

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA HISTOLOGÍA DEL APARATO
VENENOSO DEL *Conus austini* (MOLLUSCA
NEOGASTROPODA).”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CLAUDIA LETICIA VEGA CÁZARES

DIRIGIDA POR

Dr. ALFONSO CÁRABEZ TREJO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA HISTOLOGÍA DEL APARATO
VENENOSO DEL *Conus austini* (MOLLUSCA
NEOGASTROPODA)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

CLAUDIA LETICIA VEGA CÁZARES

DIRIGIDA POR

Dr. ALFONSO CÁRABEZ TREJO

SINODALES

Dr. ALFONSO CÁRABEZ TREJO
DIRECTOR

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL

Dra. LAURA CRISTINA BERÚMEN SEGURA
SINODAL

Dra. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ
SINODAL

No. Adq. H70643

No. Título _____

Clas. TS

571.51

V422d

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | ii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iii |
| RESUMEN | |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 2 |
| Ecología del género <i>Conus</i> | 2 |
| Biología del género <i>Conus</i> | 8 |
| <i>Conus austini</i> | 8 |
| Anatomía del cuerpo del caracol | 9 |
| Anatomía del aparato venenoso | 10 |
| Correlación anatómica del aparato venenoso con la producción de veneno | 12 |
| Correlación anatómica del diente radular con hábitos alimenticios | 13 |
| Correlación anatómica del osfradio con hábitos alimenticios | 15 |
| Estructura de las glándulas salivales accesorias | 16 |
| HIPÓTESIS | 18 |
| OBJETIVOS | 19 |
| GENERAL | |
| PARTICULARES | 19 |
| METODOLOGÍA | 20 |
| MATERIALES | 20 |
| MÉTODOS | 21 |
| RESULTADOS | 26 |
| DISCUSIÓN | 52 |
| CONCLUSIONES | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA | 57 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---------------------------------------|--------|
| 1 | Clasificación del género <i>Conus</i> | 6 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1 Caracoles del género <i>Conus</i> | 3 |
| 2 Distribución geográfica del género <i>Conus</i> dividida en territorios | 4 |
| 3 Esquema que muestra el aparato venenoso utilizado por especies de <i>Conus</i> | 5 |
| 4 Estructura externa de la concha del género <i>Conus</i> | 7 |
| 5 Fotografía de la concha de la especie <i>Conus austini</i> | 8 |
| 6 Esquema general de un caracol del género <i>Conus</i> . | 10 |
| 7 Análisis esquemático del aparato venenoso de <i>C. purpurascens</i> | 11 |
| 8 Dientes radurales de <i>Conus</i> | 14 |
| 9 Estructura del diente radular de <i>Conus vermívoros</i> | 15 |
| 10 Esquema que muestra las características citológicas de las glándulas salivales de <i>Conus vexillum</i> | 17 |
| 11 Zona de recolección de la especie <i>C. austini</i> | 22 |
| 12 Localización de los cortes de las áreas de interés para la determinación de la histología del aparato venenoso | 24 |
| 13 Concha de la especie <i>C. austini</i> | 26 |
| 14 Cuerpo del caracol de <i>C. austini</i> | 28 |
| 15 Aparato venenoso de <i>C. austini</i> | 28 |
| 16 Conducto aislado de la proboscis | 29 |
| 17 Micrografías por microscopía electrónica de reflexión de la punta del diente radular | 29 |
| 18 Micrografías por microscopía de luz del bulbo muscular medio | 31 |
| 19 Micrografías por microscopía de luz de la unión del conducto venenoso con el bulbo muscular | 32 |
| 20 Micrografías por microscopía de luz del conducto venenoso proximal | 34 |
| 21 Micrografías por microscopía de luz del conducto venenoso medio | 35 |
| 22 Micrografías por microscopía de luz del conducto venenoso distal | 36 |

RESUMEN

Durante las últimas dos décadas, ha habido un incremento importante en la investigación de compuestos naturales con actividad biológica. Los productos naturales orgánicos de origen marino (por su complejidad química) son difíciles de caracterizar y sintetizar en las cantidades requeridas para su evaluación y desarrollo como fármacos. Recientemente, el descubrimiento de compuestos peptídicos y protéicos derivados de invertebrados marinos venenosos, con actividad fisiológica, ha estimulado un nuevo enfoque en la búsqueda de los llamados "fármacos del mar". Entre los invertebrados marinos productores de este tipo de péptidos (con actividad farmacológica) destacan los gastrópodos de la Superfamilia Conoidea, integrada por caracoles marinos de las familias Conidae, Turridae y Terebridae, cuyos miembros, todos carnívoros venenosos, se caracterizan por poseer un sofisticado sistema de inyección de veneno a la presa. El aparato venenoso consta de un conducto venenoso que en su parte proximal esta equipado con un bulbo muscular, y en la parte distal está unido a la faringe dentro de la proboscis y conectado con el saco radular, donde se forman y almacenan los dientes radulares; cuando la presa es detectada, alarga la proboscis y dispara un diente radular que clava en la presa e inyecta veneno, de acción rápida y potente. En los últimos veinte años, se han estudiado los venenos de varias especies del género *Conus*, pero existen escasos estudios en cuanto a la histología de esta familia. En este trabajo se estudió la histología del aparato venenoso de *Conus austini*; por microscopía de luz y electrónica de transmisión. Se encontró que la anatomía general de *C. austini* es muy similar a la que presentan otras especies del género *Conus*. El bulbo muscular esta compuesto principalmente de músculo liso con fibras musculares unidas por tejido conectivo. El conducto venenoso unido con el bulbo muscular, proximal, medio y distal presentan una capa externa de colágena y una luz que contiene gránulos de veneno, en el conducto proximal se observan una gran cantidad de estos; mientras que el conducto distal presenta muy pocos gránulos. El brazo corto del saco radular contiene hojas de quitina enrolladas que forman el diente radular y el brazo largo presenta diferentes estadios de maduración del diente. Las glándulas salivales están formadas por una delgada capa externa de fibras de colágena, la luz de los conductos glandulares, un epitelio secretor con numerosos lisosomas y un producto de secreción.

INTRODUCCIÓN

Existe un interés reciente por estudiar la diversidad de flora y fauna de las costas del litoral mexicano. En ellas se encuentran organismos marinos que son una fuente de recursos naturales. El estudio sistemático de esta flora y fauna se ha orientado a la búsqueda de fármacos de origen natural extraídos de caracoles marinos venenosos y que han sido utilizados por laboratorios de investigación para estudios fisiológicos y/o farmacológicos, con especial énfasis en su efecto sobre el sistema nervioso.

La caracterización de estos compuestos se ha enfocado principalmente a aquellos venenos con actividad citotóxica como modelo de antineoplásicos, cardiotoxicos, antibióticos, antiinflamatorios, antivirales, analgésicos y agentes con actividad hemolítica, entre otros.

Se ha determinado que las toxinas peptídicas provenientes de caracoles marinos son bioactivas y químicamente estables al presentar en su cadena polipeptídica una alta proporción de cisteínas.

Los estudios orientados a la determinación de la actividad biológica y a la caracterización de los péptidos neurotóxicos obtenidos de venenos extraídos de invertebrados marinos (gastropodos), es un nuevo campo de investigación en nuestro país. Las características anatómicas e histológicas del aparato venenoso de estos gastropodos, en especial del género *Conus* y de las especies que se encuentran en nuestro país, son poco conocidas, de aquí la relevancia de este estudio; en particular nuestro interés se centra en la especie *Conus austini*, especie que se localiza en las costas del Golfo de México.

ANTECEDENTES

ECOLOGÍA DEL GÉNERO *Conus*

Los caracoles marinos del género *Conus* son depredadores pertenecientes al Phylum Mollusca y a la clase Gastrópoda, estos caracoles son muy atractivos debido a la forma, brillo y color de su concha (Figura 1).

Cuando en su radio de acción aparece una fuente alimenticia, alarga la proboscis y dispara el llamado diente radular, que se clava en la presa. La presa se inmoviliza debido a el efecto del veneno inoculado. Se sabe que la toxina de *Conus geographus* es un poderoso relajante muscular; los animales víctimas de esta especie se relajan tanto que dejan de respirar y mueren. Por otro lado, la especie *Conus magus* inmoviliza a sus víctimas ya que su veneno contiene un compuesto con potente efecto sobre la contracción muscular. De acuerdo a su acción, las toxinas que han sido aisladas y caracterizadas a partir del veneno de los *Conus*, pudieran ser utilizadas terapéuticamente.

Los *Conus* normalmente no atacan al hombre, pero pueden hacerlo si son molestados, al ser capturados y manipulados por los coleccionistas; se han reportado varias muertes de seres humanos por *Conus geographus*, que se considera la especie más peligrosa del género *Conus* (Fegan y Andersen, 1997).



Figura 1. Caracoles del género *Conus*. Se muestra la forma de las conchas de diez especies: a) *C. textile*, b) *C. magus*, c) *C. circumcissus*, d) *C. geographus*, e) *C. dusaveli*, f) *C. gloriamaris*, g) *C. milneedwardsi*, h) *C. ammiralis*, i) *C. bandanus vidua* y j) *C. hirasei* (Tomada de Olivera y col., 1990).

Los caracoles *Conus* son una de las especies de animales marinos con mayor éxito. Son de aparición reciente (55 millones de años) hablando en términos evolutivos. El género contiene alrededor de 500 especies y está ampliamente distribuido; la distribución geográfica del género *Conus* ha sido dividida en territorios (Figura 2) (Olivera, 1996).

Los *Conus* habitan en su mayoría en aguas tropicales y subtropicales de aguas someras, desde la zona de marea baja hasta los límites de la plataforma continental. Estos caracoles son encontrados en una variedad de microambientes.

Algunas especies están asociadas a algas adheridas de arrecifes coralinos, otras permanecen bajo o sobre cabezas de coral, mientras que otras prefieren sustratos arenosos o con restos coralinos (Kohn y Nybakken, 1975). La más grande diversidad de caracoles *Conus* se encuentra en los arrecifes coralinos de Tailandia, Filipinas e Indonesia. Los *Conus* tienen hábitos nocturnos, permaneciendo enterrados en la arena o bajo corales o rocas durante el día y convirtiéndose en depredadores activos en la noche (Kohn y Nybakken, 1975; Röckel y col., 1995).

Los *Conus* constituyen uno de los géneros de depredadores de los arrecifes coralinos más diversos y dominantes, siendo los únicos caracoles marinos conocidos que devoran vertebrados (Duda y Palumbi, 1999).



Figura 2. Distribución geográfica del género *Conus* dividida en territorios. El género *Conus* se distribuye sobre el área de la latitud incluida entre 40° al Norte y 40° al Sur en las regiones que se muestran en esta figura. Las pocas especies que no se encuentran en esta latitud, se localizan en África del sur, Australia, Japón y el mar mediterráneo meridional (Tomada de Paganelli, 1999).

La alimentación de los *Conus* es muy diversa, incluye poliquetos, cefalópodos, otros gastrópodos, bivalvos, peces, y crustáceos. Cada especie está altamente especializada de acuerdo a su presa; probablemente el grupo más grande es el que se alimenta de gusanos poliquetos y lo conforman alrededor de más de 150 especies; en segundo lugar se encuentra el grupo que se alimenta de peces; y un tercero, con alrededor de 70 especies que se alimenta de moluscos. Para atrapar su alimento, envenenan a sus presas mediante la inyección de toxinas a través de un diente hueco y desechable, localizado al final de la proboscis (Figura 3) (Kohn y col., 1972). Las toxinas actúan rápidamente y son específicas para cada tipo de alimento de la especie estudiada. Las especies piscívoras como *C. purpurascens*, producen toxinas que paralizan a los peces de inmediato, mientras que el veneno de la especie molusquívora *C. textile* induce movimientos peristálticos en su presa, lo que impide que el molusco pueda retraerse en su concha al ser atacado (Olivera y col., 1991).



Figura 3. A) Esquema que muestra el aparato venenoso utilizado por especies de *Conus*. 1: Diente radular unido a la proboscis, 2: Conducto venenoso; 3: Bulbo muscular. B) Detalle del diente radular donde puede apreciarse la forma de arpón. C) Ampliación del diente radular, se observa que el diente es hueco (Tomada de Kohn y col., 1972).

Todas las especies del género *Conus* son depredadores marinos que se alimentan de una gran variedad de peces, moluscos o gusanos, por lo que han desarrollado diversas estrategias para cazarlos; cada una de las especies usa principalmente algún patrón de envenenamiento. Los venenos de *Conus* contienen pequeños péptidos biológicamente activos que se les llama conotoxinas o conopéptidos. Las conotoxinas están constituidas por péptidos pequeños (10-30 aminoácidos) altamente plegados ya que contienen varios residuos de cisteínas a lo largo de su estructura primaria (Olivera y col., 1990). Cada una de estas conotoxinas actúan sobre canales y/o receptores específicos según su presa y además ejercen una acción que se suma con otros componentes del veneno, incrementando la velocidad de acción de estos (Terlau y col., 1996).

La clasificación del género *Conus* (o caracoles Conos, por la forma cónica distintiva de sus conchas), se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación del género *Conus*

| | |
|--------------|---------------|
| Reino | Animal |
| Phylum | Mollusca |
| Clase | Gastropoda |
| Subclase | Prosobranchia |
| Orden | Neogastropoda |
| Suborden | Toxoglossa |
| Superfamilia | Conoidea |
| Familia | Conidae |
| Género | <i>Conus</i> |

La familia Conidae, la cual, junto con las familias Turridae y Terebridae, forman la Superfamilia Conoidea, caracterizada por estar formada por caracoles marinos carnívoros venenosos, que poseen un mecanismo sofisticado para la aplicación del veneno a sus presas (Maillo, 2001).

La Superfamilia Conoidea está bien definida desde el punto de vista anatómico y conquiliológico (forma de la concha). Las características más destacadas son, una proboscis bien desarrollada y adaptada a la alimentación carnívora, así como la concha de forma diferente en todas las especies, pero siempre en espiral, con canal sifonal y opérculo córneo (Figura 4).

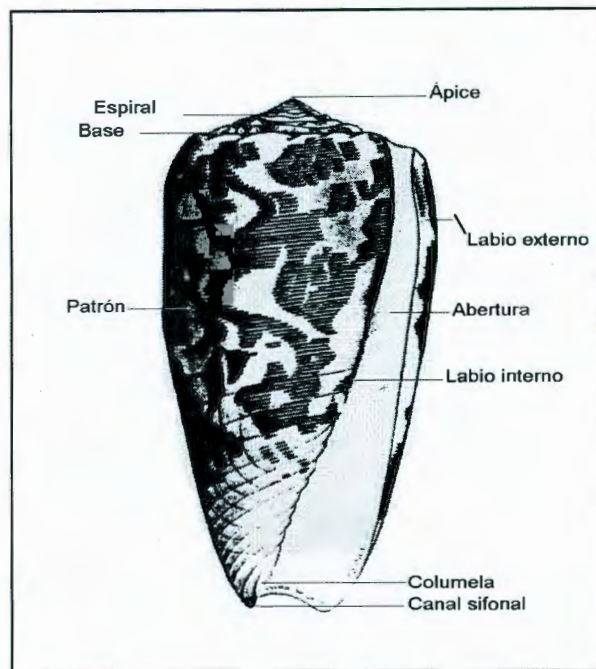


Figura 4. Estructura externa de la concha del género *Conus*. Donde puede observarse la forma cónica de la concha, característica de este género (Tomada de Halstead, 1988).

La diversidad de formas y colores de la concha es enorme. Consecuentemente el número de nombres específicos es muy grande. Los intentos de subdividir el gran género *Conus* ha llevado a su división en grupos sólo definidos por la morfología de la concha y difíciles de controlar en su aplicación como subgéneros. En general, se tiende a utilizar solo el nombre genérico y a clasificar las especies por orden alfabético (Lindner, 1999).

BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Conus*

Conus austini

El *Conus austini*, especie del género *Conus*, se encuentra distribuida en los mares de Florida, Alabama, Texas, Tamaulipas, Tabasco, Campeche e Indias Orientales; en fondos arenosos y en la plataforma continental hasta 100 m de profundidad (Abbott y Dance, 1986).

Estudios del contenido estomacal de ejemplares de *C. austini* revelaron la presencia de restos de poliquetos, por lo que se considera una especie vermívora (Zugasti-Cruz, datos no publicados).

La especie *C. austini* mide entre cinco y seis centímetros, la forma y color de la concha de esta especie se muestra en la Figura 5.

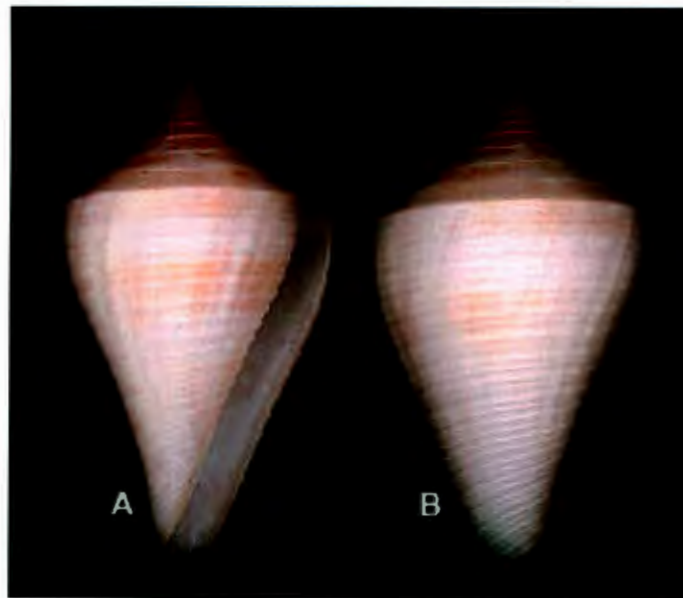


Figura 5. Fotografía de la concha de la especie *Conus austini*. En A se muestra la cara ventral de la concha y en B se presenta la cara dorsal (Tomada de Render, 2004).

Anatomía del cuerpo del caracol

Los moluscos son invertebrados no segmentados, que tienen un cuerpo suave cubierto por una concha calcárea secretada por el manto, tejido que rodea el cuerpo del caracol y que se pliega en el extremo posterior, delimitando un espacio denominado cavidad paleal, donde se encuentran las branquias y desemboca el tubo digestivo, así como el aparato reproductor. La parte más voluminosa del cuerpo del *Conus* es el pie. Corresponde a una fuerte masa muscular, la base del pie es plana y lisa. El frente del pie se trunca o se redondea extensamente mientras que la parte posterior termina con una extremidad que tiene un pequeño óperculo, el cual es una placa córnea dura que permite cerrar el orificio de la concha. Después del pie, el músculo más importante es el músculo columelar que fija la concha al cuerpo del caracol. Sobre el pie, en la parte delantera y entre los tentáculos, se localiza la proboscis, que esta cubierta por la boca (Figura 6) (Paganelli, 1999). En el lado izquierdo de la cabeza se encuentra el sifón, una estructura tubular que se abre hacia el exterior en la cavidad paleal bombeando el agua. Los ojos se encuentran en la base de los tentáculos cefálicos. Los órganos sexuales se localizan en la región superficial de las últimas vueltas del espiral de la masa visceral; el aparato reproductor de la hembra comprende un ovario, bolsa copulatrix, receptáculo seminal y útero; mientras que el aparato reproductor del macho esta formado por el pene que se sitúa a la derecha del caracol, arriba del pie y hacia a trás de la cabeza y un testículo que recubre la glándula digestiva (Hardy, 2004).

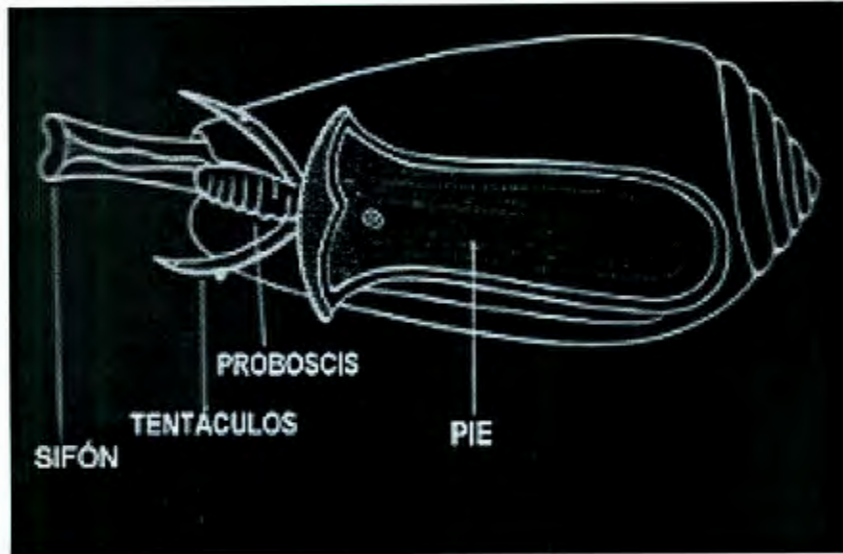


Figura 6. Esquema general de un caracol del género *Conus*. Donde se muestran las partes del cuerpo del caracol que se proyectan hacia el exterior de la concha (Tomado de Halstead, 1988).

Anatomía del aparato venenoso

El aparato venenoso está formado por un conducto venenoso que en su parte proximal está equipado con un bulbo muscular, en la parte distal está unido a la faringe y conectado con el saco radular que está formado por un brazo largo donde se forman los dientes y un brazo corto donde se almacenan los dientes radulares maduros. Los "dientes venenosos" son dientes laterales no fijos en la membrana, que forman la base de la rádula a modo de arpones. Los dientes son huecos y están provistos de ganchos (Figura 7). Los dientes maduros son desplazados uno por uno a través de un canal de evacuación hasta fijarse por un esfínter en el extremo de la proboscis al momento de requerirlos, es decir, cuando la presa es detectada. Después de la picadura quedan en el tejido de la presa, o, en el caso de que no se acierte en el blanco, es desechado. Entonces un nuevo diente surge del saco radular (Lindner, 1999).

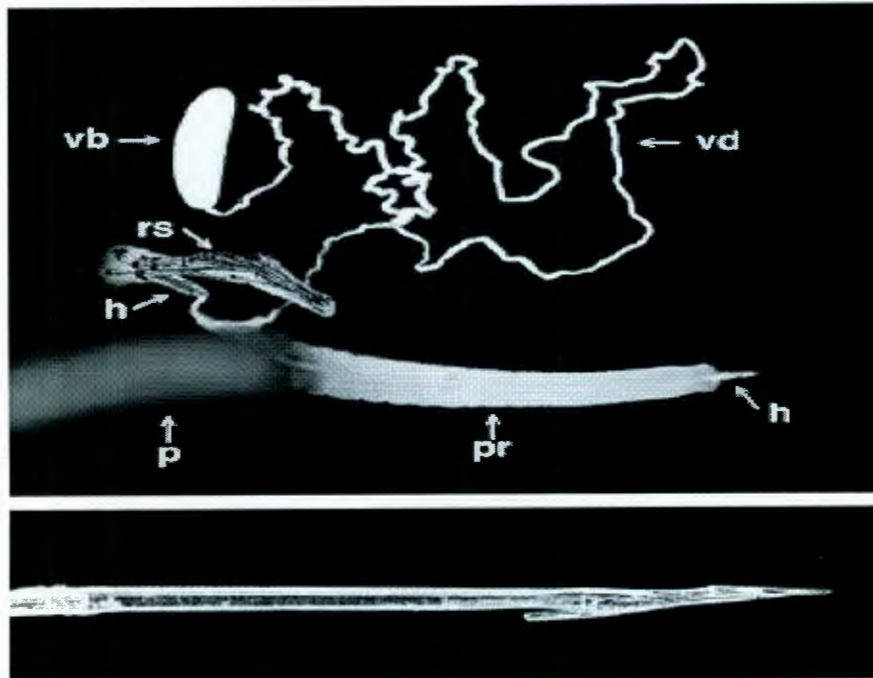


Figura 7. Análisis esquemático del aparato venenoso de *C. purpurascens*. Vb: bulbo venenoso, vd: conducto venenoso, rs: saco radular; h: dientes como arpones, p: faringe, pr: proboscis. En la imagen inferior, se muestra el diente radular analizado por microscopía electrónica (Tomada de Olivera, 1996).

La histología del aparato venenoso se determinó recientemente por medio de microscopía óptica y electrónica de transmisión de la especie *Conus californicus*, única especie del género *Conus* que se encuentra en las costas de California, el tipo de alimentación es generalizada e incluye poliquetos, peces y moluscos; por lo que posee una variedad de estrategias para alimentarse, así como un diente radular con características diferentes al resto de las especies tropicales (Kohn, 1999). Marshall y col., (2002) reportaron que la parte proximal del conducto venenoso (cerca del bulbo muscular) presenta tres zonas: una capa externa de tejido conectivo, una capa epitelial y una luz interna. El epitelio tiene una organización compleja, estructuralmente similar al túbulo proximal del riñón de mamíferos y especializado en transporte activo, con una alta concentración de mitocondrias en la región basal de las células epiteliales, asociada a la producción de una gran cantidad de energía y presencia de pocos gránulos de veneno en la luz del conducto. La porción distal del conducto (cerca de un cuarto de distancia hacia la faringe) presenta una morfología diferente: una capa externa de colágena,

un epitelio menos complejo, formado por células con límites poco marcados, con abundantes restos celulares en la luz del conducto, lo que demuestra un tipo de secreción halócrina. La luz del conducto e incluso las células epiteliales contienen una gran cantidad de gránulos de veneno de por lo menos dos tipos y de mayor tamaño, lo que sugiere que la producción de gránulos de veneno ocurre en esta región del conducto, así como la síntesis de veneno. Igualmente describieron un pasaje plano de aproximadamente 10 μm de ancho que toma el conducto venenoso desembocando en la luz de la faringe; este fino conducto está compuesto por un solo tipo de células metacromáticas que posiblemente secretan un componente especial al veneno para su liberación final. Al examinar el brazo corto del saco radular y su contenido, demostraron que el interior del diente radular de *C. californicus* contiene una rica variedad de gránulos morfológicamente parecidos a los encontrados en la luz del conducto venenoso y cuyo contenido son los péptidos activos; lo anterior sugiere que el diente es precargado con veneno.

Correlación anatómica del aparato venenoso con la producción de veneno

En la producción y liberación del veneno en el género *Conus* ocurren tres procesos generales que se llevan a cabo dentro de un complejo aparato venenoso:

1. Síntesis, procesamiento y empaquetamiento de las toxinas peptídicas.
2. Síntesis, producción y transferencia del diente maduro a la punta de la proboscis.
3. Inserción final del diente y expulsión del veneno.

Los procesos mencionados anteriormente se asignan a componentes anatómicos específicos:

1. En el conducto venenoso se produce la síntesis del veneno. La porción proximal del conducto está equipada con un bulbo muscular. La parte distal del conducto venenoso se une a la faringe justo antes de la unión con el

esófago. La porción proximal y distal del conducto difieren en grosor, estructura y contenido de veneno (Bingham y col., 1996). Sin embargo, aún no es claro en donde ocurre la síntesis de veneno, y el empaquetamiento dentro de "gránulos de veneno" (Maguire y Kwan, 1992).

2. Los dientes se forman en el brazo largo del saco radular y los dientes maduros se almacenan en el brazo corto, la luz del saco radular se conecta con la faringe justo antes de la abertura del conducto. En preparación para su uso, el diente radular se transporta a través de la faringe por un mecanismo aún no conocido. El diente es hueco y puede ser llenado de veneno por el veneno contenido en el conducto venenoso (Marshall y col., 2002).
3. Se considera que el bulbo muscular no interviene en la secreción del veneno, y se cree que este participa proporcionando la fuerza impulsora para la expulsión final del veneno, sin embargo; su función aún es desconocida a parte de lo mencionado (Halstead, 1988). La proboscis, participa en la expulsión del veneno al proporcionar la presión positiva necesaria, además de impulsar y orientar al diente radular para ser clavado en la presa (Kohn y Hunter, 2001).

Correlación anatómica del diente radular con hábitos alimenticios

Los miembros del género *Conus* tienen el diente radular individual más complejo de todos los gastrópodos. Cada uno de ellos consiste de una lamina de quitina enrollada, formando un tubo hueco. Los dientes son asimétricos y difíciles de representar completamente en un esquema. El diente de cada especie de *Conus* varía ampliamente tanto en forma, como el tipo y la ornamentación externa.

Piele (1939) agrupó a las especies que presentaban una estructura similar del diente radular y desde entonces se ha correlacionado la estructura del diente con el tipo de presa que utiliza para alimentarse (Nybakken, 1969). En la Figura 8 se

presenta un esquema que ilustra el rango y diversidad de forma de los dientes radulares que existe en este género.

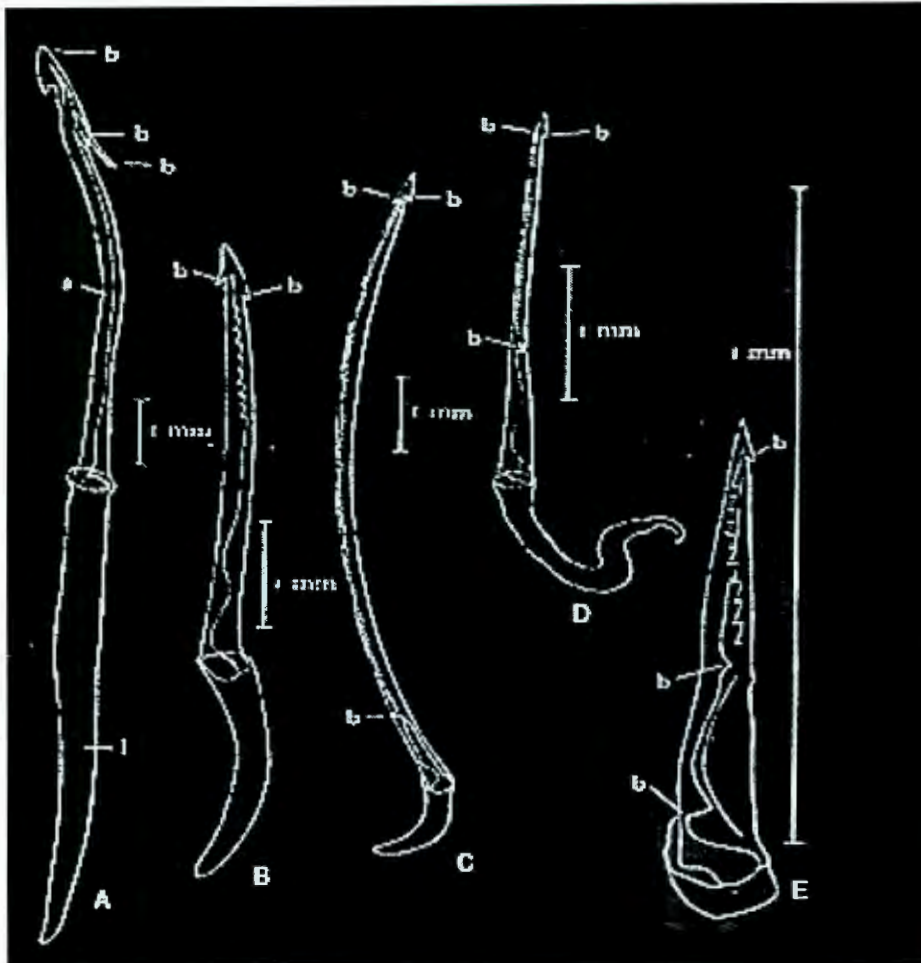


Figura 8. Dientes radulares de *Conus*: Piscívoros: A) y B); molusquicívoros: C) y D); y vermívoro: E). b= barba, l= ligamento s= hoja; escala = 1 μ m (Tomado de Lim, 1969).

Los gastrópodos del género *Conus* se han dividido en tres grupos de acuerdo al tipo de alimentación: vermívoros, molusquicívoros y piscívoros (Lim, 1969).

Para estudios de los hábitos alimenticios de especies vermívoras de los mares de Indonesia, se disecaron dos especímenes de cada uno de los *Conus*: *C. zonatus*, *C. brunneus* y *C. imperialis*. Los únicos restos encontrados en el tracto digestivo de estos caracoles fueron poliquetos de la familia Amphinomidae. Se demostró que

estas especies de *Conus* tenían una similitud en el tipo particular de estructura dental, encontrándose una correlación con el tipo de alimentación (Figura 9) (Nybakken, 1969).

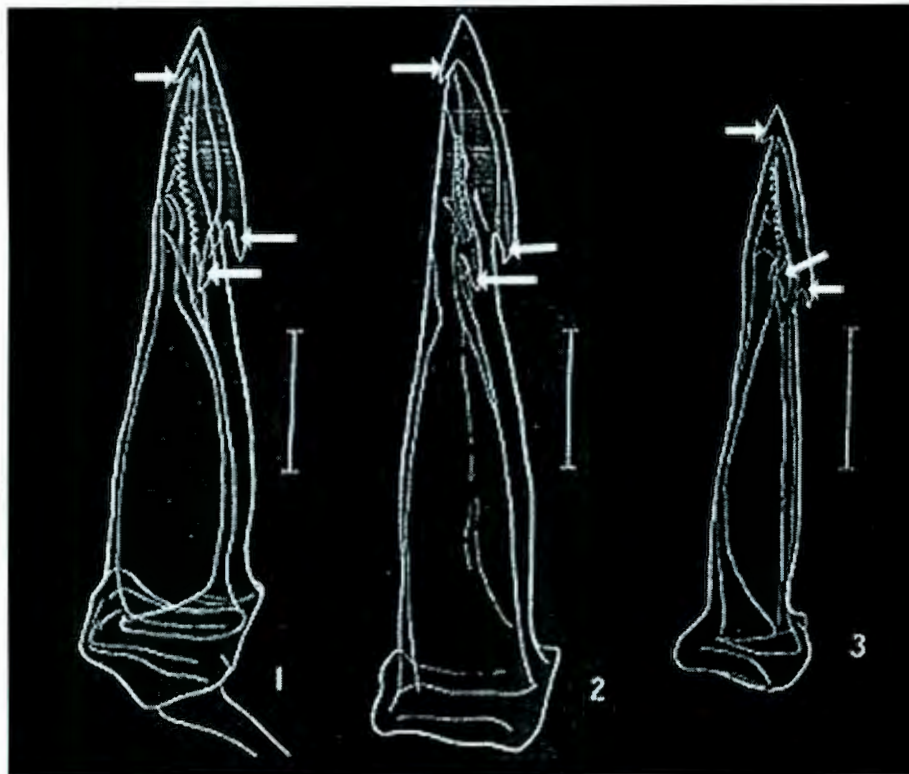


Figura 9. Estructura del diente radular de *C. zonatus* (1), *C. brunneus* (2) y *C. imperialis* (3). En los tres depredadores, se muestra que tienen una pequeña barba justo antes de la base seguida de dos barbas indicadas por los círculos (Tomada de Nybakken, 1969).

Correlación anatómica del osfradio con hábitos alimenticios

El osfradio es un órgano prominente que se encuentra en la cavidad del manto de los gastrópodos, es probablemente el órgano sensorial más importante de estos moluscos; permite detectar cambios químicos en el medio ambiente, a su presa y evitar a su depredador. El osfradio está formado por numerosas laminillas sensoriales, que se extienden lateralmente de una región central de tejido nervioso llamada ganglio osfradial, la zona lateral de cada laminilla está densamente

cubierta de células ciliadas cuya función es mover el agua entre las laminillas y las células sensoriales (Garton, 1984).

El estudio de la variación morfológica del osfradio entre especies ha revelado que diferencias en el tamaño, forma y número de laminillas sensoriales están asociadas con los hábitos alimenticios y condiciones ambientales similares; determinándose de manera general que los depredadores de poliquetos tienen entre 6-7 laminillas y los depredadores de peces y moluscos entre 7-13 laminillas sensoriales (Spengler, 1995).

Estructura de las glándulas salivales accesorias

Las glándulas salivales accesorias de los gastrópodos (también llamadas glándulas salivales secundarias, tubulares o ventrales), están formadas de uno o dos lóbulos apareados piriformes o tubulares situados a los lados de la parte inicial del esófago. Las glándulas salivales accesorias del género *Conus* están compuestas en la luz por un epitelio seguido de una capa fibromuscular, una capa submuscular, y una cápsula (Figura 10). Los epitelios, fibras musculares y células de secreción constituyen el parenquima de estas glándulas, en el cual el estroma está formado por componentes intersticiales de las capas fibromusculares y submuscular.

En el epitelio, las prolongaciones celulares hacia la luz del conducto funcionan como canalículos de secreción. Se sabe que la transferencia y la descarga intracelular de los productos de secreción de la célula a la glándula salival accesoria es apócrina.

Al no encontrar ninguna enzima capaz de actuar en la digestión, se supone que el papel de las glándulas puede ser: 1) La producción de sustancias que lubriquen el canal alimenticio durante la captura de la presa y/o ingestión, 2) la secreción de feromonas o algunos otros compuestos farmacológicamente activos (Schultz, 1983).

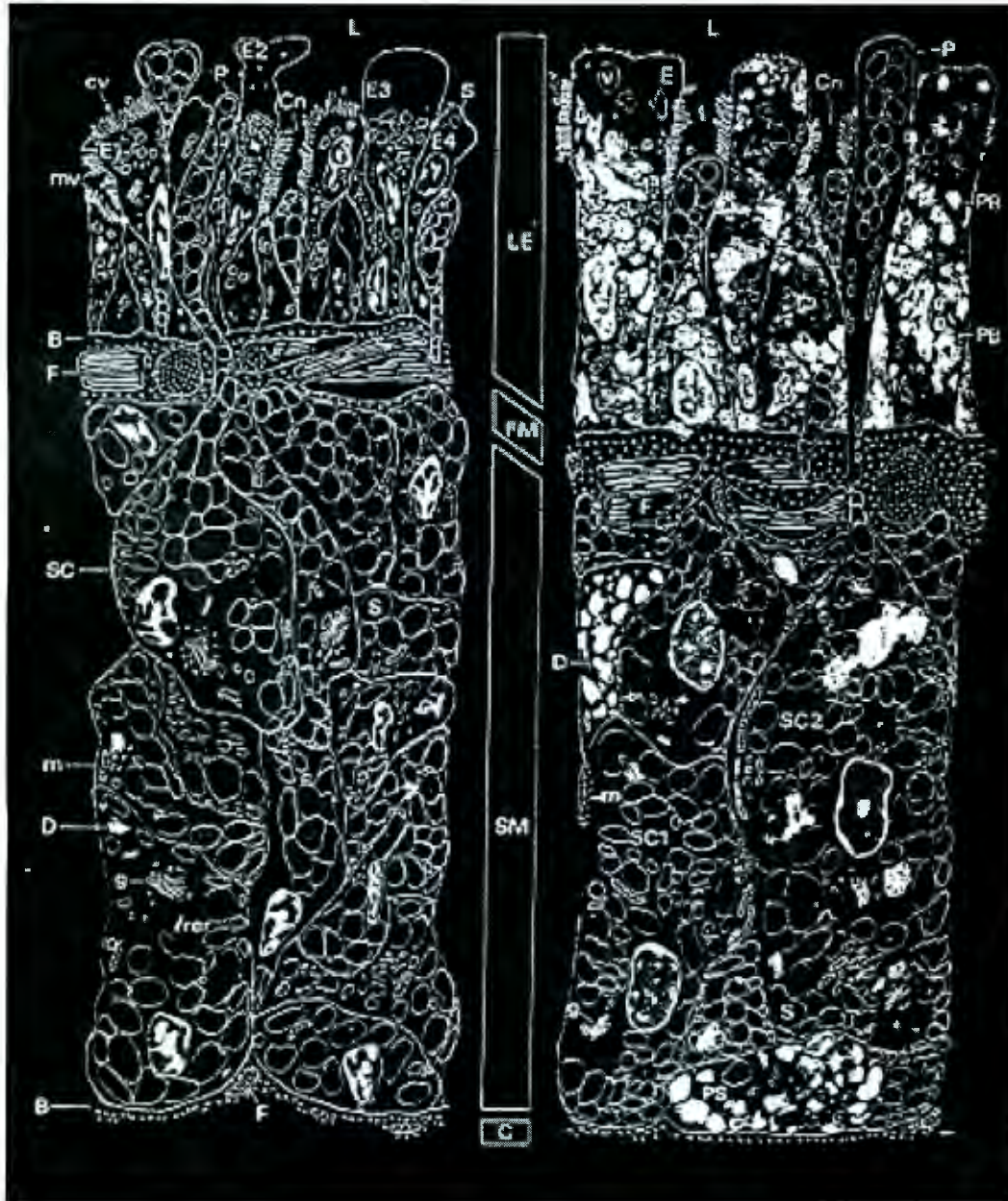


Figura 10. Esquema que muestra las características citológicas de las glándulas accesorias salivales de *Conus vexillum* en una sección transversal. Donde C=Cápsula, Cn=Canalículos secretorios, D=Cuerpos densos, E=Epiteliocitos, F=Fibra muscular, FM=Capa fibromuscular, g=Aparato de golgi, L=Luz, LE=Luz del epitelio, m=Mitocondria, P=Proceso de secreción, PB=Cuerpos polimorficos, PS=Célula post-secretoria, SC1=Célula secretoria tipo 1, SC2=Célula secretoria tipo 2, SM=Capa submuscular, v=Vacuola (Tomada de Schultz, 1983).

HIPÓTESIS

La especie *Conus austini* presenta un aparato venenoso anatómicamente complejo, semejante al de otros miembros de la Superfamilia Conoidea.

OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar la anatomía del aparato venenoso de *Conus austini* (Mollusca Neogastropoda).

ESPECÍFICOS

- ◆ Establecer las técnicas de disección para el aislamiento e identificación de los elementos anatómicos del aparato venenoso de *Conus austini*.
- ◆ Determinar la ultraestructura del conducto venenoso, bulbo muscular y glándula salival por microscopía electrónica de transmisión.
- ◆ Determinar la estructura del diente radular por microscopía electrónica de reflexión.

METODOLOGÍA

MATERIALES

Cajas de Petri

Pinzas y tijeras de disección

Gradilla de metal

Material de vidrio

Pipetas de plástico desechables

Frascos de cristal con rosca y tapa plástica

Termómetro

Martillo

Prensa

Desecador

Navajas

Equipo

Microscopio óptico

Microscopio estereoscópico

Microscopio electrónico de transmisión

Microscopio electrónico de reflexión

Ultramicrotomo

Potenciómetro

Balanza analítica

Estufa

Cámara digital

Campana de flujo laminar

Reactivos

Fijador (glutaraldehído 3%, en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4).

Solución de lavado (sacarosa 0.25 M en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4).

Solución de tetraóxido de osmio 2% (en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4).

Soluciones de etanol al 50%, 70%, 90% ,100%, 100%.

Óxido de propileno.

Resina epóxica EPON 812 (diluida 1:1 con óxido de propileno).

Resina epóxica EPON 812 completa.

Material biológico

Caracoles de la especie *Conus austini*

MÉTODOS

Obtención de especímenes

Los caracoles de la especie *C. austini* fueron recolectados del 14 al 19 de Octubre del 2000 en la plataforma de Tamaulipas (a profundidades de 50-100 m) (Figura 11), y fueron congelados inmediatamente a -20°C . Posteriormente fueron transportados al laboratorio de Neurofarmacología Marina, del Instituto de Neurobiología (Juriquilla, Querétaro), donde fueron congelados a -70°C , hasta su estudio.



Figura 11. Zona de recolección de la especie *Conus austini*. Los especímenes se recolectaron en la plataforma de Tamaulipas (▣) a profundidades de 50-100 m.

Método de descongelación

Se probaron tres métodos de descongelación:

Descongelación lenta.

El caracol se colocó al chorro de agua hasta su descongelación.

Descongelación rápida.

El caracol se colocó en una bolsa de plástico con fijador y posteriormente se llevó a baño maría a una temperatura de 40°C hasta su descongelación.

Descongelación rápida y perfusión

El caracol, dentro de una bolsa de plástico, se colocó en un baño maria a 60°C durante cuatro minutos; se perfundió con una jeringa, 20 ml de fijador entrando por el sifón y hasta el fondo del cuerpo del caracol.

Aislamiento del aparato venenoso

El cuerpo del caracol se aisló mediante la rotura de la concha con un martillo y una prensa; después de liberado el caracol completo e intacto, se colocó en una caja de Petri con fijador a 4°C durante 20 minutos.

Anatomía macroscópica

Bajo el microscopio óptico se identificaron primeramente los ojos del caracol (como dos puntos negros), así como los tentáculos; una vez identificados se separó el manto (que cubre la cavidad paleal), se realizó un corte transversal a lo largo de la boca donde se encuentra la proboscis; se separó la proboscis del tejido conectivo así como el conducto venenoso que le sigue a la proboscis y por último el bulbo muscular.

Una vez aislado el aparato venenoso y las glándulas salivales, se tomaron fotografías con un microscopio estereoscópico.

Anatomía microscópica

Para estudios anatómicos por microscopía electrónica (el aparato venenoso no se aisló), los cortes del área de interés, de aproximadamente 1 mm³ (Figura 12) se realizaron sin separar las estructuras del resto del cuerpo del caracol y posteriormente se colocaron en viales con solución fijadora.

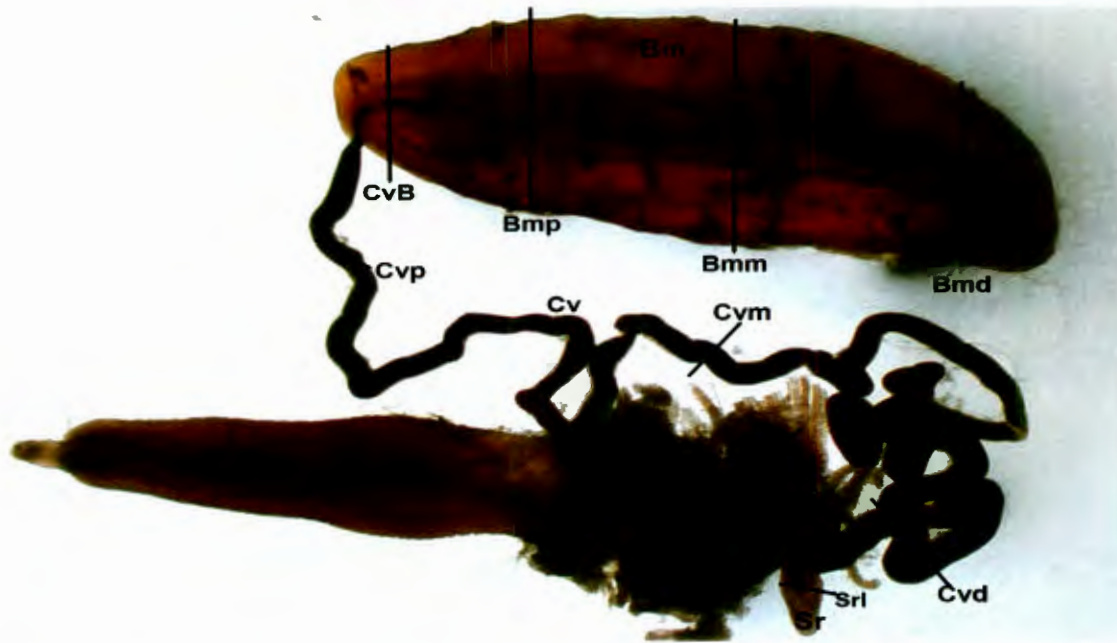


Figura 12. Se muestra la localización de los cortes de las áreas de interés para la determinación de la histología del aparato venenoso: Bm: bulbo muscular, proximal (Bmp), medio (Bmm) y distal (Bmd); Cv: conducto venenoso, unido con el bulbo muscular (CvB), proximal (Cvp), medio (Cvm) y distal (Cvd); Sr: saco radular, brazo corto (Src) y brazo largo (Srl); Gs: glándulas salivales y Pr: proboscis.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Disecadas las regiones del aparato venenoso (ver Figura 12), se procesaron para MET, como se describe a continuación: se fijaron cuatro horas en glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4. Posteriormente las muestras se lavaron con una solución de sacarosa 0.25 M en el mismo amortiguador (cuatro recambios de 1 hora). Los tejidos se posfijaron con tetraóxido de osmio al 2% en amortiguador de cacodilato durante 1 hora, después se realizó una deshidratación progresiva con etanol (50%, 70%, 90%), dos lavados de 15 minutos a 4°C y con etanol al 100%, un lavado de 30 minutos a 4°C, posteriormente se realizaron dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente con óxido de propileno. La infiltración se realizó en resina epóxica Epox 812 diluida 1:1 con óxido de propileno; finalmente las muestras se incluyeron en resina epóxica completa. La polimerización se hizo por calor a 70°C por 36 horas.

El tejido incluido se preparó para la obtención de cortes semifinos (1 micra de grosor) con ayuda del micrótomo, estos cortes se tiñeron con azul de toluidina alcalina para verificar la calidad de fijación y localizar el área de estudio por microscopía de luz. Los cortes finos, de 60 a 70 nm, se obtuvieron con navaja de diamante y se contrastaron con acetato de uranio y citrato de plomo. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico JEOL modelo 1010 operado a 80 KV, obteniéndose los registros fotográficos del material.

Microscopía electrónica de reflexión

Los dientes radulares se fijaron cuatro horas en glutaraldehído al 3% (en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4). Posteriormente las muestras se lavaron con una solución de sacarosa 0.25 M en el mismo amortiguador (cuatro recambios de 1 hora). Los tejidos se posfijaron con tetraóxido de osmio al 2% en amortiguador de cacodilato durante 1 hora, después se realizó una deshidratación progresiva con acetona (50%, 70%, 90%), dos lavados de 15 minutos a 4°C y con acetona al 100%, un lavado de 30 minutos a 4°C. Los dientes se transfirieron a la cámara del equipo de secado al punto crítico (TOUSIMIS) con CO₂ líquido, pasando dos veces por el punto crítico, liberando la presión lentamente. Posteriormente las muestras se colocaron en un soporte de aluminio y se pegaron con pintura conductora de plata, después se sombrearon con una capa de 90 nm de oro en el sistema de glow discharge y finalmente se observaron en el microscopio electrónico de reflexión modelo JEOL SB40.

RESULTADOS

Los resultados se basan principalmente en las imágenes obtenidas por microscopía de luz y electrónica de transmisión, de acuerdo a la naturaleza de esta propuesta de tesis. Los resultados que se muestran son representativos de varias repeticiones, es importante señalar que se presentan solo aquellos resultados obtenidos por el método de descongelado rápido, sin disecar el aparato venenoso (ver métodos); ya que por este método se logró una mejor preservación de las estructuras observadas por microscopía electrónica de transmisión.

La concha de la especie *C. austini* presenta las siguientes características (Figura 13): concha cónica de 4.5 cm de longitud, la concha se muestra con la cubierta de naturaleza orgánica llamada periostraco de color café, se puede observar la abertura de la concha de color blanco (Figura 13B) y un espiral que da siete vueltas (Figura 13C).

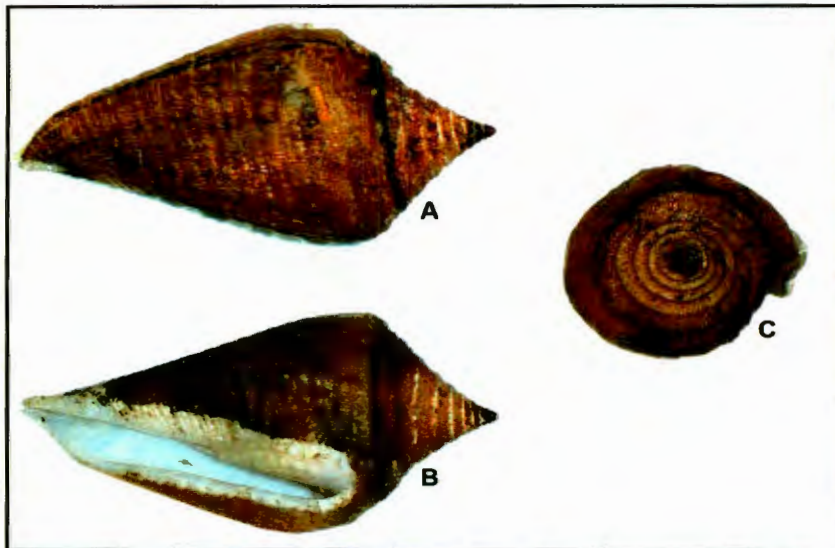


Figura 13. Concha de la especie *C. austini*, que contiene aún la cubierta orgánica llamada periostraco de color café. En A se muestra la cara ventral de la concha, en B se presenta la cara dorsal, donde se puede observar la abertura de la concha de color blanco y en C se observa la cara coronal (espiral) de la concha, que presenta siete vueltas.

Dissección anatómica

El cuerpo del caracol intacto mide 3 cm de longitud y presenta un ligero reflejo color naranja; se puede observar (Figura 14), el sifón (S) que se sitúa en el lado izquierdo de la cabeza, presenta una forma tubular y se abre hacia el exterior de la cavidad paleal; la boca (B) que se encuentra en la cara ventral del caracol y cubre la proboscis; los ojos (O) localizados en la base de los tentáculos cefálicos; el pene (P) que se sitúa a la derecha del caracol; dorsalmente se observa el tegumento denominado manto (M) que se pliega en el extremo posterior del caracol y recubre toda la cavidad paleal donde puede distinguirse parte del bulbo muscular (Bm); también se puede observar el aparato digestivo que se diferencia en la parte terminal hacia las gónadas (G) en las últimas vueltas del espiral de la masa visceral. En general la anatomía macroscópica del aparato venenoso de *C. austini*, es similar a la que presentan otras especies de *Conus*. La disección del aparato venenoso (Figura 15); permitió identificar el bulbo muscular que mide 5 mm de longitud, en la parte interna del bulbo se observa una estructura glandular (indicada por la flecha) donde entra el conducto venenoso proximal (Figura 15B); también se puede observar el conducto venenoso que tiene una longitud de 25 mm y presenta una consistencia homogénea a todo lo largo; el saco radular compuesto por un brazo corto y un brazo largo (Figura 15C donde solo se observa el brazo largo); las glándulas salivales de forma lobular unidas a la parte inicial del esófago (Figura 15D) y la proboscis. La parte interna de la proboscis contiene un conducto de 8 mm de longitud (Figura 16), en la base se observa una estructura glandular donde se unen las glándulas salivales y en la punta del conducto se encuentra unido el diente radular (flecha). El análisis por microscopía electrónica de reflexión de este diente radular muestra la forma característica de arpón, con una pequeña barba justo antes de la base, que se encuentra dañada por la manipulación y también se puede observar la apertura del diente que presenta material granular (Figura 17).

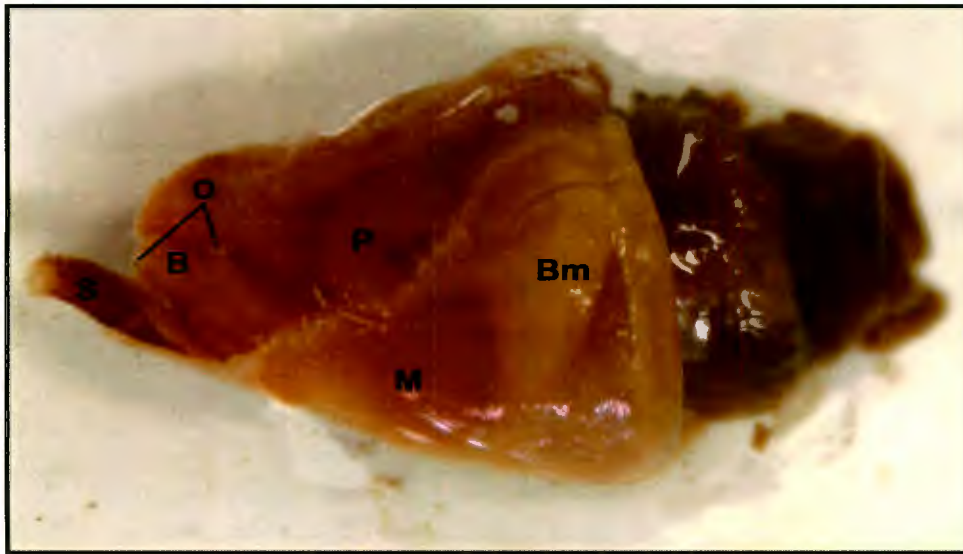


Figura 14. Cuerpo del caracol *C. austini*. Puede observarse el sifón (S), la boca (B), los ojos (O), el pene (P), el manto (M) que recubre la cavidad paleal, parte del bulbo muscular (Bm) que se encuentra recubierto por el manto; y las gónadas (G).

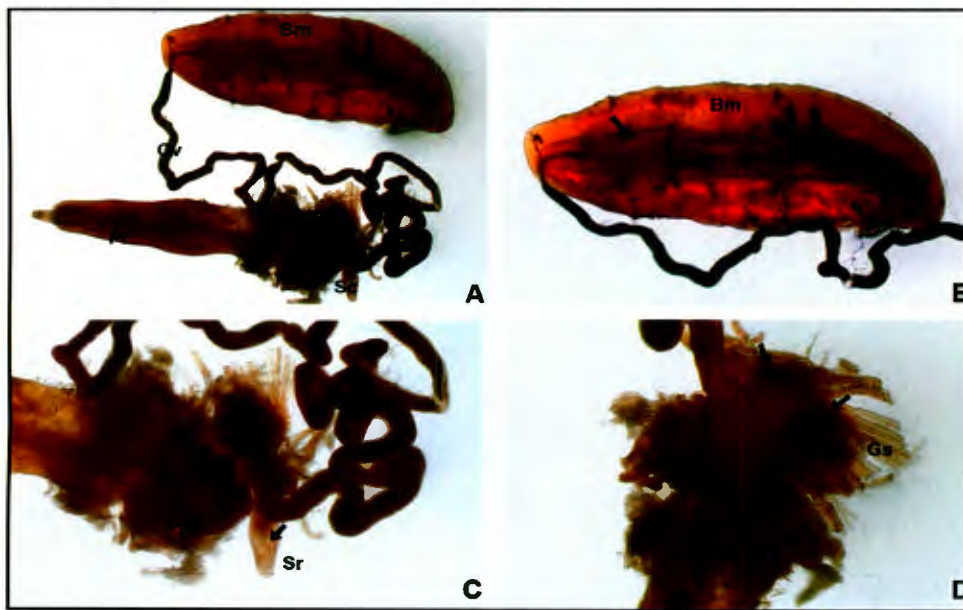


Figura 15. Aparato venenoso. En A se muestra el aparato venenoso completo formado por Bm: Bulbo muscular, Cv: Conducto venenoso, Sr: Saco radular, Gs: Glándulas salivales y Pr: Proboscis. En B se observa un acercamiento del bulbo muscular (Bm), nótese la presencia de una glándula interna señalada por la flecha y la conexión del conducto venenoso con el bulbo muscular. En C se presenta un acercamiento del saco radular (Sr), únicamente se puede observar el brazo largo de este, indicado por la flecha. En D se muestra un acercamiento de las glándulas salivales (Gs) indicadas por las flechas, nótese su forma lobular.

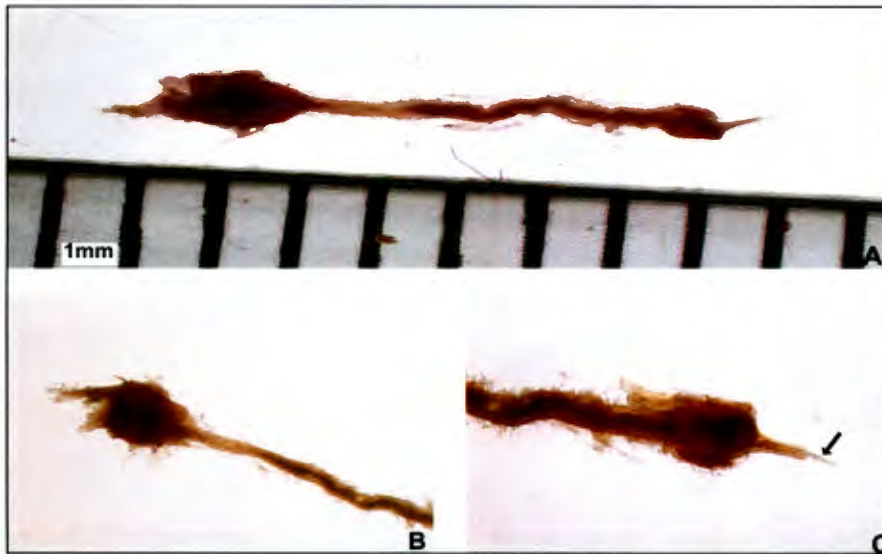


Figura 16. Conducto aislado de la proboscis. En A se presenta el conducto completo junto con el diente que mide 8 mm. En B se muestra un acercamiento donde se puede observar una estructura glandular en la que se unen las glándulas salivales accesorias. En C se puede distinguir el diente radular (flecha) sostenido por la punta de la proboscis.

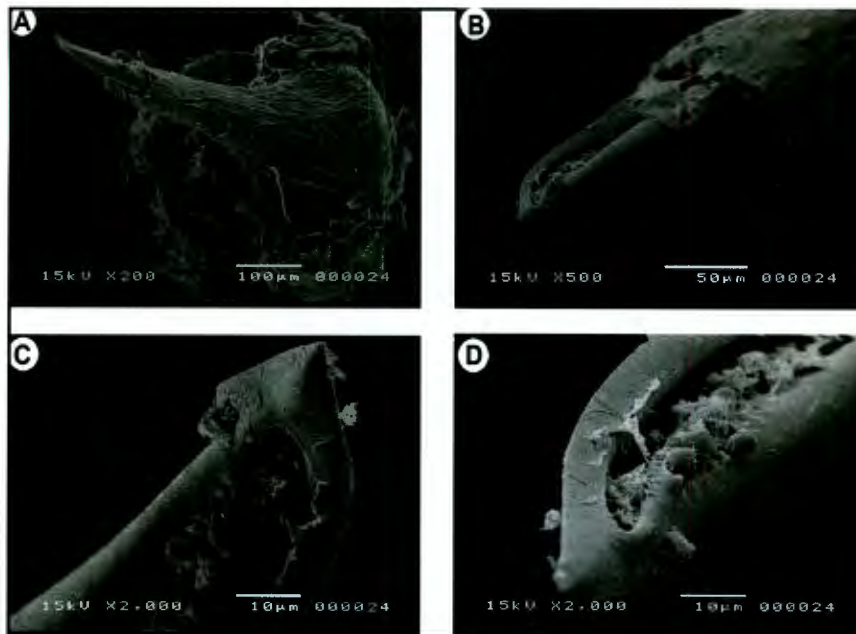


Figura 17. Microscopía electrónica de reflexión de la punta del diente radular. En A se puede observar el diente radular sostenido por la punta de la proboscis. En B se muestra la estructura del diente radular en forma de arpón. En C y D Se distingue la presencia de una pequeña barba justo antes de la base y la abertura apical que forma la ruta de salida del veneno donde se puede observar material granular.

Histología del aparato venenoso de *C. austini*

Microscopía de luz

El análisis de los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina del aparato venenoso indican que:

El bulbo muscular distal, medio y proximal en un corte transversal presentan dos zonas: una zona de músculo liso (M) y una zona que corresponde a la luz del bulbo (L) (Figura 18B). La zona de músculo liso (M) presenta fibras longitudinales, transversales y oblicuas, las cuales se encuentran unidas por tejido conectivo fibroelástico que sirve de sostén; en algunas regiones las fibras musculares se agrupan formando sincisios (flecha). Las células musculares lisas se encuentran agrupadas de manera compacta, los contornos de las células varían de tamaño, lo que indica el alargamiento de las células, confirmado por el hecho de que sólo en unas cuantas células se ven núcleos (círculo) (Figura 18A, donde solo se presenta el bulbo muscular medio).

En un corte transversal de la unión del conducto venenoso con el bulbo muscular se observa el conducto venenoso de forma esférica y una zona de músculo liso que corresponde al bulbo muscular (Figuras 19 A y B). El conducto venenoso que se une al bulbo muscular presenta una capa externa gruesa de tejido conectivo (C), y la luz del conducto (L) con numerosos gránulos de veneno (g) (Figura 19C). En la porción proximal del bulbo muscular (Bmp) se observa la zona de músculo liso formado por dos capas, una capa externa longitudinal y una capa interna circular; también se presentan algunos sincisios (flecha) formados por las fibras musculares (Figura 19D)

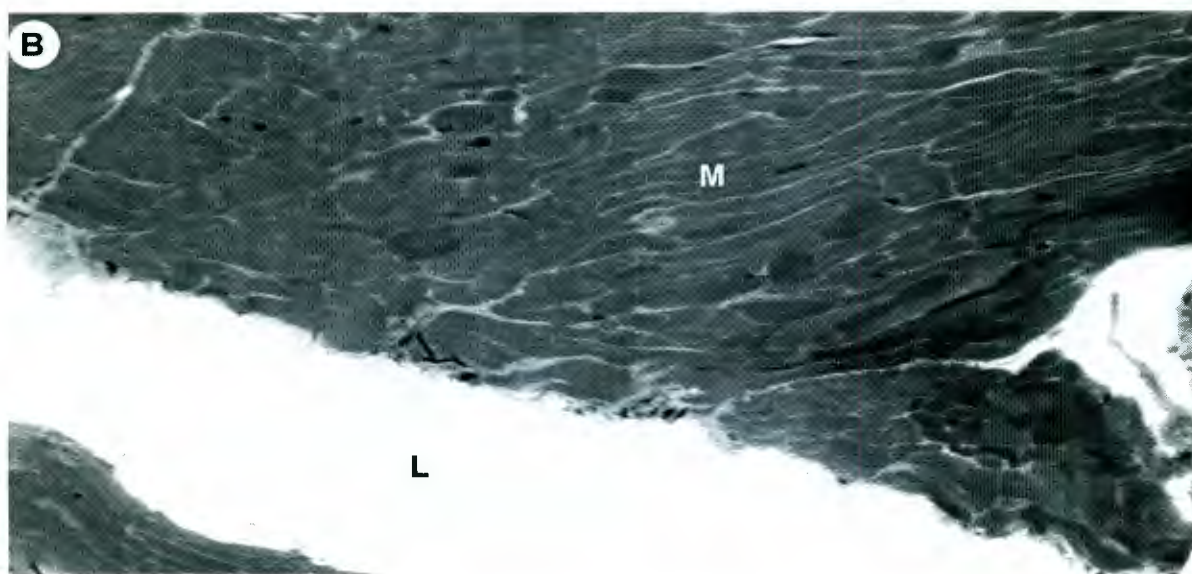
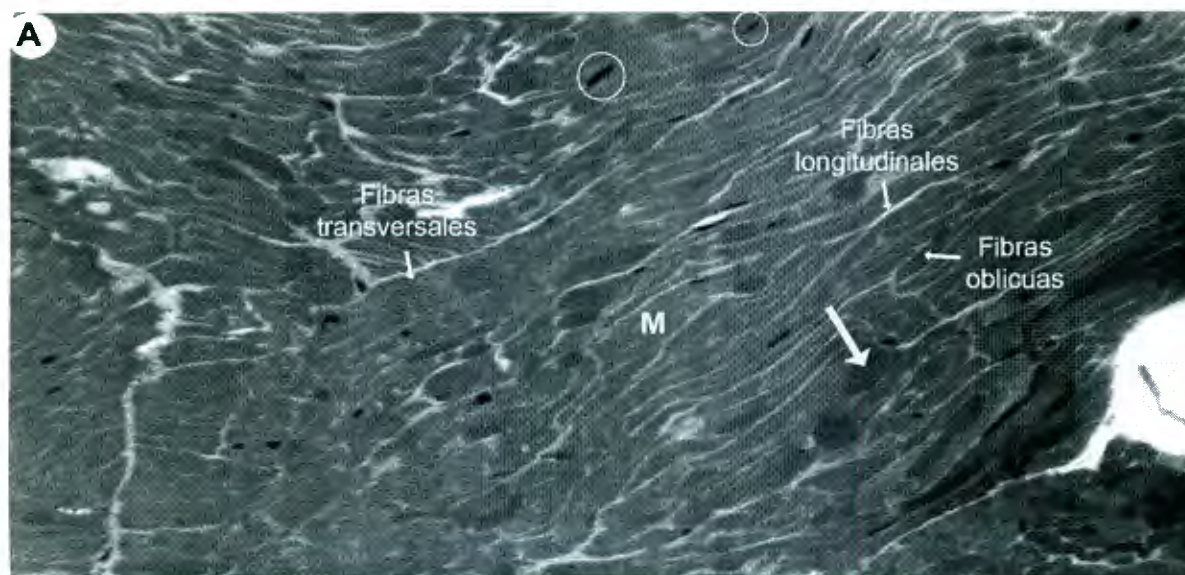


Figura 18. Bulbo muscular medio. En A se muestra la zona de tejido muscular (M), donde se distinguen fibras musculares transversales, longitudinales y oblicuas unidas por tejido conectivo, también se pueden observar sincisios formados por estas fibras (flecha). En B se presenta la luz del bulbo muscular (L).

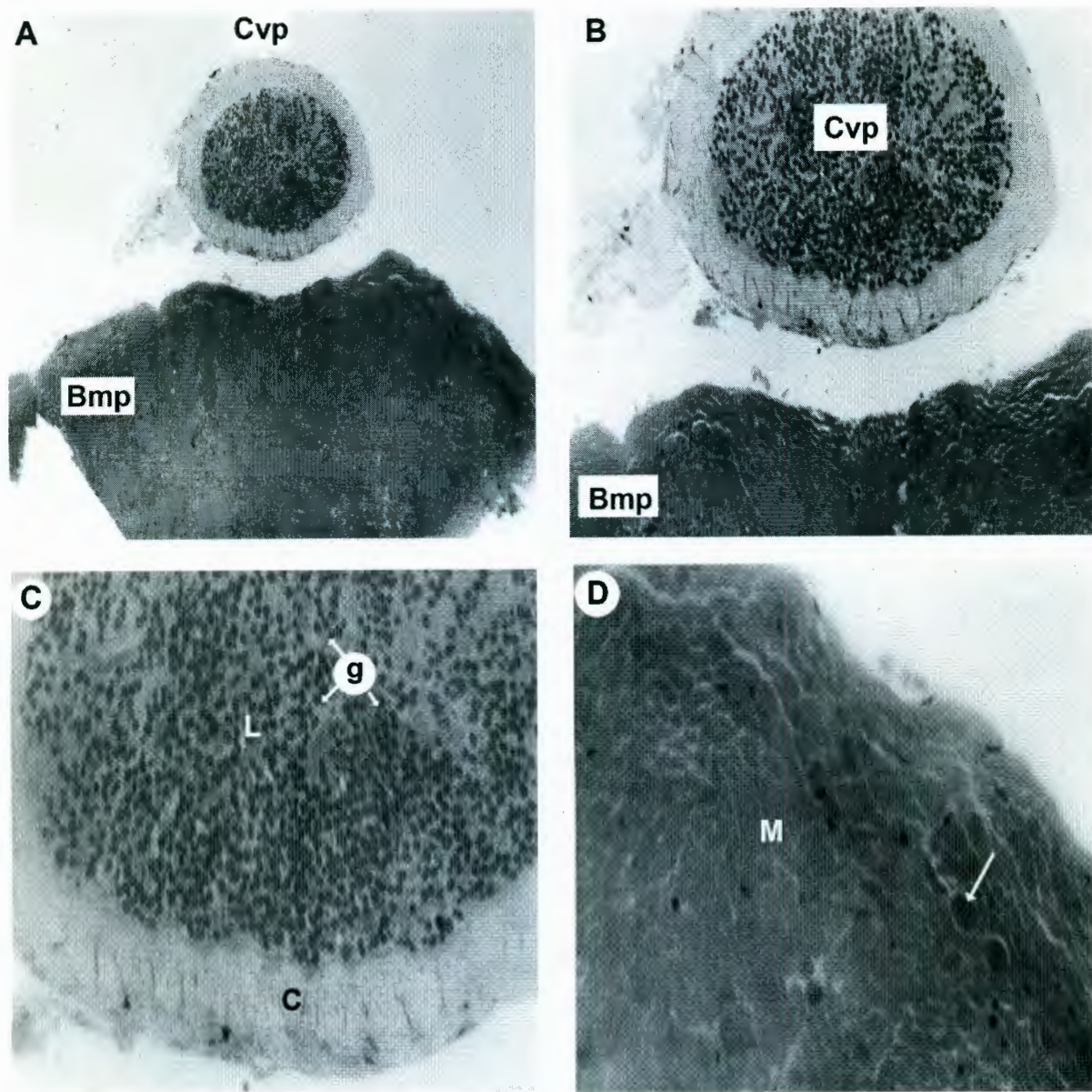


Figura 19. Unión del conducto venenoso con bulbo muscular al microscopio de luz de un corte semifino teñido con azul de toluidina. En A y B (10x y 20x respectivamente) se muestra la porción proximal (Cvp) del conducto venenoso conectado con el bulbo muscular (Bmp). En C se presenta un acercamiento (40x) del conducto venenoso (Cvp) donde puede observarse una capa externa de tejido conectivo (C) y la luz el conducto (L) que contiene numerosos gránulos de veneno (g). En D se muestra un acercamiento (40x) del bulbo muscular, donde puede observarse que esta formado principalmente por músculo liso (M), la flecha indica un sincisio formado por fibras musculares.

El conducto venenoso proximal, cerca de la unión con el bulbo muscular, presenta una delgada capa externa de tejido conectivo, formada por colágena (C) y la luz del conducto (L) separada completamente de la capa de tejido conectivo (Figuras 20 A y B). La luz del conducto (L) contiene pocos gránulos de veneno (g) ovoides, esféricos; de una variedad de tamaños y poco diferenciados (Figura 20C).

En el conducto venenoso medio, se observa la misma capa externa de colágena (C) mencionada, y la luz del conducto (L); que al igual que en el conducto venenoso proximal, se encuentran separadas las dos capas (C) y (L) (Figuras 21 A y B). En la luz del conducto (L) se presentan mayor cantidad de gránulos de veneno (g) y mejor diferenciados que en el conducto venenoso proximal (Figura 21 C).

El conducto venenoso distal, cerca de la unión con la faringe, presenta un aumento de grosor. Se observa una densa capa de colágena (C) unida a la luz del conducto (L) (Figuras 22 A y B). La luz del conducto (L) presenta una consistencia cremosa y una gran cantidad de gránulos de veneno (g) bien diferenciados (Figura 22C). Por lo que puede observarse que el grosor del conducto venenoso distal es mayor y se va adelgazando a medida que se acerca a la unión con el bulbo muscular, además de presentarse un proceso de diferenciación de los gránulos de veneno que va desde la porción más proximal del conducto donde casi no se distinguen hasta el conducto venenoso distal donde se pueden apreciar perfectamente.

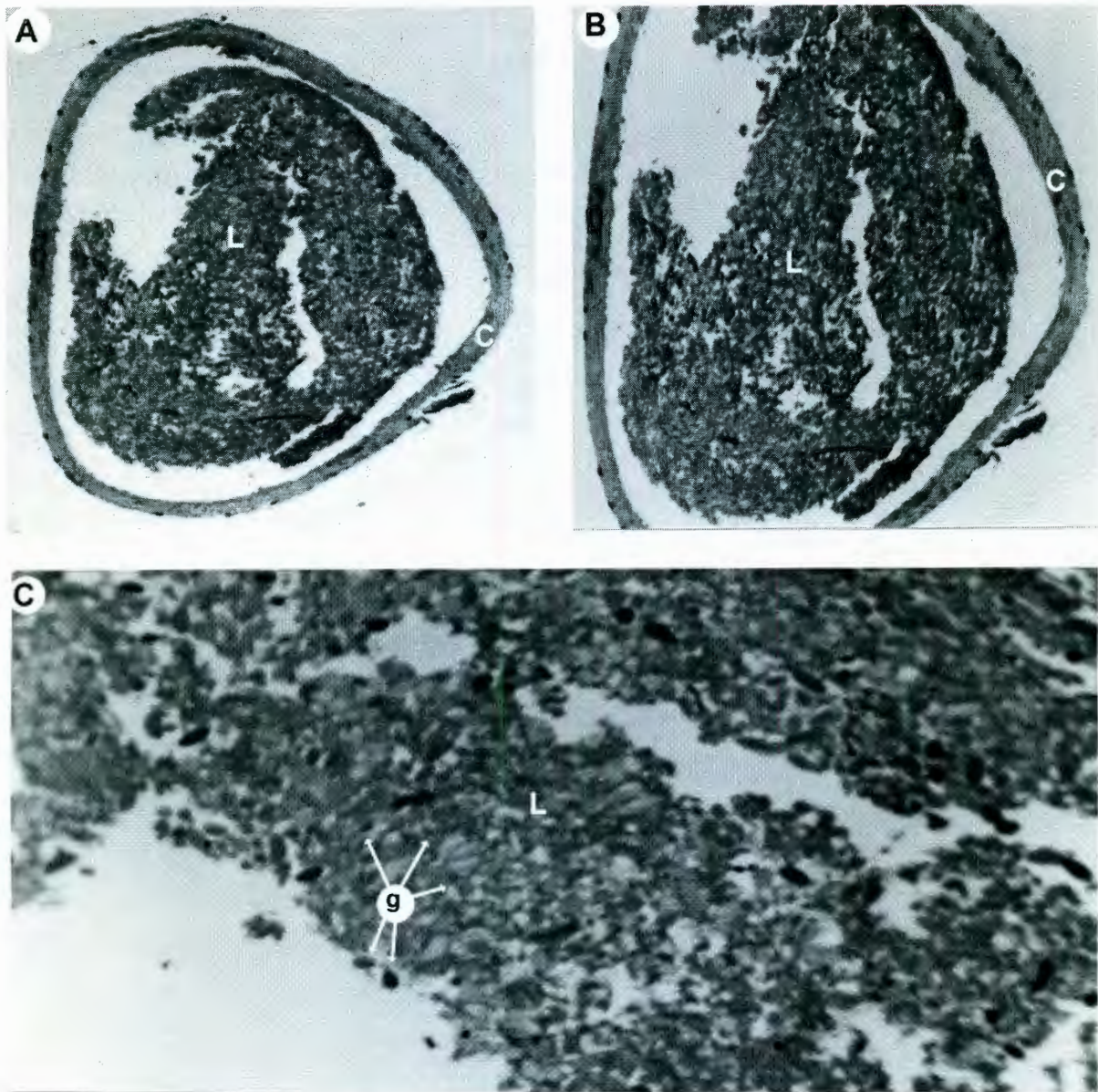


Figura 20. Conducto venenoso proximal. En A se observa una imagen panorámica (10x), donde puede distinguirse una capa externa de colágena (C) y la luz del conducto (L). En B se muestra un acercamiento (20x). En C se presenta una imagen amplificada (40x) de la luz del conducto (L) que contiene algunos gránulos de veneno (g).

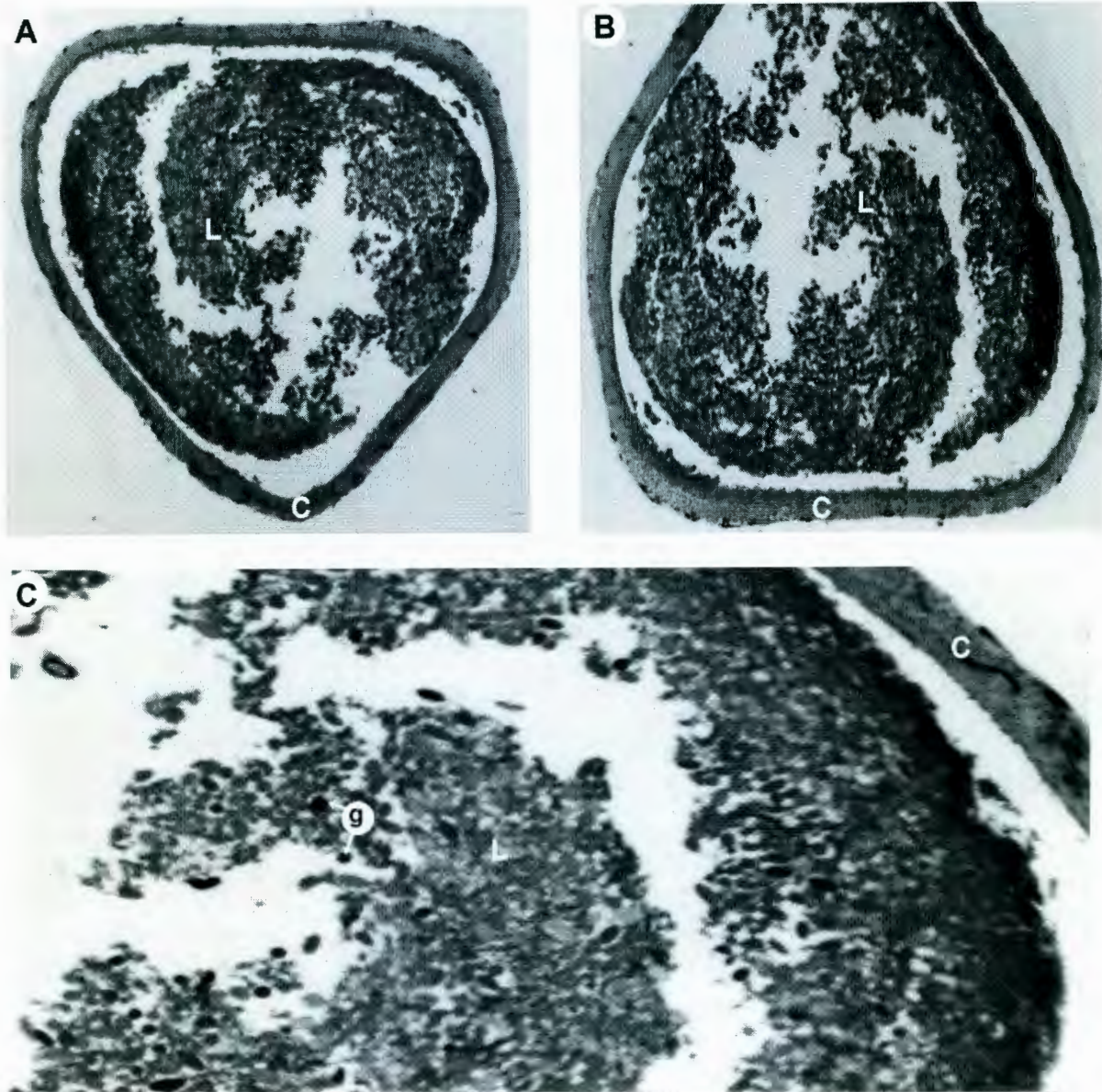


Figura 21. Conducto venenoso medio. En A se observa una imagen panorámica (10x), donde puede distinguirse una capa externa de colágena (C) y la luz del conducto (L). En B se presenta un acercamiento (20x). En C se muestra una imagen ampliada (40x) de la luz del conducto (L) que contiene abundantes gránulos de veneno (g).

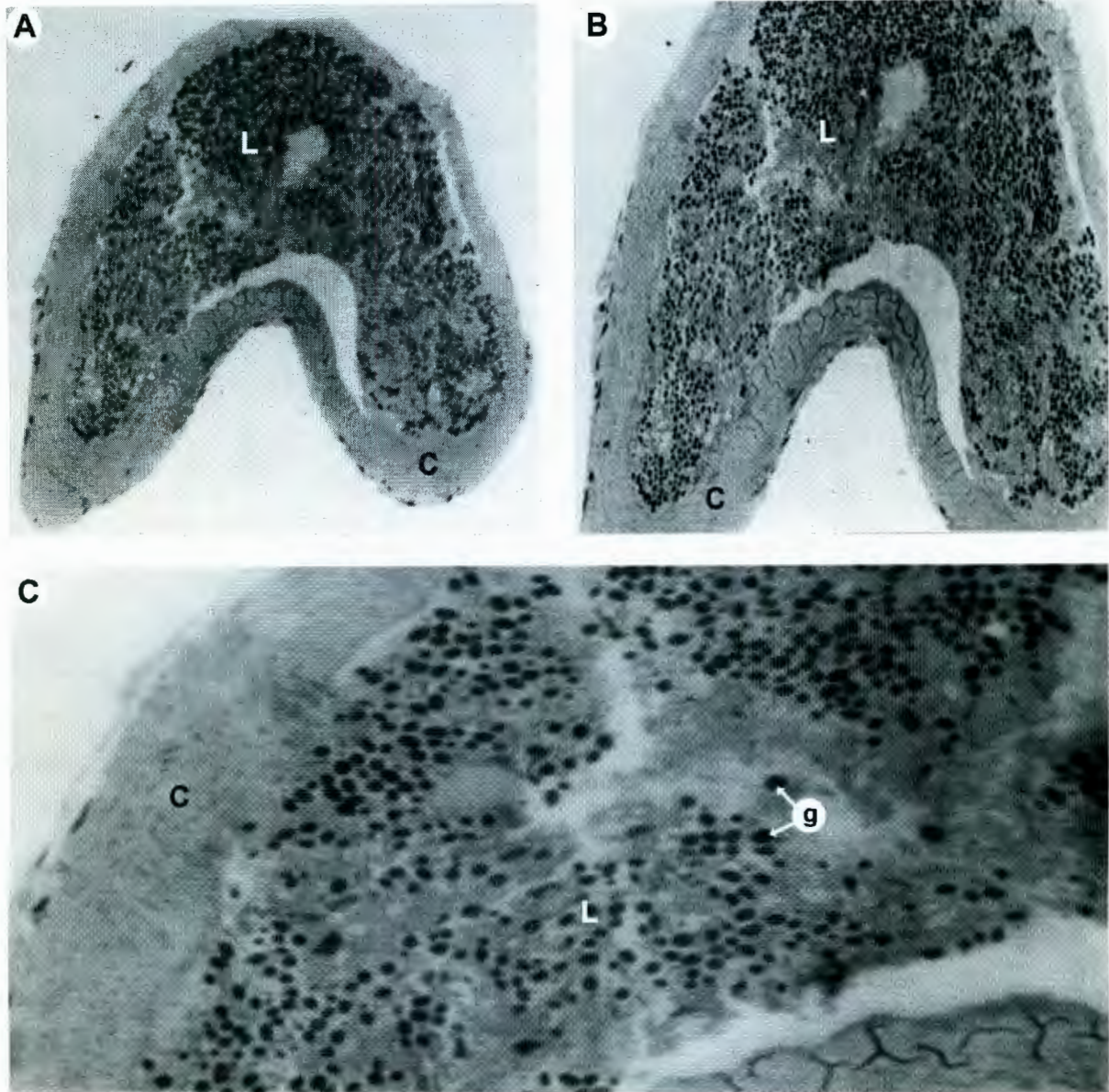


Figura 22. Conducto venenoso distal. En A se observa una imagen panorámica (10x), donde puede distinguirse una capa externa de colágena (C) y la luz del conducto (L). En B se presenta un acercamiento (20x). En C se muestra una imagen ampliada (40x) de la luz del conducto (L) llenó de gránulos de veneno (g) bien diferenciados.

El brazo corto del saco radular se observa como una estructura tubular que presenta una vaina de tejido conjuntivo asociada a la capa externa de colágena (C) y la luz (L) (Figuras 24 A y B). La luz del saco radular (L) presenta las hojas de quitina enrolladas que forman al diente radular maduro (círculo blanco) rodeadas de músculo, observándose como cuerpos esféricos, además se observa en la luz (L) algunos restos de material granular (Figura 24C).

En el brazo largo del saco radular se observa una capa externa densa constituida por músculo liso (M) y la luz del saco (L) en la que se pueden observar pliegues longitudinales (flecha blanca) de músculo asociado con tejido conectivo, donde se colocan los dientes radulares en proceso de maduración, se pueden observar algunos dientes inmaduros colocados en estos pliegues (flecha negra) (Figura 23).

El análisis de las glándulas salivales muestra una capa fibromuscular externa (F), la luz de los conductos glandulares (L), un epitelio secretor (flecha) y el producto de secreción (S) (Figura 25).

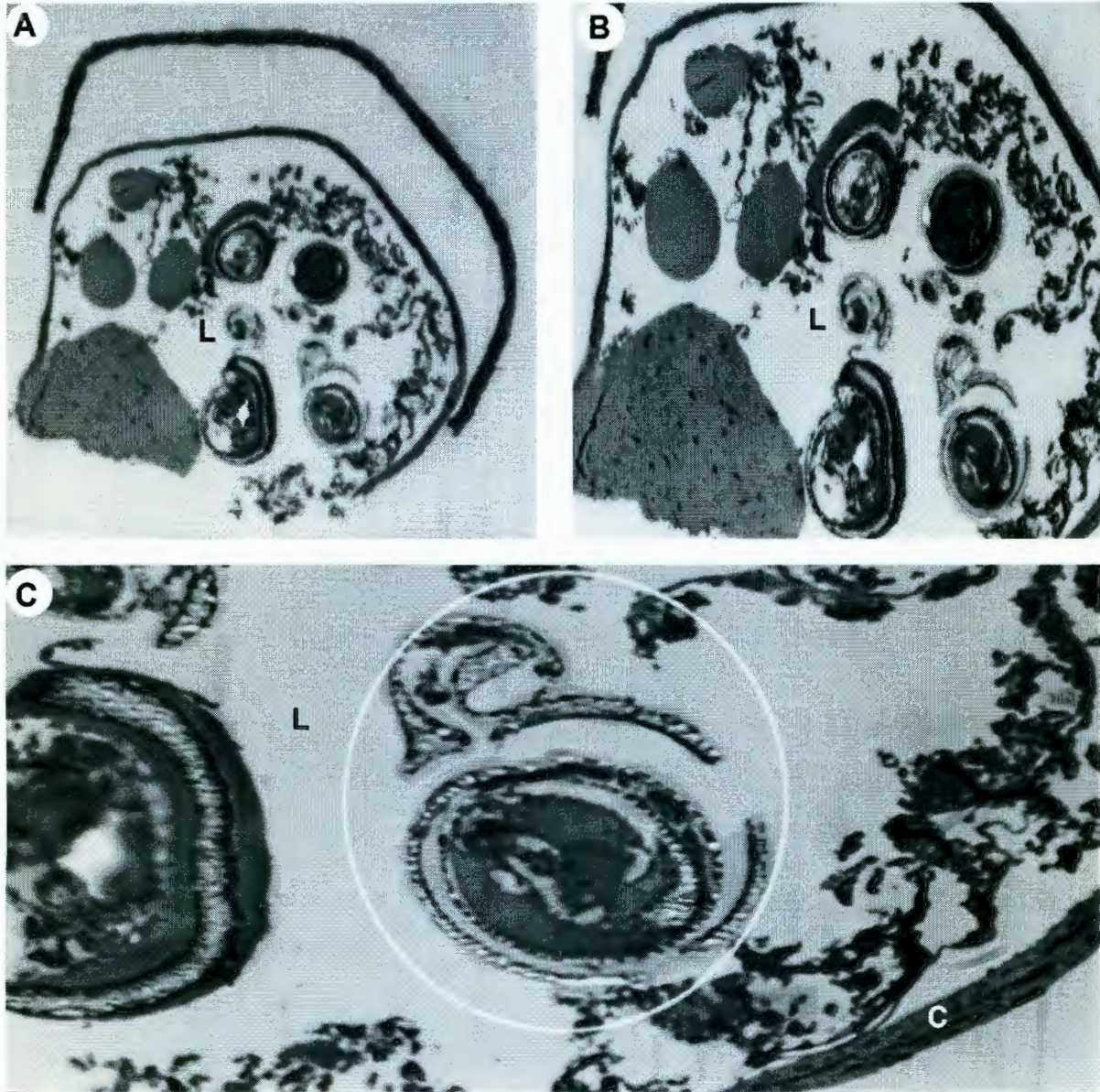


Figura 23. Brazo corto del saco radular. En A se observa una imagen panorámica (10x), donde se muestra la capa externa constituida por músculo liso (M) y la luz correspondiente al saco radular (L). En B se muestra un acercamiento del brazo corto (20x). En C se presenta una imagen amplificada de la luz (40x) que muestra los pliegues longitudinales, indicados por la flecha blanca donde se colocan los dientes radulares maduros señalado por la flecha negra.

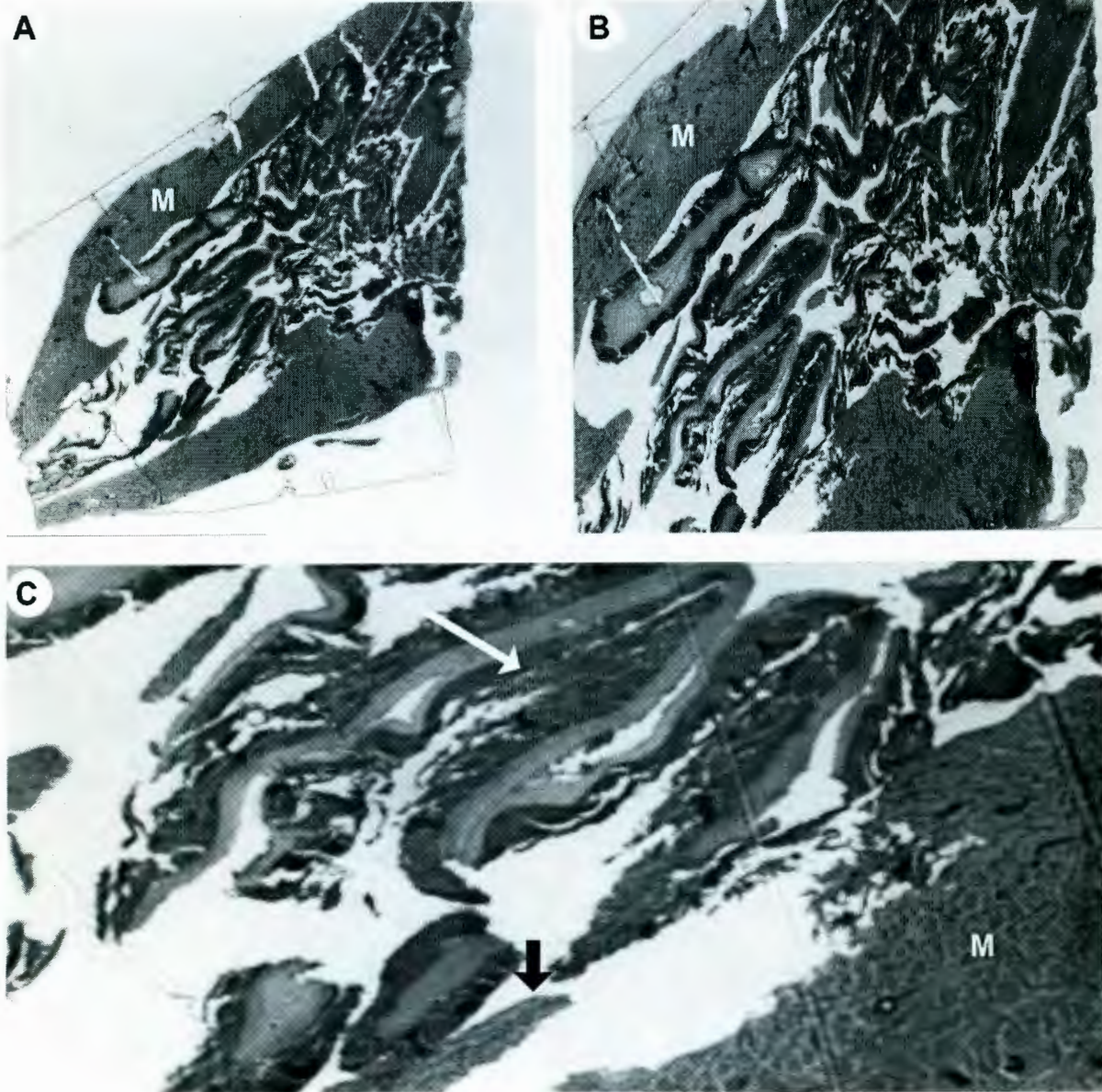


Figura 24. Brazo largo del saco radular. En A se presenta una imagen panorámica (10x), donde puede observarse una vaina de tejido conjuntivo y la luz (L). En B se muestra un acercamiento del brazo largo (20x). En C se observa una imagen a (40x) donde puede distinguirse, la capa externa de colágeno (C) y las hojas de quitina enrolladas que forman al diente radular (círculo blanco).

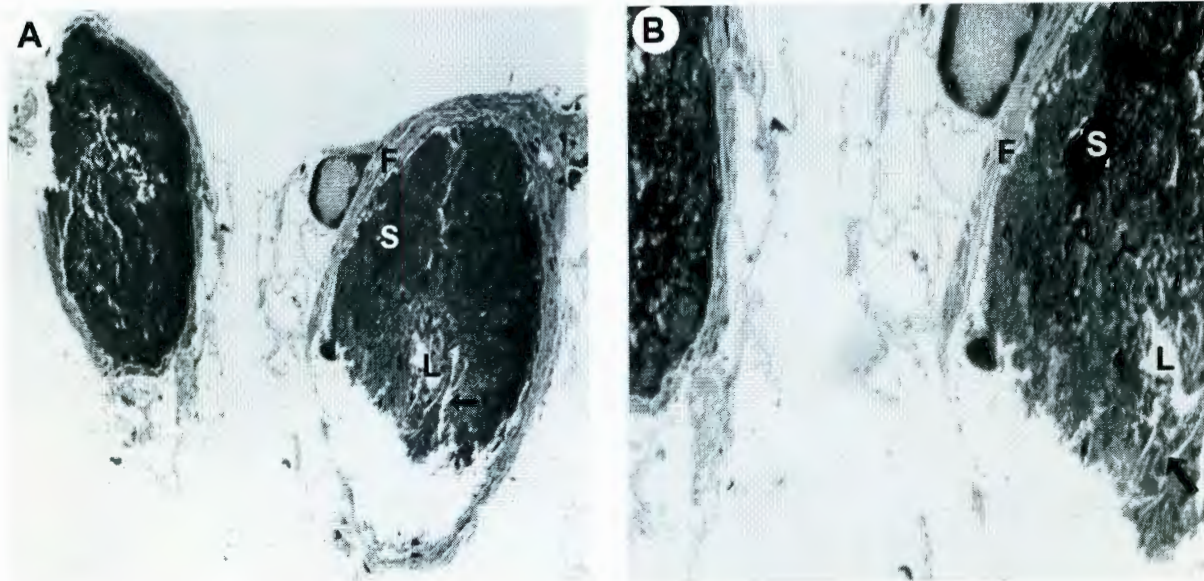


Figura 25. Glándulas salivales accesorias. En A y B (20x y 40x) se puede observar una capa fibromuscular (F), el epitelio secretor (flecha), la luz de los conductos glandulares (L) y el producto de secreción (S).

Microscopia electrónica de transmisión

Las características ultraestructurales de los cortes finos del aparato venenoso indican que:

El bulbo muscular medio presenta dos capas densas de músculo liso (M) unidas por una gruesa capa de tejido conectivo (C), que contiene delgadas fibras longitudinales y transversales de colágena que siguen un trayecto ligeramente ondulante, en un acercamiento de estas fibras se puede observar una discreta estriación longitudinal (seudoestrías), reflejo de la presencia de miofibrillas que recorren toda la longitud de la fibra (Figura 26A). También se observan algunos cuerpos residuales redondeados (flecha), con una densidad electrónica elevada, los cuales poseen acumulaciones de gránulos densos en una matriz más clara y se ubican al final de las fibras musculares (Figura 26B).

El bulbo muscular proximal, cerca de la unión con el conducto venenoso, presenta densas capas de músculo liso (M) con una disposición transversal y unidas por una delgada capa de tejido conjuntivo (flecha); también puede observarse una gruesa capa de tejido conectivo (C) no bien delimitada, seguida de una capa de tejido muscular (m) (Figura 27A). Se observan las capas de músculo liso (M) separadas por tejido conectivo (C) que también contiene músculo, a manera de una cápsula; forman una estructura altamente flexible (Figura 27B). También se observan cuerpos densos que podrían ser placas de unión así como algunas estructuras de inervación (flechas) (ver Figuras 27 C y D). En general el bulbo muscular presenta fibras musculares (M) en una disposición transversal y unidas por una delgada capa de tejido conectivo (flecha) (Figura 28 A y B continuación).

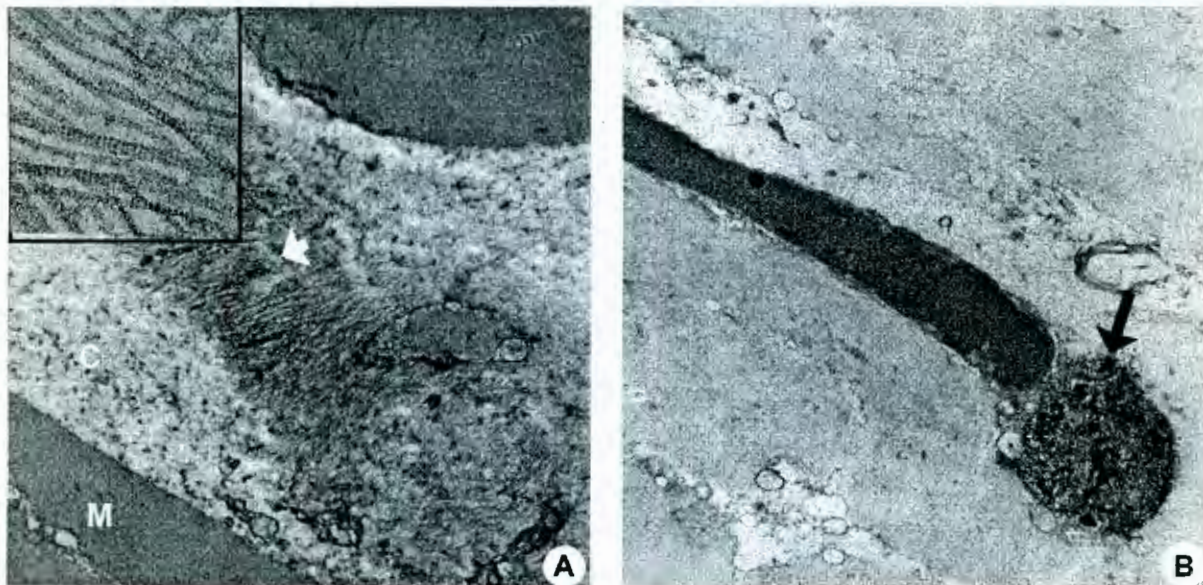


Figura 26. Fotografías del bulbo muscular medio. En A se observan dos capas de músculo liso (M) unidas por tejido conectivo (C) que contiene fibras longitudinales y transversales de colágena (flecha), en la parte superior izquierda se muestra un acercamiento de las fibras de colágena, nótese la presencia de seudoestrías. En B se presenta un cuerpo residual al final de una fibra muscular, indicado por la flecha.

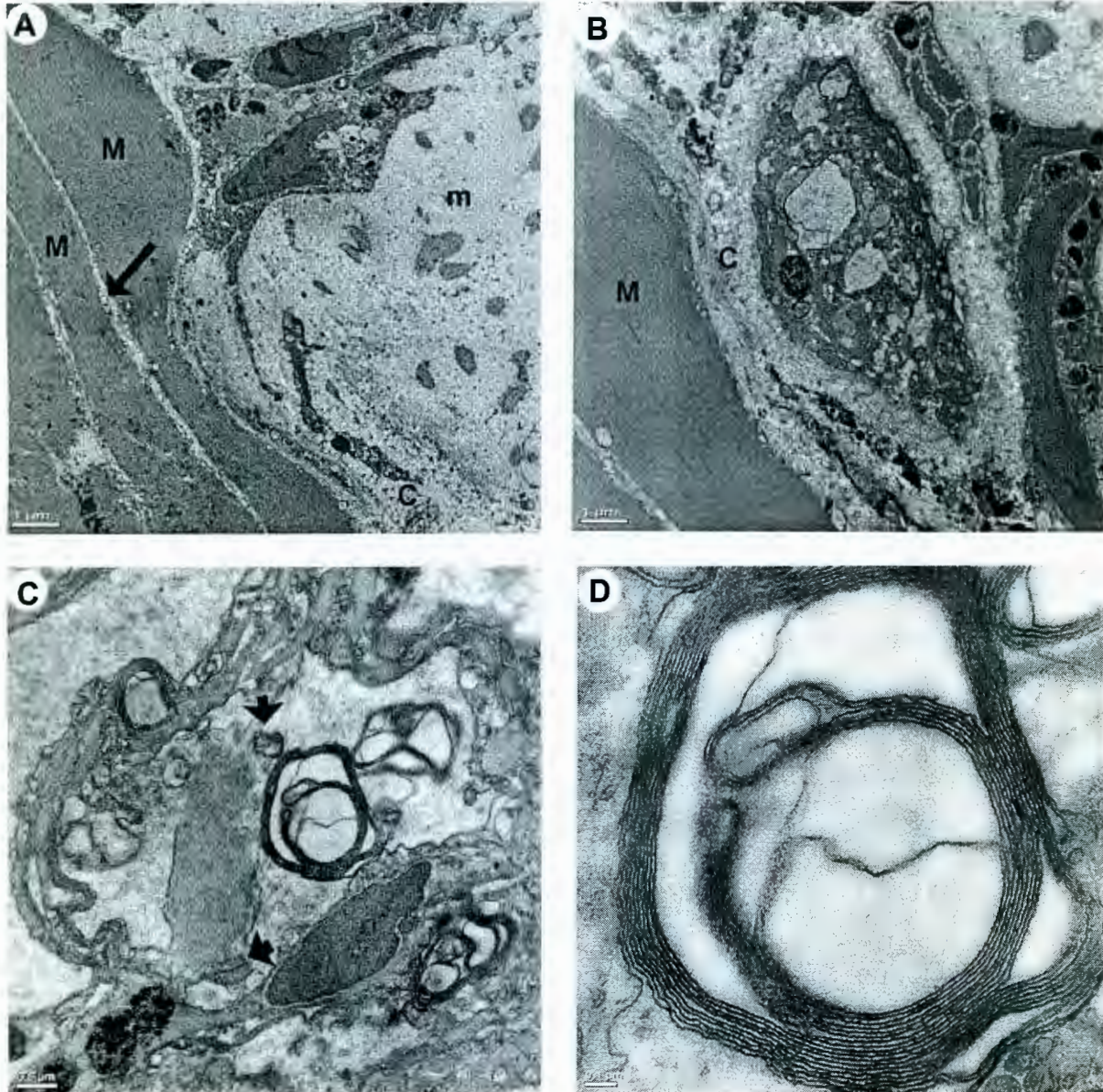


Figura 27. Fotografías del bulbo muscular proximal. En A se presentan capas longitudinales de músculo liso (M) unidas por una fina capa de tejido conectivo (flecha). En B se observan las capas de músculo liso (M) separadas por tejido conectivo (C) formando una luz, que también contiene músculo. En C se muestran algunas inervaciones (flecha) dentro del tejido conectivo. En D se presenta un acercamiento de un cuerpo residual.

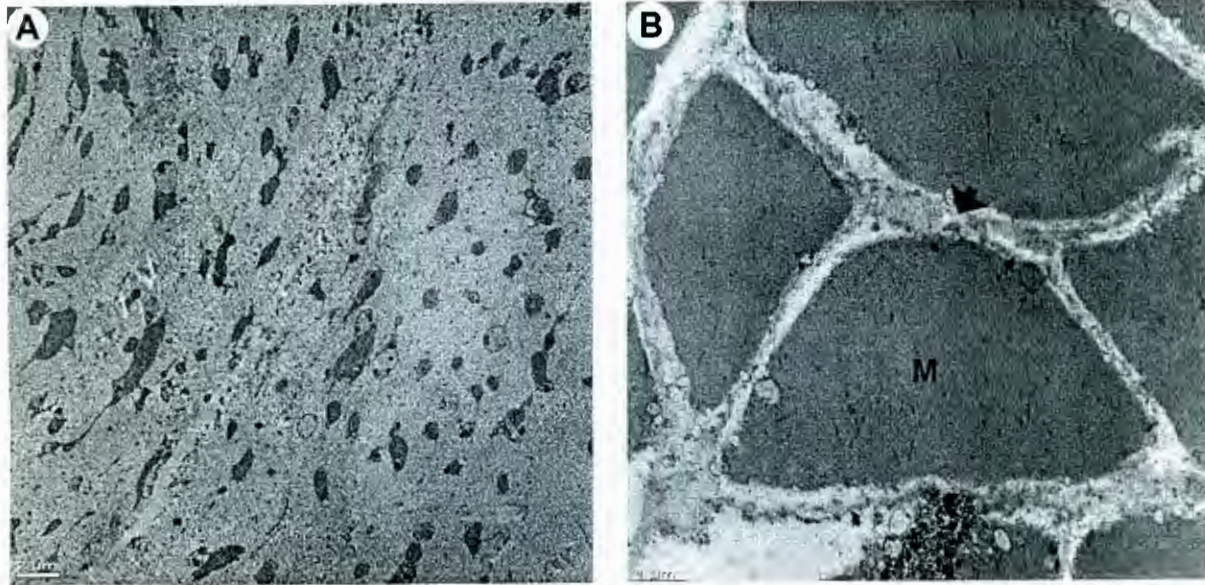


Figura 28. Fotografías del bulbo muscular proximal (continuación). En A se observa la capa de tejido conectivo. En B se presenta la disposición transversal de las fibras de músculo liso (M) separadas por tejido conectivo (flecha).

En la unión del conducto venenoso con el bulbo muscular se observa una capa externa (C) constituida principalmente por delgadas fibras de colágena (F) orientadas longitudinalmente. Se encuentran algunas estructuras embebidas de manera dispersa en la capa de tejido conectivo (C) que probablemente sean células musculares (m). La superficie interna de esta capa de colágena es una lamina basal (lb) discontinua (Figuras 29 A y B). La luz del conducto (L), presenta numerosos gránulos de veneno (g) de forma esférica u ovoide que muestran una variedad de tamaños; igualmente pueden observarse algunos gránulos fragmentados y se distinguen gránulos de por lo menos dos distintas densidades electrónicas (a y b) (Figura 29 C); estos gránulos de veneno se encuentran rodeados por una capa membranosa (Figura 29D).

En el conducto venenoso proximal, cerca de la unión con el bulbo muscular, la capa externa de colágena (C) presenta una mayor cantidad de lo que podrían ser células musculares (m) y una lamina basal (lb) amorfa (Figura 30A). En la luz del conducto (L) se observan numerosos restos celulares (rc) que posiblemente provengan de la región distal (cerca de la faringe) del conducto venenoso (Figura 30B). Esta porción del conducto, presenta abundantes inclusiones (flecha) y muy pocos gránulos de veneno (g) que muestran las mismas diferencias en densidad electrónica (a y b) encontradas a todo lo largo del conducto venenoso (Figuras 30 C y D).

El conducto venenoso medio, presenta una capa externa bien definida, compuesta por tejido muscular (M) en el que se observan numerosas células musculares (m) distribuidas homogéneamente; así como tejido conectivo (C) en el que pueden observarse las fibras de colágena y una delgada lamina basal (cuadrado) (Figura 31A). En la luz del conducto venenoso medio (L) se observan algunos gránulos de veneno de dos tipos (1 y 2); los gránulos del tipo 1 presentan una forma irregular, son de mayor tamaño y muestran cuerpos densos en los bordes de la membrana que los rodea; los gránulos de veneno del tipo 2 son similares a los encontrados en otras regiones del conducto venenoso, estos muestran una forma regular y una mayor densidad electrónica (Figuras 31 B, C y D).

En el conducto venenoso distal, cerca de la unión con la faringe, se observa una capa externa (C) menos definida, así como una delgada lamina basal (lb) (Figura 32 A). La luz del conducto (L) presenta un aumento sustancial en el número de gránulos de veneno (g) que se encuentran distribuidos homogéneamente a lo largo de esta porción del conducto y muestran una menor variabilidad tanto en forma como en tamaño (Figuras 32 A y B). En la luz de esta porción media del conducto se observan gránulos de veneno con diferencias similares en la densidad electrónica (a y b) a las presentes en otras porciones del conducto venenoso y un tipo diferente de gránulo de veneno (3) que muestra una forma esférica y rodeado de una capa membranosa; igualmente se observan los tipos de gránulos (1 y 2) presentes en el conducto medio (Figura 32 C y D).

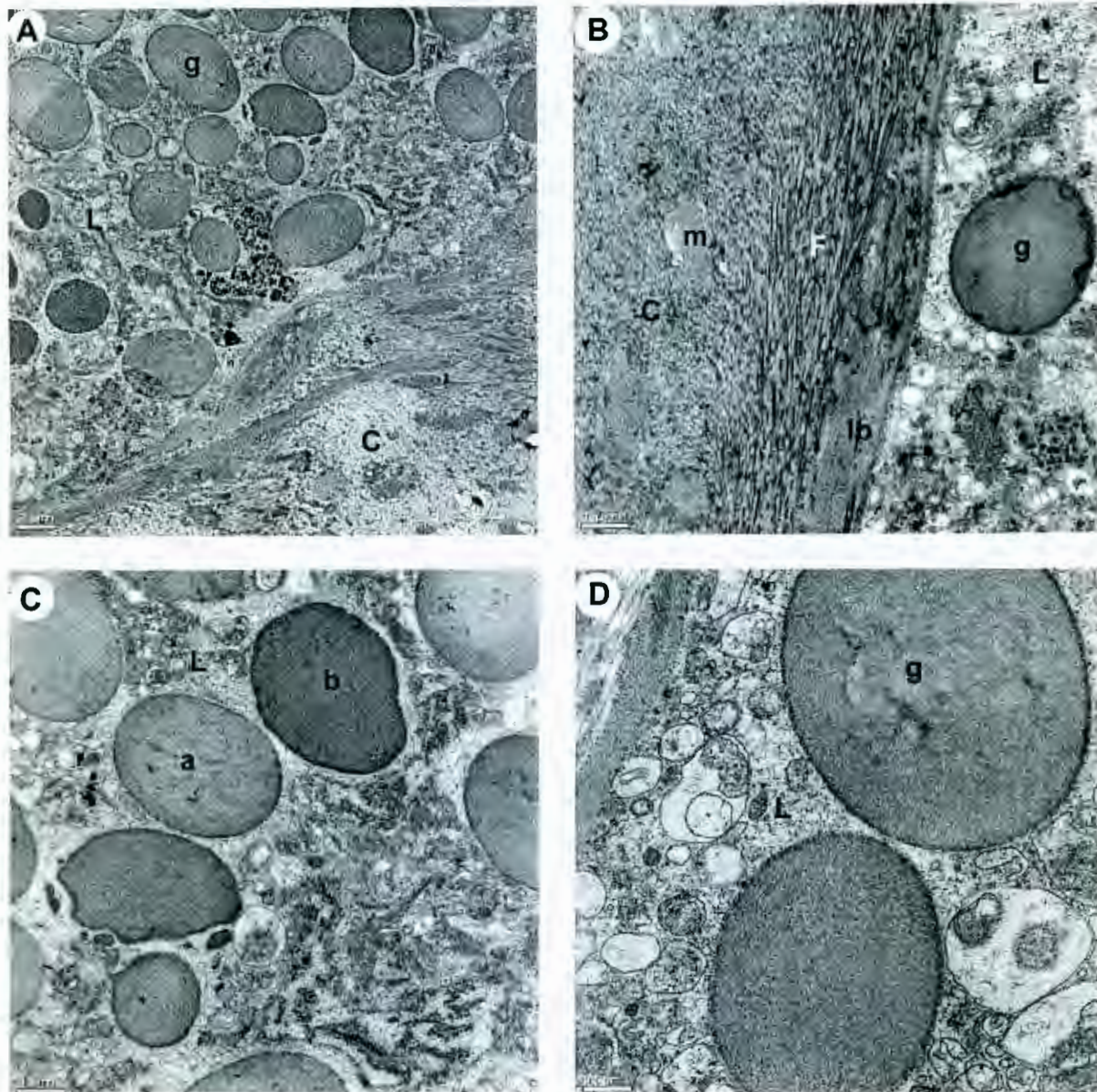


Figura 29. Fotografías de la unión del conducto venenoso con el bulbo muscular. En A se muestra una imagen panorámica del conducto venenoso, donde puede observarse la capa externa de colágena (C) y la luz del conducto (L) que contiene abundantes gránulos de veneno (g). En B se presenta un acercamiento de la capa de colágena (C), donde se ilustra la lamina basal (lb), las fibras de colágena (F); nótese la luz del conducto (L) y un gránulo de veneno (g). C es un acercamiento de la luz del conducto (L), donde pueden observarse gránulos de veneno (g) de distintas densidades (a y b). En D se observan a mayor amplificación los gránulos de veneno, donde se distingue la membrana que los rodea.

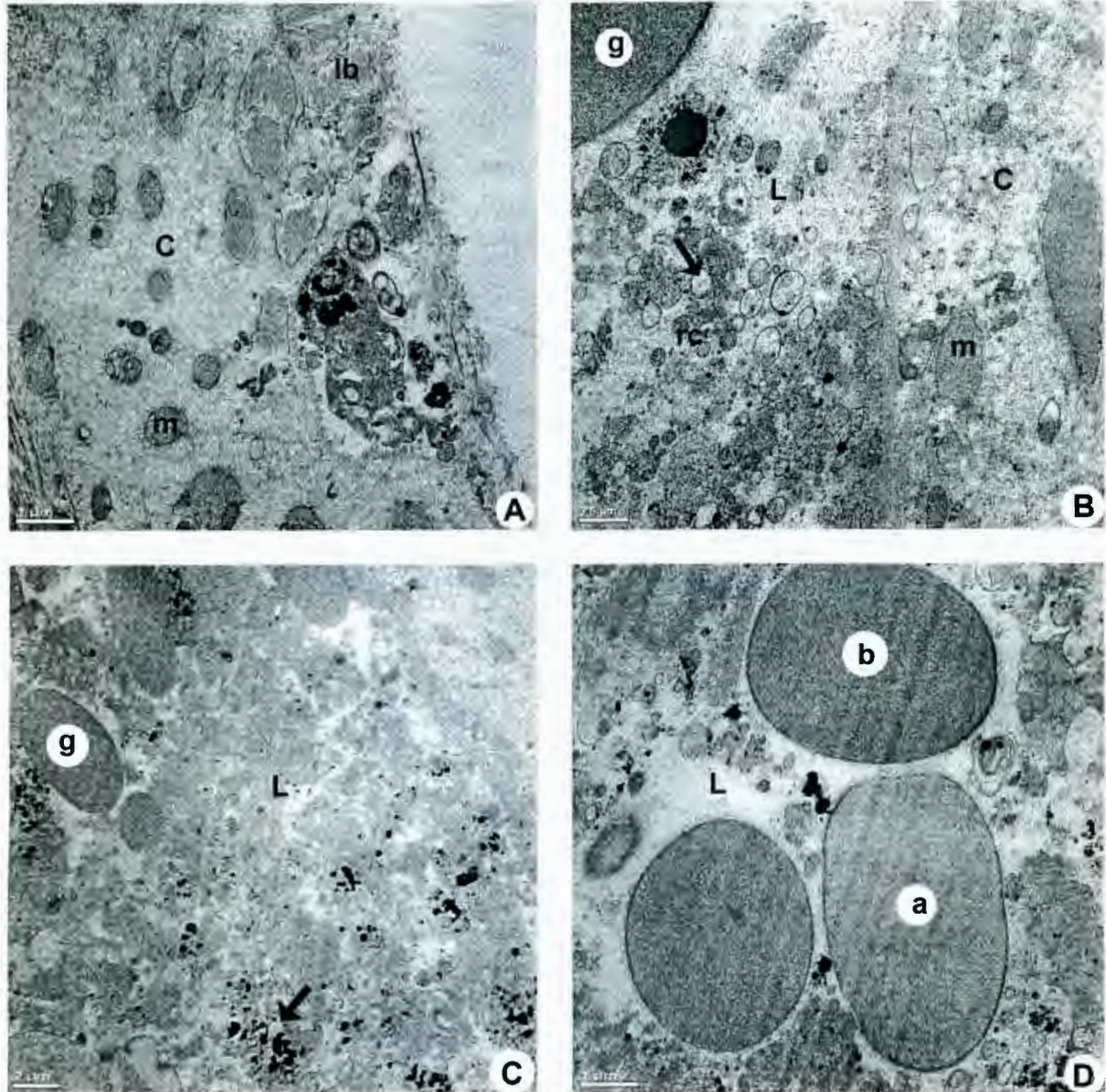


Figura 30. Fotografías del conducto venenoso proximal. En A se presenta una imagen panorámica en la que se puede distinguir la capa externa de colágena (C), donde se encuentran células musculares (m) embebidas en la capa de tejido conectivo y una lamina basal amorfa (lb). En B se observa la luz del conducto (L), se distingue una gran cantidad de restos celulares y parte de un gránulo de veneno (g). En C se muestran algunos gránulos (g) y restos celulares (rc) (flecha). D es un acercamiento de los gránulos de veneno, donde puede observarse la diferencia en electrodensidad de estos (a y b).

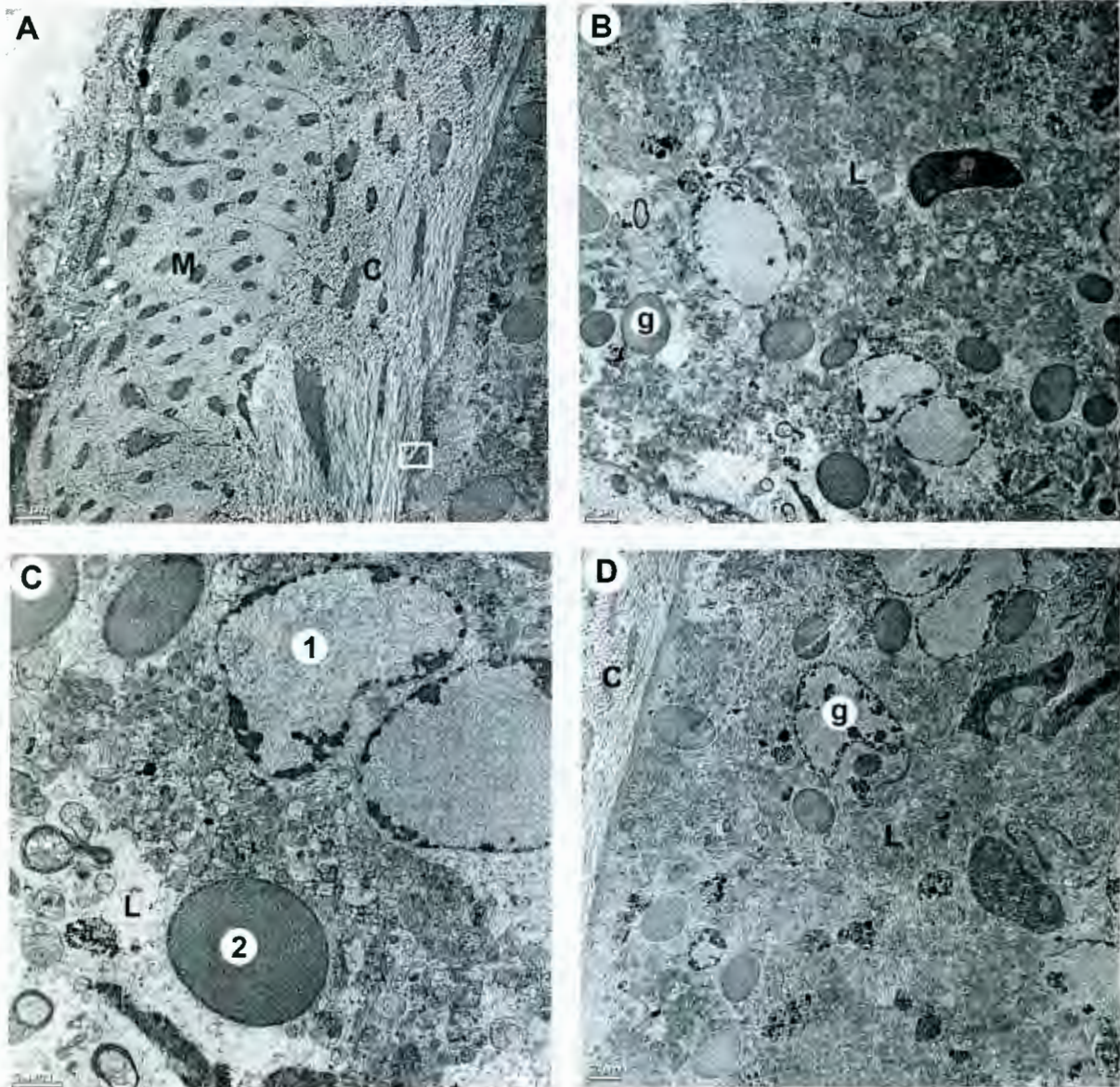


Figura 31. Fotografías del conducto venenoso medio. En A se observa la capa externa de colágena (C), la luz del conducto (L); que contiene algunos gránulos de veneno (g). En B se presenta la luz del conducto (L) que contiene algunos gránulos de veneno (g), nótese la variedad en forma, tamaño y electrodensidad de estos. En C se muestra un acercamiento de los gránulos de veneno (g), donde puede distinguirse dos tipos de gránulos (1 y 2). En D se puede observar la capa externa del conducto, compuesta de tejido muscular (M), tejido conectivo (C) y la lámina basal (lb) señalada por el rectángulo blanco.

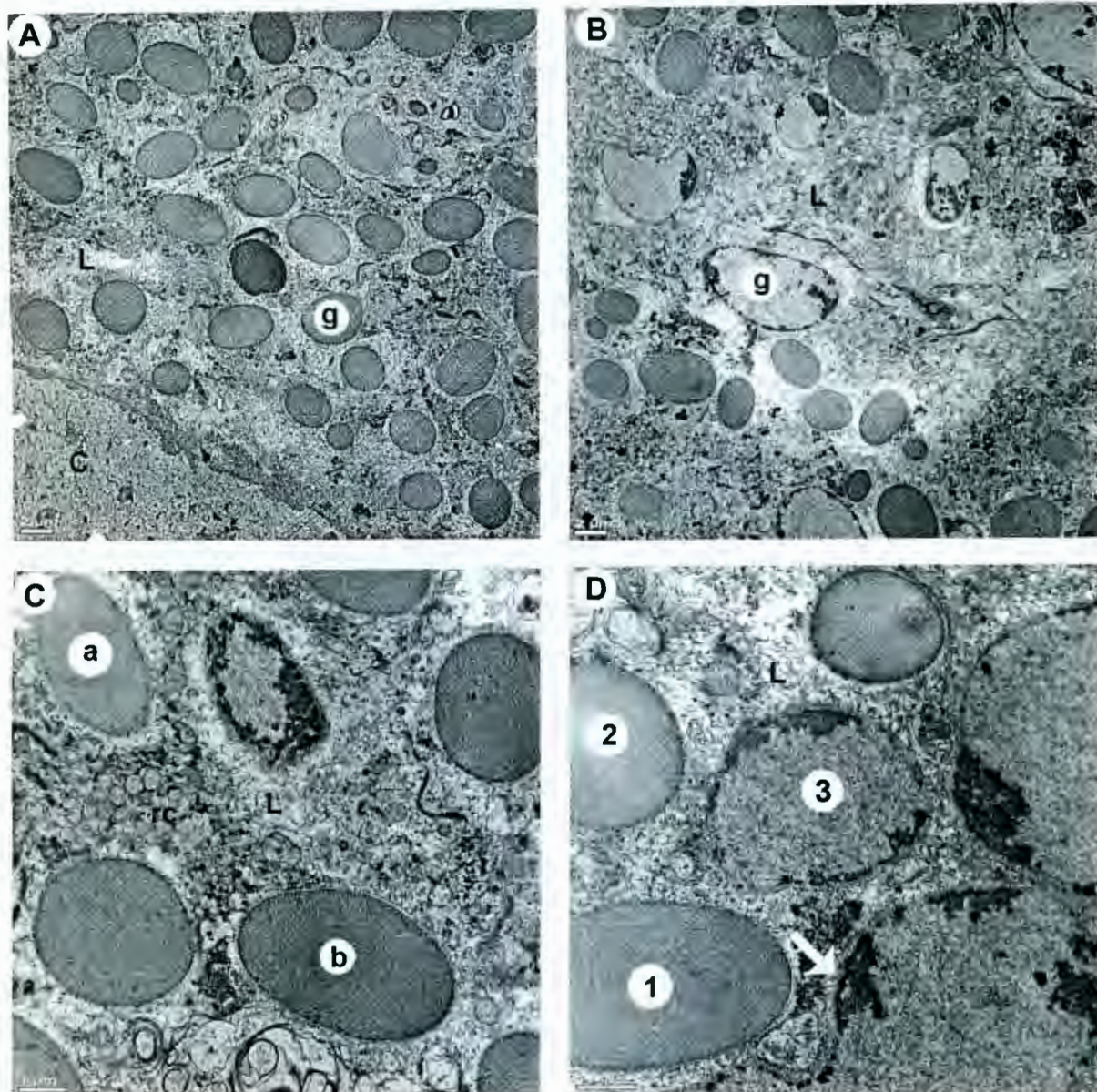


Figura 32. Fotografías del conducto venenoso distal. En A se presenta la capa externa de colágena (C), la luz del conducto (L) que contiene abundantes gránulos de veneno (g) de una variedad de forma, tamaño y electrodensidad. B es un acercamiento de la luz del conducto (L) donde se observan los gránulos de veneno (g). En C se muestra una imagen ampliada de los gránulos de veneno (g), obsérvese que los gránulos difieren en la electrodensidad (a y b); también pueden observarse abundantes restos celulares (rc). En D se distinguen tres tipos diferentes de gránulos (1, 2 y 3), la membrana que los rodea esta indicada por la flecha.

El brazo corto del saco radular presenta hojas de quitina enrolladas que forman el diente maduro; estas hojas de quitina se encuentran unidas por capas de tejido conectivo (C) (Figuras 33 A y B). En el brazo largo del saco radular se observan diferentes estadios de maduración del diente radular (Figuras 34 A, B y C) donde se muestra como va formándose y aumentando de densidad la hoja de quitina, hasta condensarse por completo (Figura 34D).

Las glándulas salivales accesorias muestran una delgada capa externa de colágena (C) con una lamina basal discontinua en la superficie interna (lb) y la luz de los conductos glandulares (L) (Figuras 35 A y D). En un acercamiento de la luz (L) se puede observar que contiene una gran cantidad de cuerpos redondos que probablemente sean lisosomas (l), los cuales poseen abundantes acumulaciones de gránulos densos en una matriz más clara (Figuras 35 B y C).

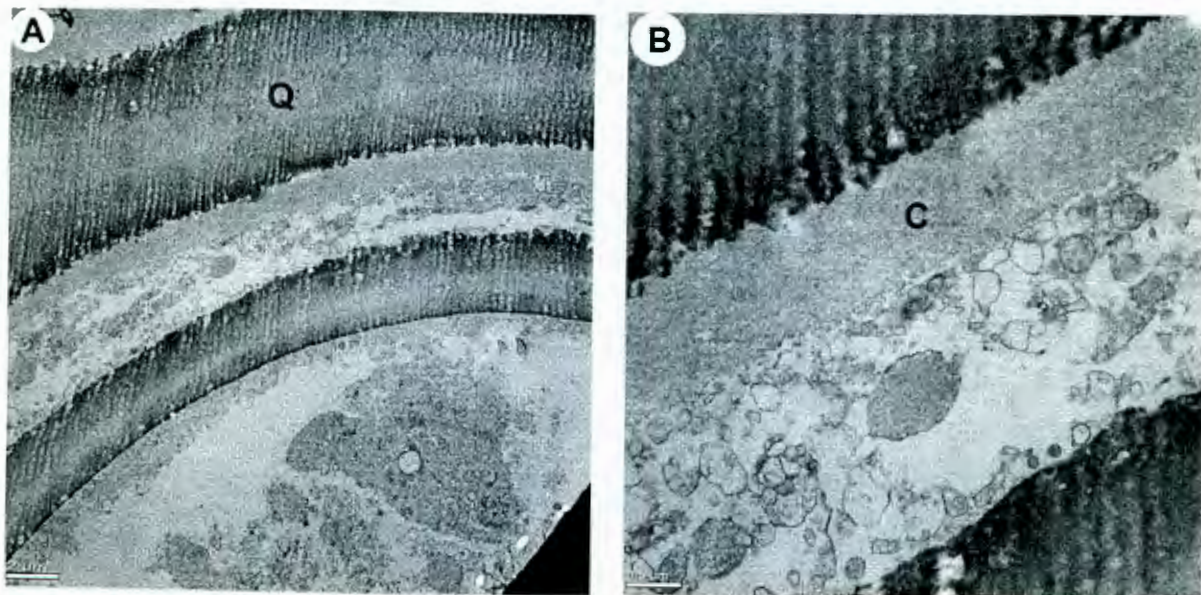


Figura 33. Fotografías del brazo corto del saco radular. En A se pueden observar las hojas de quitina enrolladas que forman el diente radular maduro (Q). En B se muestra un acercamiento de estas hojas de quitina unidas por una capa de tejido conectivo (C).

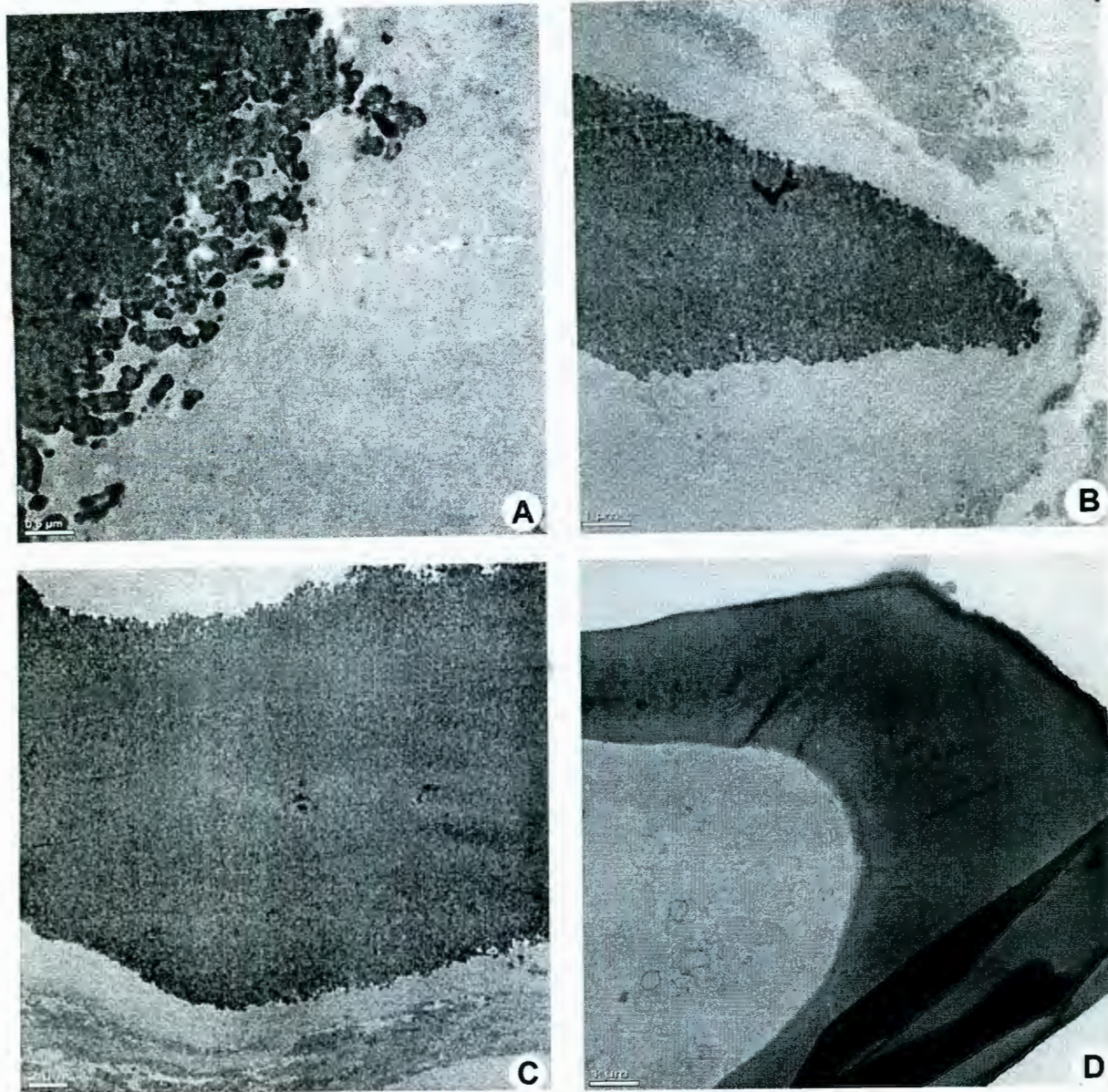


Figura 34. Fotografías del brazo largo del saco radular. En A B y C se muestran diferentes estadios de maduración del diente radular, hasta llegar a formar la hoja de quitina madura como se muestra en D.

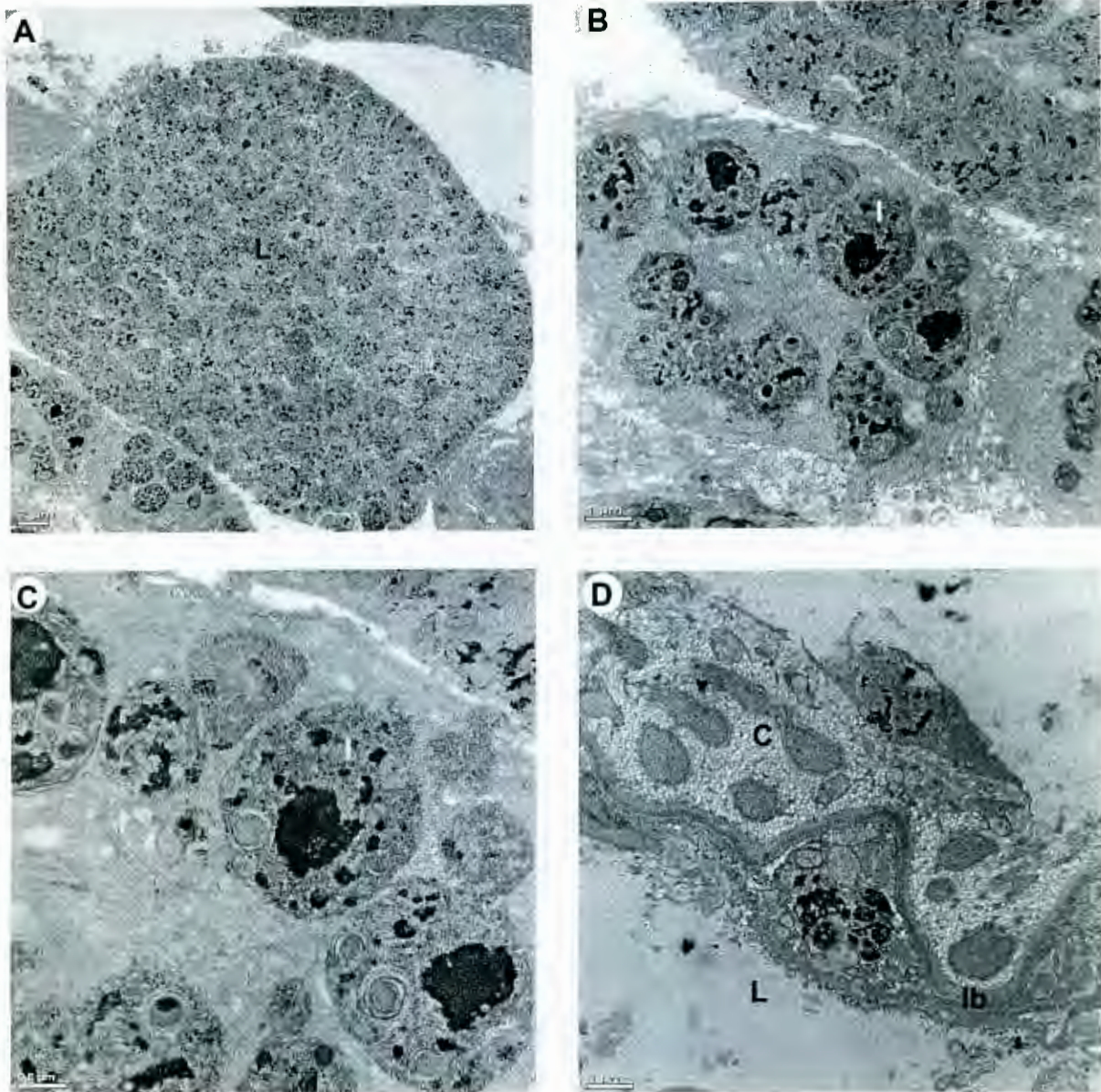


Figura 35. Fotografías de las glándulas salivales accesorias. En A se presenta un imagen panorámica, donde se puede observar una delgada capa externa de colágena (C), la luz de los conductos glandulares (L) que contiene una gran cantidad de lisosomas (I). En B y C se observa un acercamiento de los lisosomas (I) que forman la luz de la glándula. En D se muestra la capa de colágena (C) que en su superficie interna contiene una lamina basal (lb) definida y continua.

DISCUSIÓN

El método de descongelado con el que se logró una mejor preservación de las estructuras estudiadas por microscopia electrónica de transmisión, fue el método de descongelado rápido con perfusión de fijador, que se realizó sin disecar el aparato venenoso (ver métodos); ya que de esta manera se disminuyó la manipulación del tejido, lo que pudo evitar muy probablemente la liberación de componentes del veneno como proteasas (Cottrell, y col., 1972) que provocarían el daño celular del tejido, como se observó con los métodos de descongelado lento y rápido.

Como se describe en este trabajo, la anatomía macroscópica del aparato venenoso de *C. austini* es similar a la que presentan otras especies de *Conus*. Sin embargo se encontraron diferencias ultraestructurales importantes como:

Las características anatómicas encontradas en el bulbo muscular de *C. austini* concuerdan con la idea de que el bulbo no participa en la secreción del veneno (Halstead, 1988) ya que no se encontró ninguna evidencia de algún producto de secreción ni gránulos de veneno. Sin embargo los detalles ultraestructurales de esta estructura revelan una organización del músculo liso mucho más compleja, el arreglo de estas fibras musculares en una disposición transversal separadas por tejido conectivo formando una luz que contiene también músculo con algunas estructuras de inervación; sugiere que es una estructura muy flexible, lo que le permite funcionar como una bomba, para impulsar la expulsión del veneno; así como el transporte del diente radular a la punta de la proboscis (Halstead, 1988).

En estudios anteriores se ha demostrado que el conducto venenoso proximal y distal difieren en grosor, estructura y contenido de gránulos de veneno (Bingham y col., 1996). Lo anterior concuerda con nuestros resultados ya que el estudio de los cortes semifinos del conducto venenoso reveló que el conducto venenoso que se une con el bulbo muscular es muy delgado y va aumentando de grosor a medida que se va acercado a la unión con la faringe (conducto venenoso distal), así como un proceso de diferenciación de los gránulos de veneno en el mismo sentido, siendo perfectamente distinguibles en la luz del conducto distal.

En el conducto venenoso proximal de *C. austini* se observó la presencia de muy pocos gránulos de veneno y abundantes restos celulares lo que sugiere que los gránulos de veneno se producen en otra parte del conducto venenoso, lo anterior es consistente con las características encontradas en *C. californicus* (Marshall y col., 2002); sin embargo al no encontrar ninguna evidencia de la presencia de epitelio es difícil definir algún tipo de especialización anatómica en esta porción del conducto venenoso.

El conducto venenoso distal presentó un aumento sustancial en el número de gránulos de veneno con una menor variabilidad tanto en forma como en tamaño y de por lo menos 3 tipos, así como una gran cantidad de restos celulares; por lo que se puede suponer que los gránulos de veneno se producen en esta porción del conducto venenoso; por otra parte, la única evidencia encontrada que sugiere el tipo de secreción halócrina ya determinada (Halstead, 1988) es la gran cantidad de restos celulares.

Estas diferencias ultraestructurales encontradas en las porciones proximal y distal del conducto venenoso sugieren diferencias funcionales en estas regiones. Sin embargo al no encontrarse en el conducto venenoso de *C. austini* ningún tipo de epitelio, no es posible determinar algún tipo de especialización anatómica y funcional de estas regiones del conducto venenoso, que en general permanecen muy poco claras.

La ausencia de algún tipo de epitelio o restos de este, se pueden deber probablemente al daño celular provocado por una mala preservación del espécimen o por que sea una característica propia de esta especie; esta última idea podría estar sustentada en el hecho de que a diferencia de *C. californicus* que es una especie que presenta un tipo de alimentación generalizada y se encuentra en la superficie de aguas tropicales de las costas de California; *C. austini*, es una especie vermívora y se encuentra en aguas del Atlántico a profundidades de entre 50 y 100 m; estas diferencias ambientales, probablemente pudieron causar adaptaciones morfológicas en el aparato venenoso.

Imágenes de microscopía electrónica de reflexión del diente radular de *C. austini* sugieren la presencia de gránulos de veneno, lo que es consistente con la idea de que el diente radular es precargado de veneno antes de ser transportado a la punta de la proboscis para su uso (Marshall y col., 2002); sin embargo, tendría que analizarse el contenido de este material granular por espectrofotometría de masas para corroborar la presencia de péptidos biológicamente activos y así esta idea.

El análisis ultraestructural del brazo largo del saco radular revela diferentes estadios de maduración del diente radular y en el análisis del brazo largo se encontraron las hojas de quitina enrolladas que forman el diente radular, lo que confirma que en el brazo largo se forman los dientes que luego son almacenados en el brazo corto del saco radular (Marsh, 1977). Aunque sería necesario hacer el estudio por microscopía electrónica del saco radular dividiéndolo en secciones (proximal, media y distal), principalmente del brazo largo del saco que es una estructura muy compleja (Marshall y col., 202) para definir el proceso de formación de los dientes radulares, el cual aún no es claro.

Al analizar las características ultraestructurales de las glándulas salivales de los ejemplares estudiados de *C. austini*, se encontró una capa fibromuscular y la luz de los conductos glandulares que presentan una gran cantidad de lisosomas, aunque no es posible identificarlos sólo con criterios morfológicos; para ello es necesario la demostración histoquímica de la presencia de fosfatasa ácida o de alguna otra hidrolasa en su interior. La gran cantidad de posibles lisosomas en la luz de los conductos glandulares podría indicar algún proceso digestivo. Al no encontrar ningún material granular semejante al encontrado en el conducto venenoso, podemos suponer que el producto de secreción de estas glándulas salivales accesorias es algún componente que ayude a la lubricación del contenido del canal alimenticio. Lo anterior difiere de las características ultraestructurales reportadas en la literatura para *C. vexillum* que son un epitelio, una capa fibromuscular, una capa submuscular y una cápsula (Schultz, 1983). Podemos suponer que estas diferencias podrían deberse a un daño celular provocado por la congelación de los especímenes o a que estas características sean propias de esta especie; aunque no tenemos evidencias concretas, por lo que en un futuro estudio sería necesario trabajar con muestras de un espécimen bien preservado.

CONCLUSIONES

El aparato venenoso de *C. austini* presentó características anatómicas similares a las de otras especies de *Conus*. En cuanto a las características ultraestructurales, se encontraron diferencias importantes en la luz de las distintas porciones estudiadas del conducto venenoso; en la unión del conducto con el bulbo muscular se observaron abundantes gránulos de veneno de dos distintas electrodensidades; el conducto venenoso proximal mostró abundantes restos celulares y muy pocos gránulos de veneno; el conducto venenoso medio presentó gran cantidad de restos celulares y algunos gránulos de veneno de dos tipos, mientras que el conducto venenoso distal mostró abundantes gránulos de veneno de por lo menos tres tipos. Se sugiere que ninguna de estas porciones del conducto venenoso presenta algún tipo de especialización ya que no se encontró evidencia de epitelio glandular. Estas diferencias tendrían que ser demostradas estudiando un espécimen bien preservado; por lo que el campo de investigación de las características histológicas del género *Conus* y principalmente de las especies que se encuentran en nuestro país queda abierto al ser *C. austini* la única especie estudiada hasta el momento del Atlántico.

También cubriendo los objetivos planteados se puede decir que el método de descongelación y perfusión del fijador, sin disecar el aparato venenoso presentó una mejor preservación de las estructuras observadas por MET.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R. T. y Dance, S. P. 1986.** Compedium of Seashells. 4ta. ed., Dutton Inc., New York, USA: 267.
- Bingham, J. P., Jones, A., Lewis, R. J., Adrew, P. R. y Alewood, P. F. 1996.** *Conus* venom peptides (conozeptides): inter-species, intra-species and within individual variation revealed by ionspray mass spectrometry. Biomedical Aspects of Marine Pharmacology.: 13-27.
- Cottrell, G. A. y Tewartog, B. M. 1972.** Active factors in the venom duct of *Conus Californicus*. Br. J. Pharmacol. Vol.: 44:365-366.
- Duda, T. F. y Palumbi, S. R. 1999.** Molecular genetics of ecological diversification: Duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. Proc. Natl. Acad. Sci: Vol.: 96: 10272-10277.
- Fegan, D. y Andersen, D. 1997.** *Conus geographus* envenomation. The Lancet: Vol. 349: 1672.
- Garton, W. D., Roller R. A. Y Capro J., 1984.** Fune structure and vital staining of osphradium of the southern oyster drill, *thais haemastoma canaliculata* (gray) (Prosobranchia: Muricidae). Biol. Bull. Vol.: 167: 310-321.
- Halstead, B. W. 1988.** Pousonous and Venomous Marine Animals of the World. Darwin Press, Princeton, NJ. 243-250.
- Hardy, 2004.** www.gastropods.com
- Kohn, A. J., Nibakken, J. W. Y M. 1972.** Radula tooth structure of the gastropod *Conus imperialis*. Science. Vol.: 176: 49-51.
- Kohn, A. J., y Nibakken, J. W. 1975.** Ecology of *Conus* on eastern Indian Ocean Fging reefs: diversity of species and resource utilization. Mar. Biol. Vol.: 29: 211-234.
- Kohn, A. J., Nishi M. y Pernet, B. 1999.** Snail spears and scimilars: a carácter analysis of *Conus* radular teeth. J. Molluscan Stud. Vol.: 65: 461-481.
- Kohn, A. J., y Hunter C. 2001.** The feeding process in *Conus imperialis*. The Veliger. Vol: 44:232-234.

- Lim, C. F. 1969.** Identification of the feeding types in the genus *Conus* Linnaeus. The Veliger. Vol.: 12: 160-164.
- Lindner, G. 1999.** Moluscos y caracoles de los mares del mundo. 2da. ed., Ediciones Omega, Barcelona: 113-125.
- Maillo, P. A. 2001.** Extracción, purificación y caracterización química y biológica de péptidos neuroactivos provenientes de especies de *Conus*. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de México. Tesis para obtener el título de doctora en ciencias. 1-17.
- Maguire, D. y Kwan. 1992.** Cone shell venoms-synthesis and packaging. Toxins and Targets: Effects of Natural and Synthetic Poisons on Living Cells and Fragile Ecosystems: 11-18
- Marsh, H. 1977.** The radular apparatus of *Conus*. J. Molluscan Stud. Vol.: 43:1-11.
- 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*. Biol. Bull.: 203: 27-41.
- Nybakken, J. 1969.** Correlation of radula tooth structure and food habits of there vermivorous species of *Conus*. Veliger. Vol.: 12: 316-318.
- Olivera, B. M., Hillyard, D. R., Rivier, J., Woodward, S., Gray, W. R., Corpuz, G., Cruz, L. J. 1990.** Conotoxins: Targeted peptide ligands form snail venoms, in: Marine toxins origin structure and molecular pharmacology American Chemical Society. Washingyon, D. C.: 256-260.
- Olivera, B. M., Riber, J., Scott, J. K., Hillyard, D. R. y Cruz, L. J. 1991.** Conotoxins. J. Biol. Chem: Vol: 266: 22067-22070.
- Olivera, B. M. 1996.** *Conus* Venom Peptides, Receptor and Ion Channel targets, and Drug desing: 50 Million years of Neuropharmacology. Mol. Biol Cell.: Vol. 8: 2101-2109.
- Paganelli, G. 1999.** www.coneshell.net
- Render A. 2004.** www.femrale.com.br
- Röquel, D., Korn, W. y Kohn A. J. 1995.** Manual of the living Conidae. Wiesbaden Verlag Christa Hemmen.: 5-13.

Schultz, M. C., 1983. A correlated light and electron microscopic study of the structure and secretory activity of the accessory salivary glands of the marine gastropods, *Conus flavidius* and *C. Vexillum* (Neogastropoda, Conacea). Journal of morphology. Vol.: 176: 89-111.

Spengler, H. A., y Kohn, A. J. 1995. Comparative external morphology of the *Conus osphradium*. J. Zool. Vol.: 235: 439-453.

Spense, I., Gillessen, D., Gregson, R. P., Quin, R. J. 1997. Characterization of neurotoxic constituents of *Conus geographus* (L) venom. Life Sci. : Vol. 21 : 1759-1765.

Terlau, H., Shon, K-J., Grilley, M., Stoker, M., Stuhmer, W., Olivera, B. M. 1996. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. Nature.: Vol. 381: 148-151.