



Descripción anatómica, histológica y cromatográfica del aparato venenoso de *Conus purpurascens*

Anatomical, histological and chromatographic description of the venomous apparatus of Conus purpurascens

Eréndira Gorrostieta-Hurtado*, Andrés Falcón-Alcantara*, Lourdes Palma-Tirado**, Rosalina Hernandez-Matehuala***, Alma Vuelas-Solórzano***, Emilio Michel-Morfín****, Victor Landa Jaime****

* Laboratorio de Neurofarmacología Marina. Instituto de Neurobiología (INB). Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Boulevard Juriquilla 3001, C.P. 76230, Querétaro, México.
gorrostieta@gmail.com

** Unidad de Microscopia. INB-UNAM. Boulevard Juriquilla 3001; C.P. 76230, Querétaro, México.

*** Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Circuito Universitario, Las Campanas, Centro, C.P. 76000, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

**** Departamento de Estudios para el Desarrollo Sustentable de Zonas Costeras, Universidad de Guadalajara. Av. Gómez Farías No.82, CP. 48980. San Patricio Melaque, Jalisco, México.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica de la UNAM, por el apoyo económico otorgado al proyecto titulado: "Estudio bioecológico, morfológico y toxinológico de la Superfamilia Toxoglossa (caracoles venenosos) del Pacífico mexicano" clave: IN211611; gracias al cual se realizó este trabajo. Al Dr. Edgar, P. Heimer de la Cotera, por el traslado de los ejemplares y la beca postdoctoral otorgada.

RESUMEN

El veneno de los *Conus* spp. se encuentra en el conducto venenoso, aunque también se ha reportado en el saco radular y bulbo, por lo que se han elaborado hipótesis sobre la presencia y síntesis de veneno en otras regiones del aparato venenoso. Este estudio describe la anatomía, perfil cromatográfico y efecto de la toxina del aparato venenoso de *C. purpurascens*. Se utilizaron técnicas de histología, microscopía electrónica; cromatografía y del polígrafo en electrofisiología. Se observaron gránulos de proteínas en el bulbo, conducto y saco radular. El perfil cromatográfico presentó picos en tiempos de retención similares en cada una de las partes del aparato venenoso incluyendo el conducto. El bioensayo mostró un efecto claro del conducto venenoso. Los resultados obtenidos en éste estudio apoyan la hipótesis de que los dientes ya están cargados de veneno en el saco radular y la posible biosíntesis de veneno en el bulbo, se sugiere la exploración del bulbo y saco radular en los estudios de farmacología.

ABSTRACT

The venom of *Conus* spp. is located in the venomous duct; the venom has also been reported in the radular sac and bulb. Some authors have made assumptions about the presence and synthesis of poison in other regions of the venomous apparatus. This study describes the anatomy, chromatography and effect of *C. purpurascens* venomous apparatus toxin. The techniques used in this study were histology, electron microscopy, chromatography and electrophysiology polygraph. Protein granules were observed in the bulb, duct and radular sac. The chromatographic profile showed peaks with retention times similar in each part of the venomous apparatus. The bioassay showed a clear effect of the venomous duct. The obtained results support the hypothesis that the teeth are already loaded with poison in the radular sac, and possible poison biosynthesis occurs in the bulb. Pharmacology studies are suggested in

the bulb and radular sac.

Palabras clave: Conus, cromatografía, anatomía, bioensayo.

Keywords: Conus, anatomy, chromatography, bioassay.

INTRODUCCION

La descripción actual del aparato venenoso de los caracoles *Conus* spp. considera un bulbo que ayuda a impulsar la toxina; un conducto venenoso en donde se da la producción de toxinas; un saco radular en donde se lleva a cabo la formación de los dientes radulares y un diente radular ubicado en la probóscide para la inyección de la toxina en la captura de su presa (Brusca y Brusca 2006). La extracción de toxinas para estudios farmacológicos la realizan principalmente en el conducto venenoso ó mediante ordeña del caracol, el cual es estimulado para que descargue la toxina (López-Vera *et al.* 2007). A pesar de que algunos autores mencionan que puede existir biosíntesis en el bulbo (Safavi-Hemami *et al.*, 2010) y que los dientes están precargados de toxinas desde el saco radular (Marshall *et al.*, 2002), no se ha realizado un estudio comparativo de las toxinas encontradas en cada una de las partes del aparato venenoso.

El bulbo se ha descrito como una estructura de almacenamiento, producción y/o impulsor de las toxinas. Un estudio reciente realizado por Safavi-Hemami *et al.*, (2010), menciona que la función principal del bulbo es la de realizar movimientos peristálticos, para impulsar la toxina y la biosíntesis de toxinas se realiza a un nivel muy bajo en comparación con el conducto. Histológicamente el epitelio del bulbo es columnar de tipo glandular (Hermitte, 1946) o escamoso simple con células que parecen especializadas en procesos de secreción (Safavi-Hemami *et al.*, 2010). En un estudio de morfogénesis de la glándula de veneno de *Conus lividus*, se observó que durante la formación del bulbo se organizan mioblastos al final del conducto, para formar al menos 2 capas musculares con orientación diferente; también se describe un epitelio interno escamoso (Page, 2012). Los estudios morfológicos del conducto se han realizado en *Conus californicus* que presenta una capa de colágeno y material no celular en el lumen (Marshall *et al.*, 2002) y en *Conus novaehollandiae* que tiene epitelio columnar con gránulos probablemente de toxinas (Safavi-Hemami *et al.*, 2010). El conducto de *Ductoconus princeps* presenta diferentes regiones y el efecto del extracto de proteínas de cada una de ellas en el caracol *Planorbella tenue* puede estar en función de las características bioquímica de las toxinas contenidas en ellas (Gorrostieta *et al.*, 2012). Con respecto al saco radular se ha descrito que contiene los dientes radulares con su ligamento y un material semejante al que está presente en el conducto del veneno, por lo que se ha creado la hipótesis de que los dientes radulares ya están precargados con componentes péptidicos probablemente de veneno (Marshall *et al.*, 2002), este material también se ha observado en el saco radular de *C. purpurascens* (Gorrostieta *et al.*, 2009).

Actualmente se han aislado, secuenciado, sintetizado y clasificado farmacológicamente 15 péptidos de *C. purpurascens*; el 64 % de los trabajos han obtenido la toxina mediante ordeña y el resto del conducto venenoso. Aunque se sabe que existe una continuidad de los péptidos a través del conducto venenoso, diente radular y toxina obtenida mediante ordeña (Moller y Mari, 2010; Chun *et al.*, 2012) ha quedado sin explorar lo que sucede en el saco radular y en el bulbo, en donde posiblemente también exista biosíntesis de toxinas (Hermitte, 1946; Safavi-Hemami *et al.*, 2010). Los péptidos aislados a partir del veneno de *C. purpurascens* muestran que inhiben la transmisión muscular, causando parálisis o un incremento en la excitabilidad de los blancos de canales iónicos (López-Vera *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2012).

La mayoría de los estudios en farmacología de *Conus* se han realizado con el conducto del aparato venenoso. La presencia de sustancias bioactivas en otras partes del aparato venenoso pudiera ser una fuente más para explorar en el área de la farmacología, sin embargo los estudios son escasos o no existen con respecto a la presencia de toxinas, la posible síntesis y efecto de sustancias bioactivas encontradas en cada una de las partes del aparato venenoso, por lo que en éste estudio se plantearon los siguientes objetivos: 1) describir el aparato venenoso, mediante la observación anatómica, histológica e imágenes de microscopía electrónica; 2) comparar los tiempos de retención de posibles proteínas en los perfiles cromatograficos del conducto, saco radular y bulbo; 3) evaluar el efecto de algunas fracciones en la excitabilidad del íleon de cobayo registrada mediante la técnica del polígrafo.

MATERIALES Y METODOS

Recolecta y análisis morfológico

Se recolectaron siete ejemplares de *C. purpurascens* (45.87 ± 2.11 E.S. mm de longitud, 26.48 ± 1.09 E.S. mm de ancho y 20.94 ± 2.78 E.S. g de peso) mediante buceo semiautónomo en Barra de Navidad, Jalisco, México ubicada a los $19^{\circ}11'56.51''$ de latitud norte y $104^{\circ}41'04.54''$ de longitud oeste. Los ejemplares se trasladaron al Laboratorio de Neurofarmacología marina del INB-UNAM ubicado en Querétaro, México. El cuerpo del caracol se extrajo mediante centrifugación 2500-3750 rpm durante 10-15 min. Posteriormente se realizó la disección para obtener y describir el aparato venenoso. El saco radular, anillo del esófago y bulbo se procesaron a través de secado de punto crítico para su observación en microscopía electrónica de transmisión; el conducto venenoso, anillo esofágico y bulbo se procesaron histológicamente, se obtuvieron cortes de 15 micras y se tiñeron con azul de toluidina. Se obtuvieron fotografías con una cámara Handy Cam Sony de cada una de las partes del aparato venenoso, tomando como referencia una reglilla para su medición posterior.

Perfiles cromatográficos del aparato venenoso

El conducto, saco radular y bulbo fueron separados para obtener los extractos crudos, a éste último se le eliminó la mayor parte posible de las capas musculares que lo recubrían. El tejido de cada una de las partes del aparato venenoso se maceró con un macerador de tejidos, posteriormente se centrifugó a $11,130 \times g$ durante 20 min a $4^{\circ}C$ y se obtuvo el sobrenadante (extracto crudo) al cual se le determinó la cantidad de proteína por el método Bradford.

Los extractos crudos del conducto venenoso, saco radular y bulbo se inyectaron por separado en un sistema de cromatografía de alta resolución para separar las proteínas HPLC modelo: Waters 600. Se utilizó una columna y precolumna Vydac C18 con tamaño de partícula y poro de $5 \mu m$ y 30 nm respectivamente y las soluciones A y B; solución A de 0.1 % de Ácido trifluoroacético en agua desionizada y solución B que consistía de una mezcla 9:1 de Acetonitrilo y agua desionizada con 0.085 % de Ácido trifluoroacético. La muestra se eluyó de manera isocrática durante 10 min y se realizaron lecturas a una longitud de onda de 220 nm. Los perfiles cromatográficos obtenidos se compararon entre si y se seleccionaron las fracciones de los picos que caracterizaban a cada muestra y los picos que se presentaron en común en todas las muestras, para probar su actividad biológica en el bioensayo.

Bioensayo de electrofisiología en íleon de Cobayo

Se sacrificó un ejemplar macho de Cobayo mediante dislocación cervical y se realizó su disección para obtener segmentos del íleon. En un baño de órganos que contenía solución de

Krebs-Henseleit (NaCl, 118 mM; KCl, 4.7 mM; NaHCO₃, 25 mM; KH₂PO₄, 1.2 mM; CaCl₂, 2.5 mM; MgSO₄, 1.2 mM; y D-(+)-glucosa, 11 mM) gasificada con 95% de O₂ and 5% CO₂, se colocó un segmento de 1 cm del íleon. Las contracciones se fueron registrando en un polígrafo de Grass (Astro-Med, Inc. Grass) y después de 30 minutos con registros estables, se consideraron 10 minutos como un periodo control. Posteriormente se agregó una de las fracciones cromatográficas a la concentración inicial de 0.047 g/ml de una de las fracciones seleccionadas de los cromatogramas y se registró su actividad durante 10 minutos. Los resultados obtenidos (contracción) se compararon con el control de acetilcolina 1 M.

Procesamiento de datos

Se realizaron archivos electrónicos con las imágenes obtenidas y se realizaron las mediciones correspondiente mediante el programa Scion Image 1.44p de la longitud, ancho de los ejemplares, longitud del bulbo, conducto y saco radular. Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, valor máximo y mínimo), con el programa EXCEL de Microsoft Office.

RESULTADOS

Análisis morfométrico

Se realizó la ubicación de cada una de las estructuras en el aparato venenoso de *C. purpurascens* que consistió de un bulbo, un conducto y un saco radular así como de un diente radular ubicado en la punta de la probóscide, la cual es albergada dentro de una falsa probóscide (Fig. 1 A). Al iniciar la disección se observó el bulbo como una estructura visible de gran tamaño; en la parte superior de éste se encontró el resto del aparato venenoso. Visto el caracol desde la parte dorsal, el conducto y saco radular se localizan hacia el lado derecho y del lado izquierdo se ubica un par de glándulas salivales con sus conductos que atraviesan el anillo esofágico hacia el lado derecho, presentaron un aspecto plumoso con un peso de 4.67 ± 0.81 E.S. mg (Fig. 1 B).

Diente radular

El diente radular corresponde a un diente radular de hábitos piscívoros. Morfológicamente cuenta con tres barbas que van aumentando su longitud conforme se aproximan a la base del diente (Fig. 2 A). A lo largo del diente corre un eje (o línea) que finaliza entre las dos primeras barbas. La base muestra un orificio y la unión con el ligamento.

Bulbo

El bulbo midió 16.63 ± 1.36 E.S. mm de longitud por un ancho máximo de 4.51 ± 0.51 E.S. mm y pesó 18.98 ± 10.95 E.S. mg (Fig. 1C). La parte externa del bulbo estaba cubierta por una capa muscular en sentido longitudinal y oblicuo (Fig. 1 D). El centro del bulbo estaba atravesado por un conducto que iniciaba en el extremo distal y terminaba en el conducto de veneno. Al final del bulbo se observó una estructura circular amarillenta, justo en la parte final del lumen (Fig. 1 E). El bulbo estaba conformado por tejido muscular, conjuntivo y gránulos de proteínas; la parte distal del bulbo mostró una capa muscular y material granuloso; en la parte media se observaron dos capas musculares separadas por una de tejido conjuntivo y gránulos en el lumen (Fig. 3 A); de manera similar a la parte proximal en donde también se observó un epitelio escamoso en el lumen y glándulas exocrinas unicelulares con una posible secreción holocrina (Fig. 3 B). El bulbo visto en microscopía electrónica mostró dos capas musculares separadas por una capa intermedia, también se observó material granuloso en el lumen (Fig. 2 B).

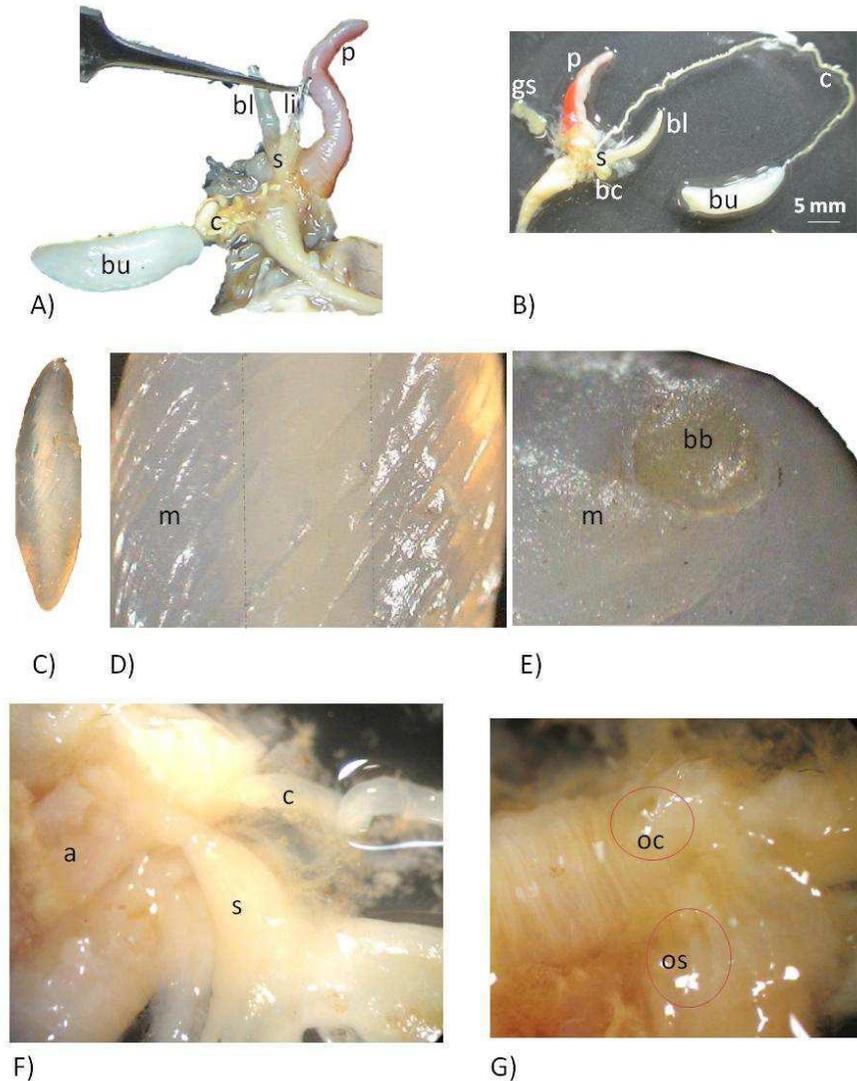


Figura 1. Imágenes de la anatomía del aparato venenoso de *Conus purpurascens*. A) Aparato venenoso con conducto enrollado y ligamentos del brazo corto expuestos; B) Aparato venenoso, mostrando la longitud del conducto y glándulas salivales; C) Bulbo; D) Parte exterior del bulbo donde se trasluce el conducto interior; E) extremo distal del bulbo, F) Unión del conducto y saco radular al conducto esofágico; G) orificios en anillo esofágico. Abreviaciones: a: anillo esofágico, bb: botón final del bulbo, bc: brazo corto, bl: brazo largo, bu: bulbo, c: conducto, gs: glándulas salivales; li: ligamento, m: músculo, oc: orificio del conducto, os: orificio del saco, s: saco radular.

Figure 1. *Conus purpurascens*. Anatomy images of venomous apparatus A) Venomous apparatus with rolled up duct and exposed short arm ligaments, B) Venomous apparatus, showing the length of the duct and salivary glands, C) Bulb, D) Outer part of the bulb showing the duct inside, E) Distal bulb end, F) Union of the duct and radular sac to the esophageal duct; G) Holes in esophageal ring. Abbreviations: a: esophageal ring, bb: bulb end button, bc: short arm, bl: long arm, bu: bulb, c: duct, gs: salivary glands, li: ligament, m: muscle, oc: duct orifice, os: sac hole, s: radular sac.

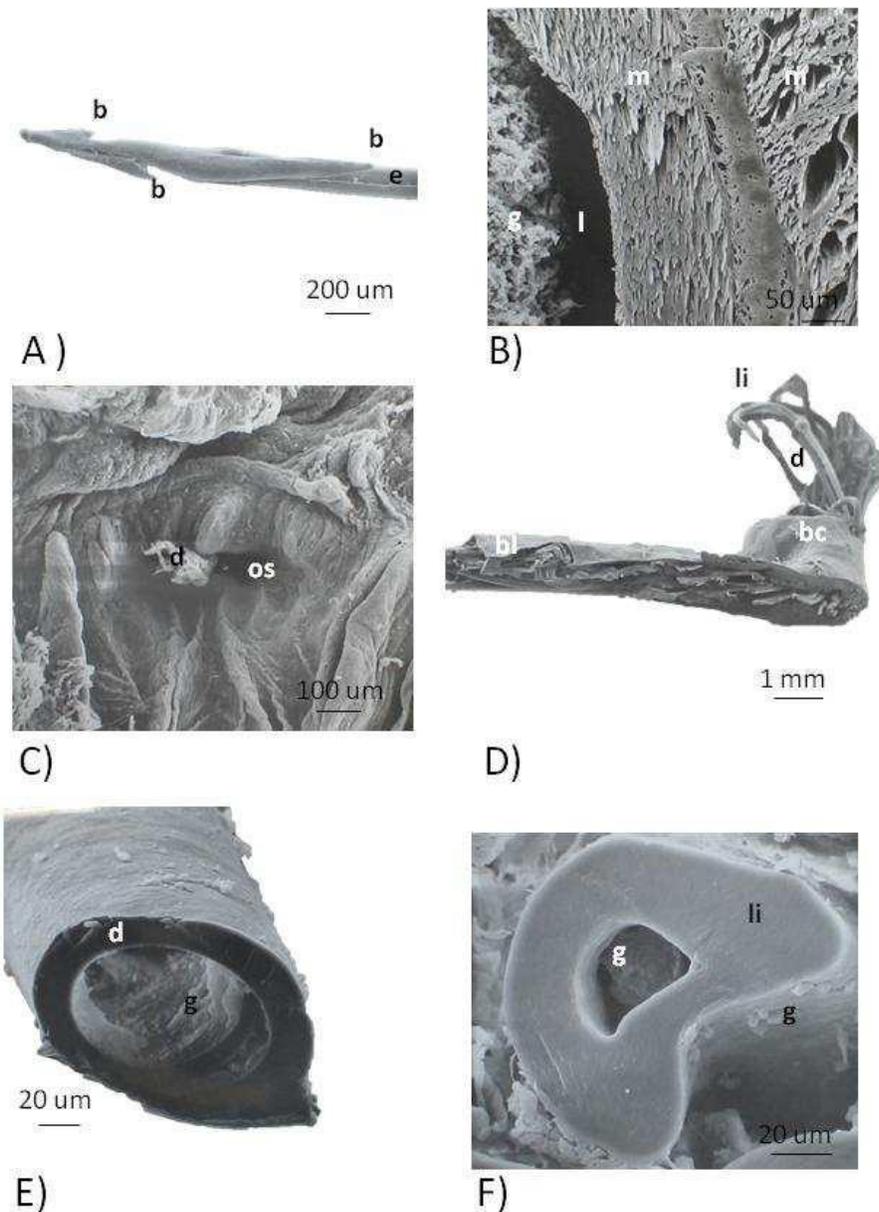


Figura 2. Imágenes obtenidas del aparato venenoso de *Conus purpurascens*, mediante microscopía electrónica de barrido, con la técnica de punto crítico. A) Diente radular presente en la probóscide; B) bulbo; C) orificio del saco radular en el anillo esofágico; D) saco radular; E) diente obtenido del saco radular; F) ligamento obtenido del saco radular. Abreviaciones: b: barba, bc: brazo corto, bl: brazo largo, d: diente, e: eje, g: gránulos, l: lumen, li: ligamento, m: músculo, os: orificio del saco radular.

Figure 2. Images obtained by scanning electronic microscopy of the *Conus purpurascens* venomous apparatus. Critical point technique. A) Radular tooth present in the proboscis, B) bulb, C) radular sac hole in esophageal ring; D) radular sac; E) tooth obtained from the radular sac; F) ligament obtained from the radular sac. Abbreviations: b: beard, bc: short arm, bl: long arm, d: tooth, e: axis, g: granules, l: lumen, li: ligament, m: muscle, os: radular sac hole.

Conducto

La longitud del conducto representó el 162% en relación con la longitud de la concha y peso 8.05 ± 2.14 E.S. mg (Fig. 1 A). El conducto inicia en el bulbo y finaliza en un orificio en el anillo esofágico (Fig. 1 F). Histológicamente el conducto venenoso consistió de tejido conectivo y epitelio con glándulas unicelulares. En un corte realizado en la parte media del conducto, se observó una capa de células glandulares en la parte externa, después una capa de tejido conjuntivo y un epitelio con glándulas unicelulares, (posibles glándulas exocrinas de secreción holócrina) (Fig. 3 C). Esta estructura cambio en la región del conducto cerca del esófago, en donde disminuyeron las glándulas unicelulares de la periferia, se presentaron dos capas de tejido conjuntivo y se observaron una mayor cantidad de gránulos en el lumen (Fig. 3 D).

Saco radular

El saco radular consta de dos brazos: El brazo largo midió 11.92 ± 1.58 E.S. mm de longitud y el brazo corto 5.44 ± 0.86 E.S. mm (Fig. 1 A). El peso del saco radular fue de 22.16 ± 2.96 E.S. mg. El brazo largo se une al anillo esofágico en un orificio situado debajo de la unión del conducto-anillo esofágico (Fig. 1 G), el cual también se observó en microscopia electrónica (Fig. 1. C). Los ligamentos de los dientes del brazo corto se encontraron hacia la parte distal y en el brazo largo la punta del diente se encontró en dirección al anillo esofágico (Fig. 2D). Dentro del saco radular se observó un material blanquecino dentro y fuera de los dientes (Fig. 2E) y ligamentos (Fig. 2 F).

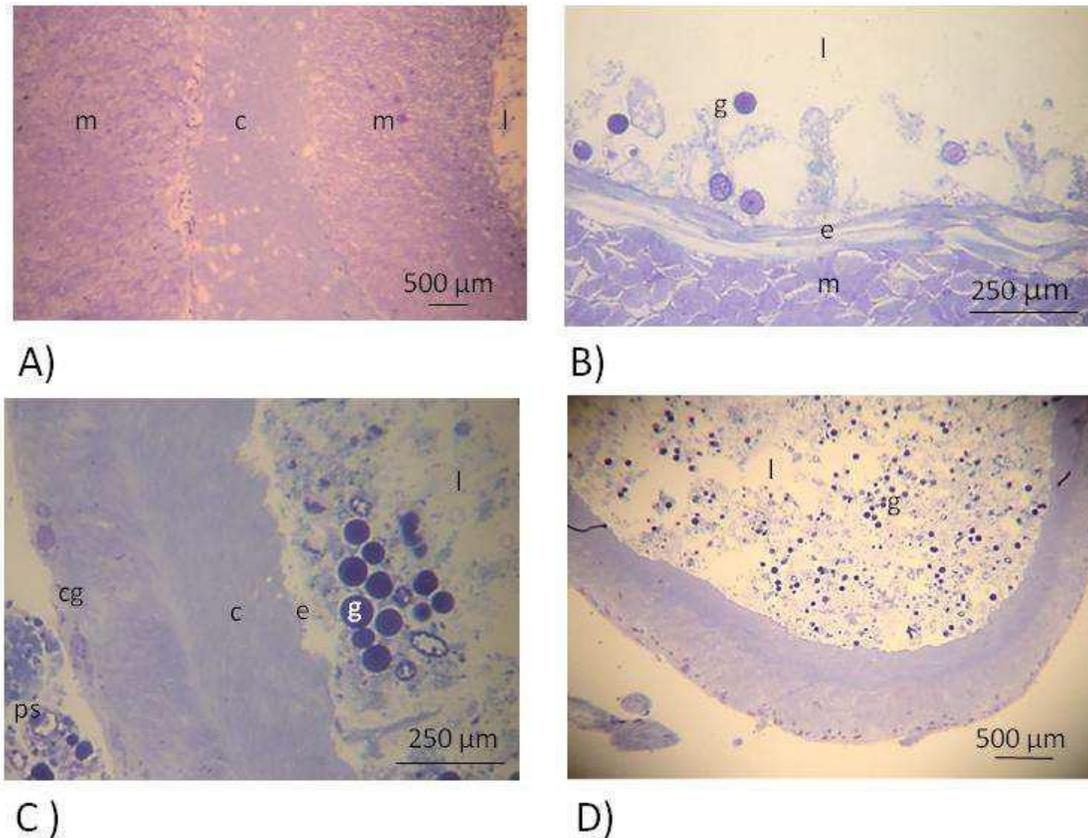


Figura 3. Cortes histológicos de 15 micras teñidos con azul de toluidina. A) pared del bulbo, B) detalle del lumen del bulbo, C) parte media del conducto D) parte del conducto cerca del esófago. Abreviaciones: c: conjuntivo, cg: células glandulares, l: lumen, m: músculo, g: granulo, e: epitelio, ps: producto de secreción.

Figure 3. Histological cuts of fifteen microns stained with toluidine blue. A) bulb wall, B) bulb lumen detail, C) middle portion of the duct, D) duct near the esophagus. Abbreviations: c: conjunctive, cg: glandular cells, l: lumen, m: muscle, g: granule, e: epithelium, ps: secretory product.

Perfiles cromatográficos

Después de analizar los perfiles cromatográficos (Fig.4), y con base a la similitud entre ellos se seleccionaron diez picos para una evaluación preliminar en electrofisiología. Los picos seleccionados se describen en la tabla 1, indicando el tiempo de retención y la estructura anatómica a la que pertenecen.

Tabla 1. Resultado del análisis del perfil cromatográfico y bioensayo en íleon de cobayo. Se muestra, la estructura anatómica analizada, el tiempo de retención en el que se presentó el pico seleccionado, así como el número que le fue asignado. Se mencionan los perfiles cromatográficos que coinciden con ese pico y los resultados preliminares del efecto de la toxina en el ileón de cobayo.

Table 1. Result of the analysis of the chromatographic profile and guinea pig ileum bioassay. The table shows the anatomical structure being analyzed, the retention time in the submission of the peak, and the number that was assigned to it. The chromatographic profiles that coincide with that peak are mentioned, and preliminary results of the bioassay.

Estructura	Tiempo de retención	No. de pico	Observaciones Presente en:	Efecto en íleon
Bulbo	40	3	-Todos	-Relajante
	58	2	-Bulbo y conducto	-Sin efecto
	62	1	-Solo en bulbo	-Aumento en la amplitud
Conducto	40	8	-Todos	-Sin efecto
	54	6	-Conducto y saco radular	-Sin efecto
	56	9	-Conducto	-Sin efecto
	58	4	-Bulbo y conducto	-Excitatorio
	60	10	-Conducto	-Sin efecto
Saco radular	54	5	-Conducto y saco radular	-Bifásico
	40	7	-Todo	-Sin efecto

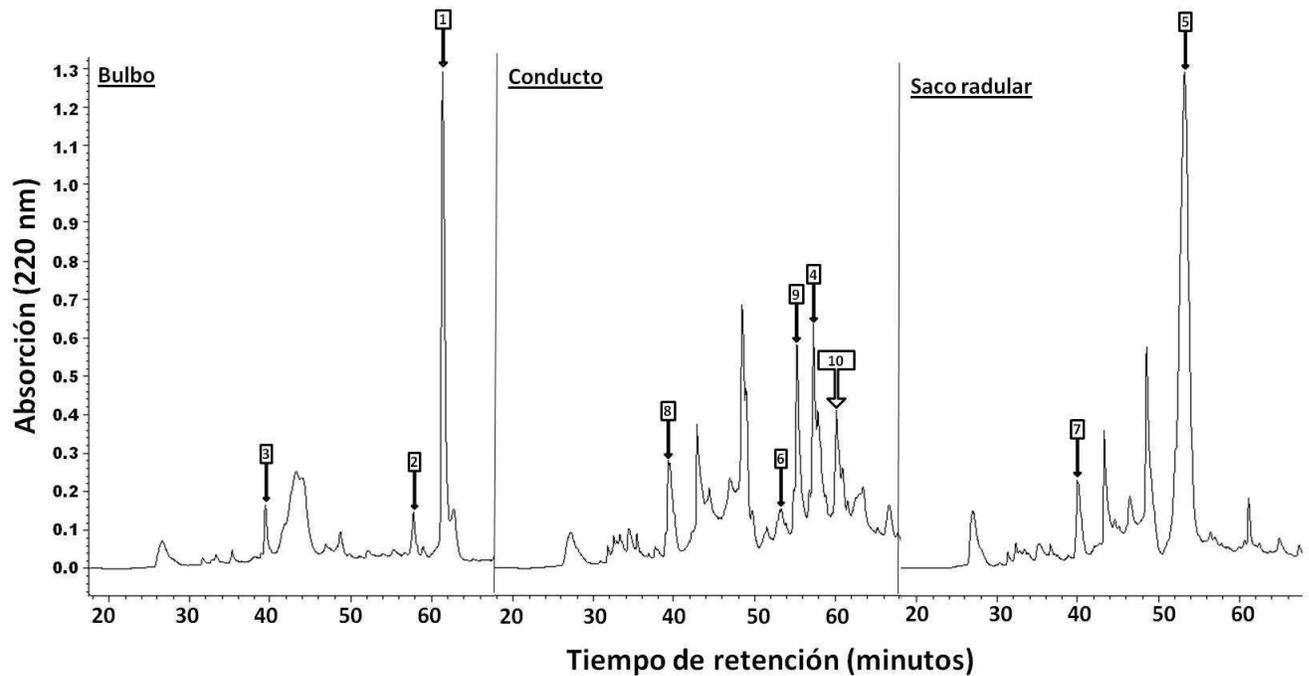


Figura 4. Perfiles cromatográficos del bulbo, conducto y saco radular. Los números indican las fracciones de los picos que se seleccionaron para probar su efecto en íleon de cobayo.

Figure 4. Chromatographic profiles of the bulb, duct and radular sac. Numbers indicate the fractions of the peaks that were selected to test its effect on guinea pig ileum.

Bioensayo en íleon de Cobayo

En la tabla 1 se resume de manera general el efecto que tuvieron cada uno de los extractos probados. El efecto del extracto del bulbo (0.047 g/ml) pico 3 mostró un efecto relajante y aumentos en la amplitud del tono y el pico 1 presentó aumento en la amplitud del tono, la cual fue cada vez más frecuente al aumentar la dosis de 0.047 g/ml a 0.19 g/ml. El efecto del conducto se observó únicamente en el pico 4 que mostró una contracción muy clara con duración de 3 minutos y medio y un máximo promedio de 46.24 ± 1.70 % de contracción. El efecto del extracto del saco radular presentó un efecto bifásico después de 2 min de agregar una dosis de 1.78 g/ml en donde presentó un ligero efecto excitatorio seguido de un efecto relajante con duración aproximada de 1 min, después de 5 minutos el tono del íleon regresó a su estado normal.

DISCUSIÓN

La presencia de gránulos y material blanquecino en el saco radular apoyan la hipótesis de que los dientes de la rádula se cargan de sustancias bioactivas en el saco radular como lo describe en su hipótesis Marshall *et al.* (2002). El material blanquecino con gránulos se observó en el saco radular dentro y fuera de los dientes y las láminas de los dientes radulares en formación, por lo que se sugiere que este material queda dentro del diente cuando la lámina se enrolla.

El bulbo y saco radular presentaron gránulos y las fracciones cromatográficas obtenidas de sus extractos mostraron efecto en el íleon de cobayo, por lo que es posible que en cada una de

las partes del aparato venenoso se presente algún tipo de sustancia bioactiva la cual puede combinarse o modificarse antes de llegar a su destino. La biosíntesis de veneno en el bulbo también la menciona Safavi-Hemami *et al.* (2010) y en un estudio reciente se realizó una comparación de la masa molecular del extracto del conducto y el diente radular de un espécimen de *C. purpurascens* en donde demostraron el nivel de continuidad de los péptidos (Chun *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos y la literatura permiten describir al conducto del veneno como una sola estructura, en donde uno de los extremos está inmerso en el bulbo. La suposición se basa principalmente en dos puntos: uno de ellos es el estudio realizado por Page (2012), que describe como los mioblástos se organizan alrededor de la parte final del conducto para formar lo que es el bulbo, de esta forma el conducto interno del bulbo correspondería a un fragmento del conducto venenoso; el otro punto es la estructura circular amarillenta situada al final del bulbo que se describe por primera vez en este estudio y corresponde a la parte final del conducto que atraviesa el bulbo.

Se ha observado que a lo largo del conducto se presentan diferentes regiones, las cuales son visibles por el color que presentan cuando se realiza la disección de los ejemplares. En un estudio realizado con *Ductoconus princeps* (*Conus princeps*), se observó que las regiones del conducto pueden tener características bioquímicas diferentes; los perfiles cromatográficos de cada región así como el efecto de su extracto crudo y fracciones seleccionadas en caracoles dulceacuícolas fue diferente en cada región (Gorrostieta *et al.*, 2012). Tomando en cuenta que el conducto se prolonga hasta el interior del bulbo y que a lo largo del conducto se presenta cierto grado de maduración de las toxinas es posible que la región del conducto inmersa en el bulbo pueda estar participando en el inicio de esta síntesis de proteínas, las cuales pueden estar presentando desde entonces cierto grado de actividad como se observó en los resultados preliminares en su efecto en el íleon de cobayo.

Los resultados del bioensayo en electrofisiología son datos preliminares dado que se utilizaron dosis muy pequeñas en comparación con otros estudios en donde se ha observado un efecto claro del conducto venenoso en dosis de 0.3 g/ml a 10 g/ml en diferentes especies de *Conus* spp (Kobayashi *et al.*, 1981; Kobayashi *et al.*, 1983; Rojas *et al.*, 2008). El efecto de las proteínas del conducto de *Conus* spp. en el íleon de cobayo es diverso ya que se ha encontrado que tiene un efecto relajante en concentraciones de 10 g/ml de proteína del conducto de *Conus spurius* y *C. austini* (Rojas *et al.*, 2008); un efecto contráctil con 0.3 g/ml de proteína del conducto venenoso de *Conus magus* (Kobayashi *et al.*, 1983) o bien un efecto bifásico a una concentración de 1 g/ml de proteína del conducto venenoso de *C. geographus* (Kobayashi *et al.*, 1981). El efecto de la proteína del conducto de *C. purpurascens* fue contráctil como se observó también en un bioensayo de íleon de cobayo realizado con proteínas del conducto de *C. magus* (Kobayashi *et al.*, 1983) y en un bioensayo con peces utilizando proteínas de *C. purpurascens* obtenidas mediante ordeña (López-Vera *et al.* 2007). Una dosis de 100 pmol toxin/g de alfa-conotoxina PIB obtenida de *C. purpurascens* es capaz de causar parálisis y muerte al igual que otros inhibidores musculares de receptores nicotínicos de acetilcolina del músculo esquelético. Esta toxina es muy selectiva de éstos receptores nicotínicos ya que al probar su actividad en el músculo esquelético y neuronal expresado en los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* inhibió potentemente los receptores del músculo esquelético, su actividad fue selectiva ya que tubo poco efecto en los receptores neuronales (López-Vera *et al.* 2007).

Los resultados de este estudio permiten concluir que a lo largo del todo el aparato venenoso de *C. purpurascens* se presentan gránulos con posibles sustancias bioactivas. Los tiempos de retención son comparables entre las diferentes partes del aparato venenoso. Los

gránulos presentes en el saco radular muestran un efecto bifásico en el ileón de cobayo y pueden constituir las toxinas de los dientes precargados. Los gránulos observados en el bulbo tienen un efecto relajante y los gránulos observados en el conducto un efecto excitatorio en el ileón de cobayo. El conducto interior del bulbo se observa como una prolongación del conducto venenoso y es en este lugar en donde posiblemente se inicia la biosíntesis de péptidos.

Este es el primer estudio comparativo de las características anatómicas, histológicas, cromatográficas y toxinológicas del aparato venenosos de *C. purpurascens*. Los productos proteicos generados en cada una de las partes del aparato venenoso pueden tener un efecto en particular, como se observó en los resultados preliminares (bioensayo de ileón de cobayo) de éste estudio, por lo que se recomienda realizar bioensayos más específicos, así como la caracterización bioquímica de cada una de las partes del aparato venenoso con el fin de conocer mejor los procesos y aportes bioquímicos que se llevan a cabo para la producción de toxinas con uso potencial en la farmacología marina.

REFERENCIAS

- Brusca R. & Brusca G. (2006). *Invertebrados*. 2ª edición. McGraw Hill. México DF. 1005 pág.
- Chun, J., Baker M., Kim D., LeRoy M., Toribo & P. Jon-Paul B. (2012). Cone snail milked venom dynamics— A quantitative study of *Conus purpurascens*. *Toxicon*. 60:83–94.
- Gorrostieta, E., Falcón A., Palma L., Zepeda A., Michel E., Landa V., Aguilar M. & Heimer E. (2009). Descripción morfológica del sistema venenoso del caracol *Conus purpurascens* (Gastropoda: Conidae). *Acta Microscopica*. 18:427-428.
- Gorrostieta-Hurtado E., Aguilar-Ramírez M.B., Falcón-Alcántara A., Michel-Morfín E., Landa-Jaime V. & Heimer de la Cotera E. P. (2012). Perfil cromatográfico y efecto del extracto del conducto venenoso de *Ductoconus princeps* en *Planorbella tenue*. *Boletín de Malacología Médica*. Boletín de la Sociedad Internacional de Malacología Médica y Aplicada. No. 18
- Hermitte, L., M.B., CH.B., D.T.M. & H. (1946). Venomous marine Molluscs of the genus *Conus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 39(6): 485-512.
- Kobayashi, J., Nakamura H. & Ohizumi Y. (1981). Biphasic isolated mechanical responses of the guinea-pig ileum to the venom of the marine snail *Conus striatus*. *British Journal of Pharmacology*. 73:583-585.
- Kobayashi, J. Nakamura H. & Ohizumi Y. (1983). Excitatory and inhibitory effects of a myotoxin from *conus magus* venom on the mouse diaphragm, the guinea-pig atria, taenia caeci, ileum and vas deferens. *European Journal of Pharmacology*. 86:283-286.
- López-Vera E., Jacobsen R.B., Ellison M., Olivera B.M. & Teichert R.W. (2007). A novel alpha conotoxin (α -PIB) isolated from *C. purpurascens* is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*. 49:1193-1199.
- Marshall J., Kelley W.P., Rubakhin S.S., Bingham J.P., Sweedler J.V., & Gilly W.F. (2002). Anatomical correlates of venom production in *Conus californicus*. *The Biological Bulletin*. 203:27-41.
- Moller C., & Marí F. (2010). 9.3 kDa Components of the injected venom of *Conus purpurascens* define a new five-disulfide conotoxin framework. *Biopolymers (Peptide Science)*. 96:158-165.
- Page, L. (2012). Developmental modularity and phenotypic novelty within a biphasic life cycle: morphogenesis of a cone snail venom gland. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 279:77-83.



- Rojas, A., Feregrino A., Ibarra-Alvarado C., Aguilar M. B., Falcón A. & Heimer de la Cotera E. P. (2008). Pharmacological characterization of venoms obtained from Mexican Toxoglossate gastropods on isolated guinea pig ileum. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 14:497-513.
- Safavi-Hemami H., Young N.D., Williamson N.A., & Purcell A.W. (2010). Proteomic interrogation of venom delivery in marine cone snails: Novel insights into the role of the venom bulb. *Journal of Proteome Research*. 9:5610–5619.

Recibido: enero de 2013.

Aceptado: diciembre de 2013.