus princeps* are really scarce and the structural information of their peptides is unknown yet. For this reason, in the present work the majority compounds of the venom of *Conus princeps* of the South Pacific Mexican are characterized. Seven major compounds were purified by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). The molecular mass it was determined by Liquid Chromatography coupled to Electrospray ionization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) finding masses of 500 to 18,000 Da. Three sequences were obtained by Edman Degradation finding three possible cysteine frameworks: I (CC-C-C), VI/VII (C-C-CC-C-C) and XV (C-C-CC-C-C-C). The sequences obtained have not been previously registered.

Keywords: *Conus princeps*, conotoxins, conopeptides, chromatography, mass spectrometry.

Índice

Resumen	v
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xi
1. Introducción	1
1.1 Generalidades del género <i>Conus</i>	1
1.2 Especie de interés	2
1.3 Generalidades del veneno	3
1.4 Clasificación de los componentes del veneno	4
1.5 Nomenclatura	7
1.6 Modificaciones postraduccionales	8
1.7 Caracterización bioquímica	10
2. Antecedentes	12
3. Justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivo.....	16
6. Objetivos particulares	16
7. Materiales y métodos.....	17
7.1 Área de colecta	17
7.2 Extracción de veneno	18
7.3 Cuantificación total del veneno por peso seco	19

7.4 Purificación del extracto	19
7.5 Repurificación de los componentes mayoritarios	20
7.6 Espectrometría de masas (LC-ESI-MS)	20
7.7 Secuenciación de aminoácidos	21
8. Resultados	22
8.1 Extracción, cuantificación de veneno	22
8.2 Purificación del extracto total	22
8.3 Repurificación de los componentes mayoritarios	23
8.4 Espectrometría de masas	25
8.5 Análisis de secuencias	30
8.5.1 Diferencia de masas	31
8.5.2 Nombramiento de los péptidos	31
9. Discusiones	32
9.1 Purificación del veneno por RP-HPLC	32
9.2 Espectrometría de masas (LC-ESI-MS)	34
9.3 Diferencias de masas	34
9.4 Alineamiento y nombramiento de péptidos	35
9.4.1 CpP23	35
9.4.2 CpP27	36
9.4.3 CpP33	37
10. Conclusiones	40
11. Perspectivas	41
12. Bibliografía	42

Índice de figuras

- Figura 1. Aparato venenoso del género *Conus*. A: Vista general. Tomada y modificada de Norton y Olivera 2006. B: Diente radular. Tomada y modificada de Zugasti 2005. C: Saco Radular. Tomada y modificada de Marsh 1977.....2
- Figura 2. Forma y color de la concha de *Conus princeps*. Tomada de <http://picsr.com>, fotografía de Gabriel Paladino.....3
- Figura 3. Clasificación de conotoxinas y conopéptidos. Tomada y modificada de Akondi *et al.* 2014 y Halai y Craik 2009.5
- Figura 4. Proceso de maduración de la proteína precursora. Tomada y modificada de Kass *et al.* 20106
- Figura 5. Nomenclatura de conotoxinas. Tomada y modificada de Akondi *et al.* 2014.....7
- Figura 6. Diagrama de flujo general de la caracterización del veneno de cónidos. Imágenes tomadas de Prashanth *et al.* 2017, Bernáldez *et al.* 2016 y Norton y Olivera 2006. 10
- Figura 7. Área de colecta. Playa Estacahuite (15° 40'5.57" N, 96° 28'53.61" W), Puerto Ángel, Oaxaca, México. 17
- Figura 8. Proceso para la obtención del extracto crudo. A: Centrifugación del organismo. B: Disección del organismo, donde la zona de corte es la región anterior cercana a la probóscide. C: Obtención del aparato venenoso y sección del conducto. D: Maceración y centrifugación del tejido del conducto. E: Obtención del sobrenadante..... 18
- Figura 9. Cromatograma general obtenido del ET del veneno de *C. princeps*. F: fracción. Flechas: picos mayoritarios seleccionados..... 22
- Figura 10. Cromatogramas de picos mayoritarios. Flechas: picos seleccionados para secuenciación. 24
- Figura 11. TIC y XIC del componente principal detectado de CpP11: A: TIC y A': XIC y CpP22: B: TIC y B': XIC. 26

Figura 12. TIC y XIC del componente principal detectado de CpP23: A: TIC y A': XIC y CpP27: B: TIC y B': XIC.	27
Figura 13. TIC y XIC del componente principal detectado de CpP33: A: TIC y A': XIC y CpP36: B: TIC y B': XIC.	28
Figura 14. TIC y XIC del componente principal detectado de CpP47: A: TIC y A': XIC.	29
Figura 15. Cromatogramas de extracto de veneno de <i>C. princeps</i> colectado en diferentes épocas del año. A: Obtenido en verano (Presente trabajo) y B: obtenido en invierno (Bernáldez <i>et al.</i> 2016). Flechas: picos con tiempo de retención similar.	33
Figura 16. Alineamiento del péptido pi1a con secuencias encontradas en BLAST y ConoPrec.....	36
Figura 17. Alineamiento del péptido CpP27 con secuencias encontradas en BLAST y ConoPrec.....	37
Figura 18. Alineamiento del péptido pi15a con secuencias encontradas en BLAST y ConoPrec.....	38

Índice de tablas

Tabla I. Ejemplos de modificaciones postraduccionales presentes en los péptidos del veneno de los caracoles cónidos. Información tomada de Halai y Craik 2009 y Buczek et al. 2005.	9
Tabla II. Condiciones utilizadas para LC-ESI-MS.	21
Tabla III. Componentes mayoritarios seleccionados y sus datos de recolección.	23
Tabla IV. Datos obtenidos de cada pico recolectado.	25
Tabla V. Masas moleculares obtenidas de los componentes mayoritarios del veneno de <i>C. princeps</i>	25
Tabla VI. Secuencias obtenidas por degradación de Edman.	30
Tabla VII. Comparación de las masas moleculares de los péptidos secuenciados.	30
Tabla VIII. Variables que cambiaron en el presente trabajo con el realizado por Bernáldez <i>et al.</i> (2016).	33
Tabla IX. Información obtenida de los picos caracterizados.	39