

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Evaluación del efecto inhibitorio en la proliferación de líneas
celulares de cáncer pancreático, usando componentes
proteicos de caracoles de la familia *Conidae***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:
Edith Alexandar Escárrega Payán

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por
Edith Alexandar Escárrega Payán

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dr. Pierrick Gerard Fournier

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dra. Irasema Oroz Parra



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Edith Alexandar Escárrega Payán** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Evaluación del efecto inhibitorio en la proliferación de líneas celulares de cáncer pancreático, usando componentes proteicos de caracoles de la familia *Conidae*

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

El cáncer pancreático es una de las enfermedades con la mayor tasa de mortandad por incidencia, y es considerado uno de los más agresivos. Diversas investigaciones asocian el crecimiento de este padecimiento al igual que otros tipos de cánceres con la nicotina y los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). De modo que la interacción del agonista con el receptor permite la internalización de iones Na^+ y Ca^{++} en la célula, desencadenando sucesos río abajo, como la proliferación celular, donde las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ son las más importantes. Por otro lado, los péptidos provenientes de caracoles de la familia *Conidae*, mejor conocidos como conotoxinas o conopéptidos, poseen una capacidad moduladora sobre distintos canales iónicos y receptores. En esta investigación se emplearon péptidos sintéticos, basados en las formas nativas de toxinas de los caracoles *Conosprella ximenes* y *Californiconus californicus*, que tienen actividad antagonista en los nAChR, evaluándolos en un modelo de cáncer pancreático usando las líneas celulares PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3; con el fin de determinar si existe un efecto modulador en su viabilidad celular. Para esto se realizó la caracterización de los nAChR, midiendo los niveles de expresión de sus diferentes subunidades. La expresión relativa de las subunidades de nAChR en BxPC-3 y PANC-1 mostró que la subunidad $\alpha 7$ es la más predominante con y sin tratamiento de nicotina, sin embargo, para CAPAN-2 fueron $\beta 2$ seguido de $\alpha 10$ las subunidades que contaban con la mayor expresión. Las conotoxinas disminuyeron la viabilidad de las líneas de cáncer pancreático. Sin embargo, la extensión de su efecto varía dependiendo de la conotoxina, la concentración empleada y las diferentes líneas celulares. Siendo la línea celular BxPC-3 la más sensible a las conotoxinas, mientras que la línea celular CAPAN-2 mostró ser resistente a todos los compuestos probados, concordando con los resultados previos de expresión de la subunidad $\alpha 7$ donde su expresión fue mínima. Las conotoxinas cal14.1a y cal14.1c presentaron activación para caspasas 3/7, así como pérdida de la integridad celular. Mientras que con el tratamiento de cal14.1b, se presentó una muerte celular independiente de caspasas 3/7. Llegando a la conclusión de que las α -conotoxinas actúan en los nAChR, induciendo muerte celular en las líneas de cáncer pancreático, cuando estas tienen expresada la subunidad $\alpha 7$.

Palabras clave: Cáncer de páncreas, receptores nicotínicos de acetilcolina, conotoxinas, péptidos sintéticos, apoptosis

Abstract of the thesis presented by **Escárrega Payán Edith Alexandar** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Evaluation of the inhibitory effect on the cell proliferation using components from the *Conidae* family snails, in pancreatic cancer cell lines

Abstract approved by:

Dr. Licea Navarro Alexei Fedorovich
Thesis Director

Pancreatic cancer is one of the most aggressive types of cancer, and, as such, it is associated with a high mortality rate among patients suffering from it. Several researchers associate the growth of this condition as well as other types of cancers with nicotine and nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). So the interaction of the agonist with the receptor allows the internalization of Na⁺ and Ca⁺⁺ ions in the cells, triggering downstream events, such as cell proliferation, where the $\alpha 7$ and $\alpha 9$ subunits are the most important. On the other hand, peptides from snails of the *Conidae* family, better known as conotoxins or conopeptides, have a modulating capacity on different ionic channels and receptors in cells. In this study, synthetic peptides were used based on the native forms of toxins of the *Conosprella ximenes* and *Californiconus californicus* snails, which have antagonistic activity in the nAChR. We evaluated them in a pancreatic cancer model using the PANC-1, CAPAN-2, and BxPC-3 cell lines; to determine if there is a modulating effect on its cell viability. For this, the characterization of the nAChR was performed, measuring the expression levels of their different subunits. The relative expression of the nAChR subunits in BxPC-3 and PANC-1 showed the $\alpha 7$ subunit as the most predominant with and without nicotine treatment, however, for CAPAN-2 were $\beta 2$ followed by $\alpha 10$ the subunits that had the higher expression. Conotoxins decreased the viability of pancreatic cancer lines. However, the extent of its effect varies depending on the conotoxin, the concentration used and the different cell lines. The BxPC-3 cell line being the most sensitive to conotoxins, while the CAPAN-2 cell line proved to be resistant to all tested compounds. All this following the previous results of expression of the $\alpha 7$ subunit where CAPAN-2 expression was minimal. The conotoxins cal14.1a and cal14.1c showed activation for caspases 3/7, as well as the loss of membrane cellular integrity. While with the cal14.1b treatment, independent cell death of caspases 3/7 occurred. We conclude that α -conotoxins act in nAChR, inducing cell death in pancreatic cancer lines when they have expressed the $\alpha 7$ subunit.

Keywords: Pancreatic cancer, nicotinic acetylcholine receptor, conotoxins, synthetic peptide, apoptosis

Dedicatoria

Con mucho amor por y para mi familia

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada para mis estudios de posgrado, con el número de becario 634347.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitirme ser parte del posgrado.

Al Dr. Alexei Licea por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y brindarme su apoyo durante estos años.

A mi comité de tesis, Dr. Carlos Brizuela, Dra. Johanna Bernáldez, Dra. Patricia Juárez, Dr. Pierrick Fournier y a la Dra. Irasema Oroz, por su tiempo y sus valiosas aportaciones.

A todos en el Departamento de Innovación Biomédica, personal administrativo, investigadores, docentes y técnicos del laboratorio.

Mis hermanos mayores; Chava, por ayudarme en mis crisis informáticas, y Jahaziel por tenerme tanta paciencia, apoyarme en el laboratorio y reírse conmigo y no de mí.

A la Dra. Karla Cervantes por auxiliarme en mis qPCR y mis chilitos rellenos, al Dr. Luis Donis por el curso de citometría y su amistad.

Mis compañeros de laboratorio, mis amigos, por las sesiones de terapia grupal, así como sus consejos para continuar con mi trabajo. A Tony por hacerme llegar temprano hasta el lab y ahorrarme el cardio del día casi todos los días.

A Erick por su apoyo todos esos fines de semana en el lab tomando un millón de fotos o revelando ensayos, tu paciencia, comprensión y apoyo para mi trabajo, mi lotería.

A mi familia, por estar ahí en todo momento, por y para mí. Los amo.

A todos los que de alguna forma apoyaron y facilitaron la realización de este proyecto, muchas gracias.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 El páncreas.....	2
1.1.2 Cáncer de páncreas.....	3
1.1.3 Tratamientos actuales.....	5
1.1.4 Relación entre la nicotina y el cáncer.....	6
1.1.5 Receptores de acetilcolina.....	7
1.1.6 Superfamilia <i>Conoidea</i>	8
1.1.6.1 Conotoxinas.....	11
1.1.6.2 Aplicaciones en biomedicina.....	11
1.1.6.3 Síntesis de conotoxinas.....	12
1.1.6.3.2 <i>Conasprella ximenes</i>	12
1.1.6.3.1 <i>Californiconus californicus</i>	14
1.2 Justificación.....	15
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo general.....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer de páncreas.....	17
2.1.1 Preparación de material y equipo.....	17
2.1.2 Activación de líneas celulares.....	18
2.1.3 Mantenimiento celular.....	18

2.1.3.1	Tripsinización de líneas celulares.....	18
2.1.3.2	Expansión de cultivo.....	19
2.1.3.3	Conteo celular.....	19
2.1.4	Criopreservado de líneas celulares.....	19
2.2	Caracterización de receptores.....	20
2.2.1	Tratamiento con nicotina.....	20
2.2.2	Extracción de ARN.....	20
2.2.3	Retrotranscripción del ARN a ADNc.....	21
2.2.4	RT-qPCR.....	21
2.2.4.1	Validación de oligonucleótidos.....	21
2.2.4.2	Análisis de resultados de RT-qPCR.....	22
2.3	Ensayos de viabilidad celular.....	23
2.3.1	Análisis de resultados en viabilidad celular.....	25
2.4	Ensayos de muerte celular por imagen de fluorescencia.....	25
2.4.1	Análisis de resultados de muerte celular.....	27
Capítulo 3. Resultados		
3.1	Caracterización de receptores nicotínicos de acetilcolina.....	28
3.2	Ensayos de viabilidad celular.....	31
3.3	Ensayos de muerte celular por imagen de fluorescencia.....	38
Capítulo 4. Discusión		
4.1	Características de los péptidos sintéticos.....	48
4.2	Relación entre la expresión de las subunidades de nAChR y los resultados de viabilidad celular.....	51
4.3	Diferencias entre líneas celulares.....	53
4.4	Ensayo de muerte celular por imagen de fluorescencia.....	54
Capítulo 5. Conclusiones		
5.1	Conclusiones finales.....	57
5.2	Perspectivas del trabajo.....	57
	Literatura citada.....	59
	Anexo 1.....	66
	Anexo 2.....	67

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ubicación y anatomía del páncreas.....	3
2	Tasa de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad (Mundial) en 2018, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades.....	4
3	Esquemas hipotéticos de la acción de la nicotina en mecanismos carcinogénicos.....	7
4	Tipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR).....	8
5	Clasificación taxonómica de la familia <i>Conoidea</i>	8
6	Diagrama del aparato venenoso de un caracol de la familia <i>Conidae</i>	9
7	Sistema de clasificación utilizado para agrupar los componentes del veneno de los caracoles <i>Conidae</i> en categorías.....	10
8	Perfil electrofisiológico de xm1a, xm1b y xm1c.....	13
9	Efecto citotóxico de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en la supervivencia celular de las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299 y H1437.....	14
10	Expresión de subunidades de nAChRs en las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299 y H1437.....	15
11	Caracterización de los nAChR en la línea celular PANC-1 a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 h) posteriores a la aplicación del tratamiento con nicotina a 100nM.....	29
12	Caracterización de las diferentes subunidades de nAChR en la línea celular BxPC-3 a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 h) posteriores a la aplicación del tratamiento con nicotina a 100nM.....	30
13	Caracterización de las diferentes subunidades de nAChR en la línea celular CAPAN-2, 24 h posteriores a la aplicación del tratamiento con nicotina a 100 nM.....	31
14	Ensayo de viabilidad celular en la línea PANC-1. A-C) Conotoxinas de <i>C. ximenes</i> . D-F) Conotoxinas de <i>C. californicus</i>	34
15	Ensayo de viabilidad celular en la línea BxPC-3. A-C) Conotoxinas de <i>C. ximenes</i> . D-F) Conotoxinas de <i>C. californicus</i>	35
16	Ensayo extendido de viabilidad en la línea PANC-1 donde se aumentó la concentración máxima a 50 μ M. A-C) Conotoxinas de <i>C. ximenes</i> . D-F) Conotoxinas de <i>C. californicus</i>	36

17	Ensayo extendido de viabilidad en la línea BxPC-3 donde se aumentó la concentración máxima a 50 μ M. A-C) Conotoxinas de <i>C. ximenes</i> . D-F) Conotoxinas de <i>C. californicus</i>	37
18	Ensayo de viabilidad celular en la línea CAPAN-2 con las conotoxinas de <i>C. ximenes</i> (xm1a, xm1b y xm1c) y <i>C. Californiconus</i> (cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c) a 5 μ M.	38
19	Ensayo de microscopía fluorescente de la línea celular BxPC-3, con células positivas a IP y caspasas 3/7, 24 h posteriores al tratamiento con conotoxinas (cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c) a 5 μ M y los controles.....	40
20	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 sin tratamiento (BCO).....	40
21	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con estaurosporina (STS) a 1.25 μ M por 24 h.....	41
22	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con cisplatino (CDDP) a 83 μ M por 24 h.....	41
23	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con cal14.1a a 5 μ M por 24 h.....	42
24	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con cal14.1b a 5 μ M por 24 h.....	42
25	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con cal14.1c a 5 μ M por 24 h.....	43
26	Ensayo de microscopía fluorescente de la línea celular PANC-1, con células positivas a IP y caspasas 3/7, 24 h posteriores al tratamiento con conotoxinas (cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c) a 5 μ M.	44
27	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 sin tratamiento (BCO).....	44
28	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 con estaurosporina (STS) a 1.25 μ M por 24 h.....	45
29	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 tratadas con cisplatino (CDDP) a 83 μ M por 24 h.....	45

30	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 tratadas con cal14.1a a 5 μ M por 24 h.....	46
31	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 tratadas con cal14.1b a 5 μ M por 24 h.....	46
32	Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 tratadas con cal14.1c a 5 μ M por 24 h.....	47
33	Alineación de xm1a con otras conotoxinas α -4/3, indicando porcentaje de similitud en secuencia.....	48
34	Alineación de las conotoxinas cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c, mostrando el porcentaje de similitud entre cal14.1c con respecto a las otras.....	51
35	Rutas de muerte celular en mamíferos, dependiente e independiente de Caspasas....	56

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Características de líneas celulares de cáncer de páncreas (ATCC®).....	17
2	Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el análisis de genes por qPCR y clave de acceso a base de datos.....	22
3	Cantidad de toxina utilizada por pozo para cada dilución. Toxinas resuspendidas en agua destilada estéril, con una concentración de 1 µg/µl.....	24
4	Controles usados en los ensayos de viabilidad. Concentraciones iniciales de cada tratamiento, volumen utilizado y concentración final en el pozo.....	25
5	Controles usados en los ensayos in vitro de imagen por fluorescencia. Concentraciones iniciales de cada tratamiento, volumen utilizado y concentración final en el pozo.....	26
6	Colorantes utilizados en el ensayos in vitro de imagen por fluorescencia. Concentraciones iniciales de cada reactivo, volumen utilizado y concentración final en el pozo.....	26
7	Características de las conotoxinas de <i>Conasprella ximenes</i>	48
8	Características de las conotoxinas de <i>Californiconus californicus</i>	48
9	Comparación de las conotoxinas cal14.1a y cal14.1b, con respecto a su secuencia.....	49
10	Características de las líneas celulares PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3.....	53
11	Referencias para cultivo celular.....	65
12	Preparación de PBS 1X (Solución amortiguadora de fosfatos).....	65
13	Preparación de RNase away.....	66
14	Preparación de agua con DEPC al 0.1%.....	66
15	Preparación de buffer de electroforesis TAE 50X.....	66
16	Preparación de gel de agarosa.....	66

Capítulo 1. Introducción

El cáncer de páncreas es causante de 331,000 muertes por año, y es la séptima causa de fallecimiento más común por cáncer en el mundo. Esta es una posición relativamente más alta que la observada para la incidencia, donde ocupó la posición número once en el 2018 (Bray et al., 2018). Convirtiéndose en una de las enfermedades con la mayor tasa de mortandad por incidencia. La Sociedad Americana contra el Cáncer (ACS, American Cancer Society®) en los Estados Unidos, estimó que para el año 2019 habrá 55,440 casos nuevos de cáncer pancreático, aproximadamente un 3.2 % de todos los casos nuevos de cáncer y se considera que 44,330 personas morirán debido a esta enfermedad, con un porcentaje de 7.3 % de todas las muertes por cáncer (National Cancer Institute, 2018; Noone et al., 2018).

Además, el cáncer de páncreas es considerado uno de los más agresivos, los pacientes diagnosticados suelen tener una expectativa de vida muy baja; en promedio, la vida media de un paciente en un escenario regional o distal (cuando el cáncer ya se ha diseminado a otras partes del cuerpo) es de aproximadamente 9 meses (Carrato et al., 2015). Los tratamientos actuales tienen poca respuesta en el curso de la enfermedad, esto debido a una combinación de factores; suele detectarse tarde porque no presenta síntomas hasta que el tumor está avanzado, es un tipo de cáncer con un fenotipo muy agresivo, que empieza a hacer metástasis en estadios iniciales, y es favorecido por factores ambientales (Gnanamony y Gondi, 2017). Entre los principales órganos a los que migra esta enfermedad se encuentran el hígado, peritoneo, pulmones o huesos.

Debido a esto, se están buscando nuevas estrategias para combatir esta enfermedad con un mayor éxito. Para ello se han realizado diversas investigaciones que han ayudado a esclarecer los mecanismos celulares y moleculares más importantes en el curso de esta enfermedad. Resaltando las investigaciones que asocian el crecimiento de este padecimiento, al igual que otros tipos de cánceres con la nicotina y los receptores de acetilcolina nicotínicos (Dasgupta et al., 2009; Grando, 2014; Schaal et al., 2015; Spindel, 2016). De modo que la interacción del agonista con el receptor provoca una mayor permeabilidad de los iones de sodio y calcio (Na^+ y Ca^{++}) en la célula, desencadenando así sucesos río abajo como la proliferación celular, también tiene una función metabotrópica que activa las cinasas, conduciendo a un crecimiento celular incrementado (Spindel, 2016). Todo esto mediado a través de la cascada de señalización Ras/Raf-1/MEK1/ERK, dependiente de $\alpha 7$ -nAChR y de STAT-3 (Arredondo, 2006; Grando, 2014).

Por otro lado, los péptidos provenientes de caracoles de la familia *Conidae*, mejor conocidos como conotoxinas, poseen una capacidad moduladora sobre distintos canales iónicos y receptores. En

específico, las α -conotoxinas, por su tamaño de 10 a 30 residuos de aminoácidos, pueden interactuar con los receptores nicotínicos de acetilcolina de forma antagonista (Azam y McIntosh, 2009; Dutton y Craik, 2001; Gao et al., 2017). En nuestro grupo de trabajo, se aislaron, caracterizaron y secuenciaron diversas conotoxinas provenientes de caracoles *Conasprella ximenes* y *Californiconus californicus*, las cuales presentaron afinidad por los receptores nicotínicos de acetilcolina, clasificándolas como α -conotoxinas (Bernáldez Sarabia, 2008; Cervantes, 2013). Posteriormente se verificaron las afinidades a subunidades de estos receptores, resaltando entre ellos el $\alpha 7$ (Leebe, 2016). Así mismo, se corroboró en un modelo de cáncer de pulmón, donde se evaluó la citotoxicidad de estos péptidos en la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón, con resultados favorables que relacionaban la disminución de la viabilidad celular con algunas subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina (Oroz-Parra et al., 2016).

Por esa razón, en esta tesis se analizaron los péptidos sintéticos de estas dos investigaciones previas, basados en las formas nativas de toxinas de los caracoles *Conasprella ximenes* y *Californiconus californicus*, que funcionan como antagonistas de estos receptores nicotínicos de acetilcolina, evaluándolos en un modelo de cáncer de páncreas con las líneas celulares PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3; y determinando si existe un efecto modulador en su viabilidad celular.

1.1 Antecedentes

1.1.1 El páncreas

El páncreas es la glándula más importante del aparato digestivo. Presenta una forma alargada de unos 20 cm de longitud y de 70-90 g de peso (Thews et al., 1983), se sitúa transversalmente en la parte posterior de la cavidad abdominal, inmediatamente por delante del raquis y de los grandes vasos sanguíneos (aorta y vena cava). Debido a su localización retroperitoneal ha sido un órgano relativamente inaccesible y difícil de estudiar (Fig. 1A). Este órgano consta de 3 partes (Fig. 1B): la porción más voluminosa, situada a la derecha de la cavidad abdominal, denominada cabeza; su extremo izquierdo, alargado y estrecho, constituye la cola; y la porción intermedia o cuerpo (Ruiz Liard y Latarjet, 2008).

Este órgano presenta dos tipos principales de células, exocrinas y endocrinas. Las células exocrinas comprenden más del 95 % de las células del páncreas, conforman las glándulas exocrinas y los conductos.

Las glándulas exocrinas producen los jugos pancreáticos (2 l al día aproximadamente), los que se caracterizan por un elevado contenido de bicarbonatos (iones HCO_3^-), utilizados para neutralizar el medio ácido del duodeno. Así mismo, producen enzimas presentes en los jugos pancreáticos, que se liberan en el intestino para ayudar a digerir los alimentos; con el fin de descomponer proteínas, se generan proteasas (p. ej., tripsina, quimotripsina), mientras que para los lípidos, se producen lipasas (p. ej., fosfolipasa A_2) y se originan amilasas para los hidratos de carbono. Las enzimas se liberan en forma de precursores inactivos (p. ej., tripsinógeno) en el duodeno, donde posteriormente se activan (American Cancer Society, 2016; Schunke & Faller, 2006).

Mientras que, las células endocrinas constituyen un porcentaje más pequeño de las células en el páncreas. Estas células están en agrupaciones pequeñas llamadas islotes (o islotes pancreáticos de Langerhans). Los islotes liberan insulina, glucagón y somatostatina, tres importantes hormonas para el metabolismo del organismo, pues ayudan a controlar los niveles de glucosa en la sangre (American Cancer Society, 2016).

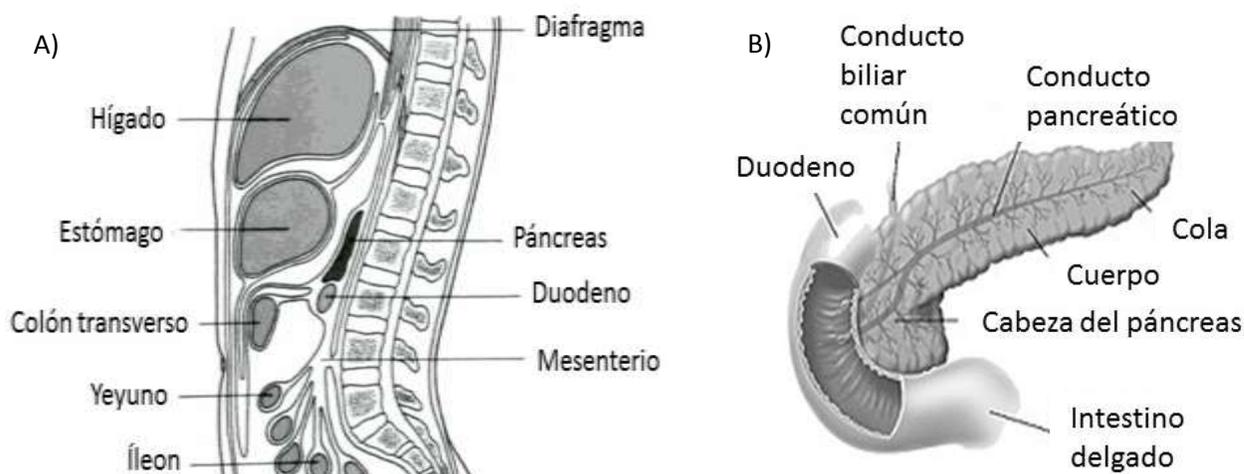


Figura 1. Ubicación y anatomía del páncreas. A) Corte sagital a través de la cavidad abdominal. B) Partes del páncreas. Editado de (Thews et al., 1983).

1.1.2 Cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas se origina cuando las células de este órgano, comienzan a proliferar sin control. Las células exocrinas y endocrinas del páncreas forman tumores de tipos distintos, cada uno tiene factores de riesgo diferentes, así como causas, signos, síntomas, pruebas de diagnóstico, tratamientos y pronósticos. Por lo cual es importante diferenciar entre el cáncer de páncreas exocrino y endocrino (Garrido-Laguna y Hidalgo, 2015; D. Yadav y Lowenfels, 2013).

Los cánceres exocrinos son el tipo de cáncer de páncreas más común, de ellos el 95% aproximadamente son adenocarcinomas (National Cancer Institute, 2018). Generalmente, estos cánceres se originan en los conductos del páncreas, con menos frecuencia, se forman a partir de las células que producen las enzimas pancreáticas. En este caso, se les llama carcinomas de células acinares. Así mismo, los tipos menos comunes de cáncer exocrino incluyen a los carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células escamosas, carcinomas de células en anillo de sello, carcinomas indiferenciados, y carcinomas indiferenciados con células gigantes.

En 2018 el cáncer pancreático, fue responsable de 331,000 muertes al año, convirtiéndose en la séptima causa de muerte más común por cáncer en el mundo, una posición relativamente más alta que la observada para la incidencia donde ocupa la posición número quince (Fig. 2) (Bray et al., 2018). La Sociedad Americana Contra El Cáncer en los Estados Unidos estimó para el 2019, que habrá 55,440 casos nuevos de cáncer pancreático, aproximadamente un 3.2 % de todos los casos nuevos de cáncer y se considera que 44,330 personas morirán debido a esta enfermedad, con un porcentaje de 7.3 % de todas las muertes por cáncer (National Cancer Institute, 2018; Noone et al., 2018).

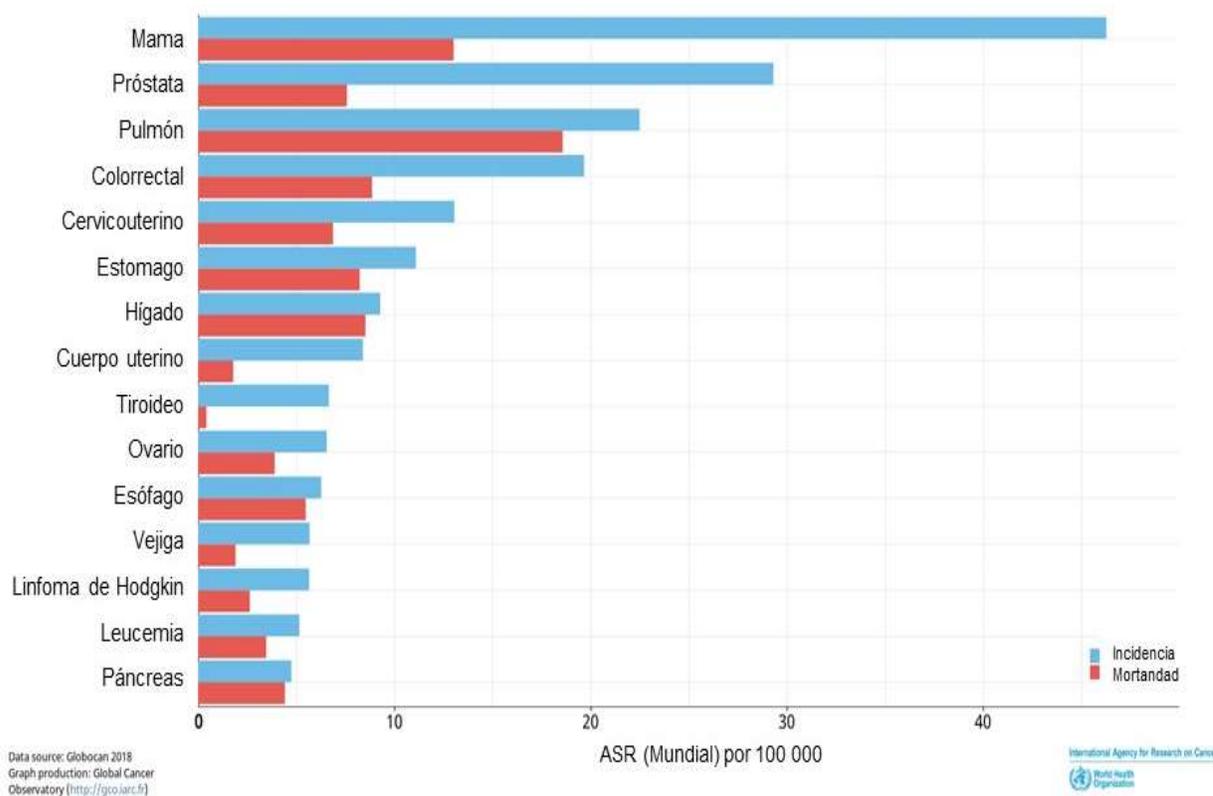


Figura 2. Tasa de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad (ASR) en 2018, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades (GLOBOCAN, 2018).

1.1.3 Tratamientos actuales

Según el tipo, etapa, así como otros factores, las opciones de terapia para las personas con cáncer de páncreas pueden incluir cirugía, procesos de ablación o embolización, terapia de radiación y quimioterapia. La mejor opción puede incluir más de un tipo de tratamiento, siendo una de las partes con mayor importancia para el procedimiento, el control del dolor.

En algunos casos, los pacientes no muestran una mejora con el tratamiento, debido a la quimioresistencia por parte de las células cancerígenas a los fármacos de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad, es por ello que se están realizando estudios nuevos, con el fin de lograr una sensibilización de las células pancreáticas, mediante objetivos moleculares específicos (Garrido-Laguna y Hidalgo, 2015; Gnanamony y Gondi, 2017; Rossi et al., 2014). Se han investigado los mecanismos moleculares y celulares, involucrados en esta enfermedad, con el fin de tener un mejor entendimiento de la misma, para poder diseñar terapias más efectivas.

Entre los que destacan nuevas terapias y objetivos en el cáncer de páncreas, tal es caso de nuevos citotóxicos como nab-paclitaxel (unido a albúmina paclitaxel), TH-302 (que se activa para liberar el agente alquilante Br-IDM en el microambiente hipóxico tumoral) y MM-398 (una formulación liposomal de irinotecán) el cual se dirige a las células de cáncer de páncreas. Varios inhibidores de receptores (p. ej., SMO, Smoothened), que participan en importantes vías de señalización, tal es el caso de Notch y Wnt / β -catenina, han sido desarrollados para apuntar a las vías clave de células madre de cáncer (CSC, por su nombre en inglés) (Amedei et al., 2014; Garrido-Laguna y Hidalgo, 2015; Rossi et al., 2014).

También se busca promover la vigilancia inmune mediante los inhibidores de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). IDO es una enzima involucrada en el metabolismo del triptófano y conduce a la diferenciación preferencial de las células T, a las células T reguladoras. Además el agotamiento del triptófano es tóxico para las células T efectoras (Amedei et al., 2014; Ribas y Wolchok, 2018). Por lo tanto, los inhibidores de IDO conducen a un mayor número de células T efectoras y una disminución en poblaciones reguladoras de células T, promoviendo así la vigilancia inmune. Además se están aplicando diferentes estrategias para modificar el entorno inmunosupresor del tumor, y superar la evasión inmune por las células tumorales, entre otros tratamientos (Amedei et al., 2014; Garrido-Laguna y Hidalgo, 2015).

1.1.4 Relación entre la nicotina y el cáncer

La nicotina es un alcaloide altamente tóxico. Es el agonista prototipo de los receptores colinérgicos nicotínicos, donde estimula de manera directa las neuronas y en última instancia, bloquea la transmisión sináptica (DrugBank, 2018). Se encuentra en las hojas del tabaco y es uno de los componentes principales para la dependencia del mismo (Mansvelder et al., 2009). Evidencia reciente, muestra una contribución directa de la nicotina al inicio y posterior crecimiento de distintos tipos de cáncer, entre los que destacan carcinomas de células pequeñas y de células no pequeñas, de cabeza, cuello, gástrico, pancreático, vesícula biliar, hígado, colon, mama, cuello uterino, vejiga urinaria y riñón (Grando, 2014).

Se ha demostrado que la nicotina potencia la proliferación celular, la migración, la invasión y la angiogénesis en múltiples tipos de cánceres, incluidos los del páncreas (Dasgupta et al., 2009; Grando, 2014; Mansvelder et al., 2009; Schaal et al., 2015). Asimismo, se le podría considerar un promotor tumoral, pues proporciona una resistencia a los fármacos empleados en quimioterapia a las células tumorales (Gnanamony y Gondi, 2017), esto al unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina, en la membrana celular. desencadenando cascadas de señalización, en su mayoría mediadas a través del $\alpha 7$ -nAChR, que se ha visto promueve la naturaleza invasiva del cáncer y presenta una mayor permeabilidad al calcio, en comparación con las otras subunidades (Schaal et al., 2015).

Una de las cascadas de señalización involucra a Ras/Raf-1/MEK1/ERK, dependiente de $\alpha 7$ -nAChR, que favorece la expresión y fosforilación de STAT-3, la cual ayuda a la regulación de la expresión génica, promoviendo el crecimiento y proliferación del cáncer (Fig. 3). Mientras que los receptores homoméricos de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$, presentan una mayor permeabilidad de calcio, favoreciendo el cambio de las células de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal, conocido también como transición epitelio mesénquima (TEM), con ello se favorece la separación y migración de las células tumorales. Para posteriormente, hacer el cambio fenotípico nuevamente, de mesenquimal a epitelial (TME), lo que permite realizar la colonización en un órgano nuevo. Por último, los nAChR homoméricos de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 3$, pueden inhibir la muerte programada (apoptosis), al expresar diversas proteínas antiapoptóticas, protegiendo a las células y confiriéndoles quimioresistencia (Grando, 2014; Papke y Thinschmidt, 1998).

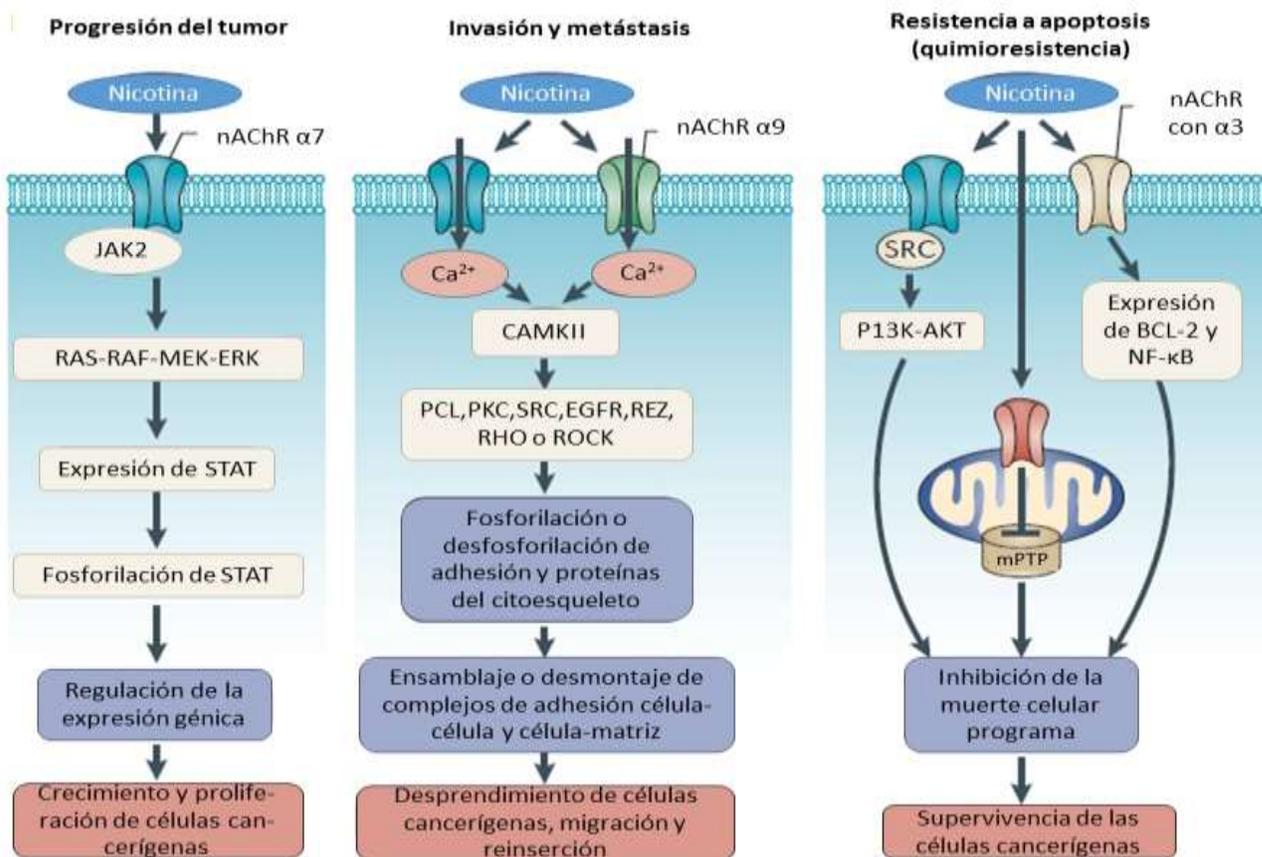


Figura 3. Esquemas hipotéticos de la acción de la nicotina en mecanismos carcinogénicos. Editado de (Grando, 2014).

1.1.5 Receptores de acetilcolina

Los receptores nicotínicos son proteínas de membrana celular, cuya función principal es la transducción de señales. Pueden dividirse en dos tipos, nicotínicos y muscarínicos (Flores y Segura, 2005). Son canales iónicos regulados por ligando, que forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Esta investigación se centró en los receptores nicotínicos, que están compuestos por cinco subunidades (α , β , γ o ϵ , δ). La composición de cada subunidad varía de un tejido a otro (Miyazawa et al., 2003). Siendo las subunidades α las más importantes, pues interactúan directamente con su agonista para permitir la apertura del canal (Corringer et al., 2000; Karlin, 2002) (Fig. 4A).

Pueden ser de tipo heteroméricos, es decir, compuestos por diferentes subunidades (Fig. 4B); u homomérico (Fig. 4C), compuesto por el mismo tipo de subunidad (Corringer et al., 2000; Prashanth et al., 2016). El receptor nicotínico de acetilcolina controla la señalización eléctrica entre las células nerviosas y musculares (Miyazawa et al., 2003).

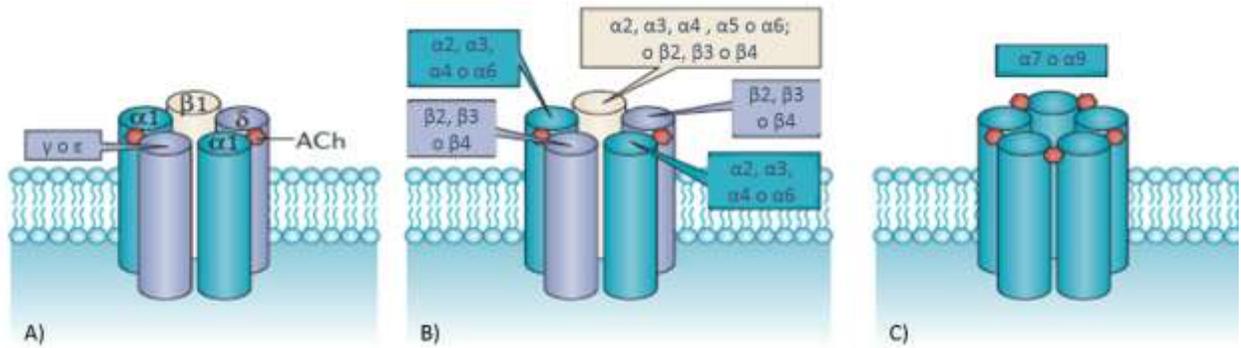


Figura 4. Tipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). A) Interacción de la acetilcolina con las subunidades alfa del receptor. B) Ejemplo de receptor nicotínico de acetilcolina de tipo heteromérico. C) Ejemplo de nAChR de tipo homomérico. Editado de (Grando, 2014).

1.1.6 Superfamilia *Conoidea*

La superfamilia *Conoidea*, una de las más diversas y taxonómicamente complejas, comprende a la familia *Conidae* que abarca a varios géneros, entre los que se encuentran, *Californiconus*, *Conasprella*, *Conus*, *Dalliconus*, *Darioconus*, *Dendroconus* y *Floraconus* (Fig. 5) (Bouchet & Rocroi, J. P, 2005; Puillandre et al., 2015). Se estima que incluyen alrededor de 700 especies (Gao et al., 2017). La identificación de los caracoles está basada en su morfología y el color de su concha. Los caracoles cónidos, son predadores marinos que tienen la capacidad de producir péptidos tóxicos, que utilizan como mecanismo de defensa, así como para capturar a sus presas al inmovilizarlas y facilitar su digestión (Puillandre et al., 2012).

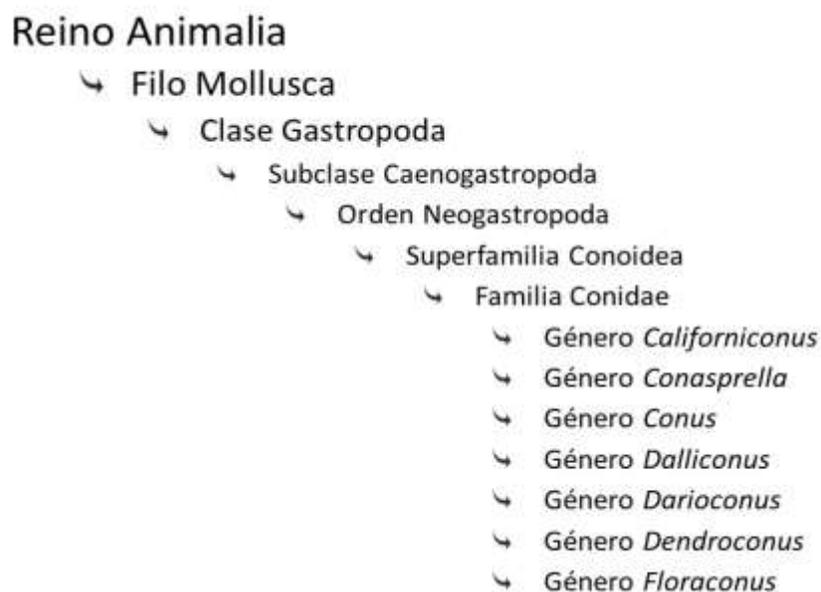


Figura 5. Clasificación taxonómica de la familia *Conidae* ("MolluscaBase. Conidae", 2019).

Estos venenos son muy complejos, debido a que se componen de 100 a 200 toxinas únicas (Gao et al., 2017; Robinson y Norton, 2014). Se ha estimado, que podrían ser cerca de 80,000 conotoxinas naturales en varios caracoles cónidos en todo el mundo. Por lo tanto, los caracoles cónidos podrían constituir la mayor biblioteca de compuestos bioactivos naturales, candidatos para el desarrollo de fármacos de origen marino.

Desde un punto de vista estructural, los péptidos encontrados en el veneno de estos caracoles, se dividen en dos grupos: conopéptidos, los cuales no tienen o solo poseen un enlace disulfuro; y conotoxinas, que son ricos en enlaces disulfuro (Halai y Craik, 2009). Las conotoxinas se clasifican en superfamilias de acuerdo con su secuencia de señal peptídica, una clasificación que se cree que refleja la evolución del sistema multigénico, hipótesis hasta el momento no probada a fondo (Puillandre et al., 2012). Así mismo existen ahora, dos nuevas formas de clasificación que incluyen estructuras dependientes de cisteína y familia farmacológica (Fig. 7) (Robinson y Norton, 2014).

Los cónidos poseen un aparato venenoso altamente sofisticado, que es responsable de la síntesis, almacenamiento y entrega de una gran diversidad de toxinas peptídicas. El cual está constituido por un ducto venenoso, donde se sintetiza el veneno y éste es expedido, por la fuerza generada en un bulbo muscular, hacia la probóscide. Posteriormente, un diente radular (formado en el saco radular) funciona de arpón y aguja hipodérmica, para la inyección del veneno en el organismo objetivo (Fig. 6) (Halai y Craik, 2009; Puillandre et al., 2012).

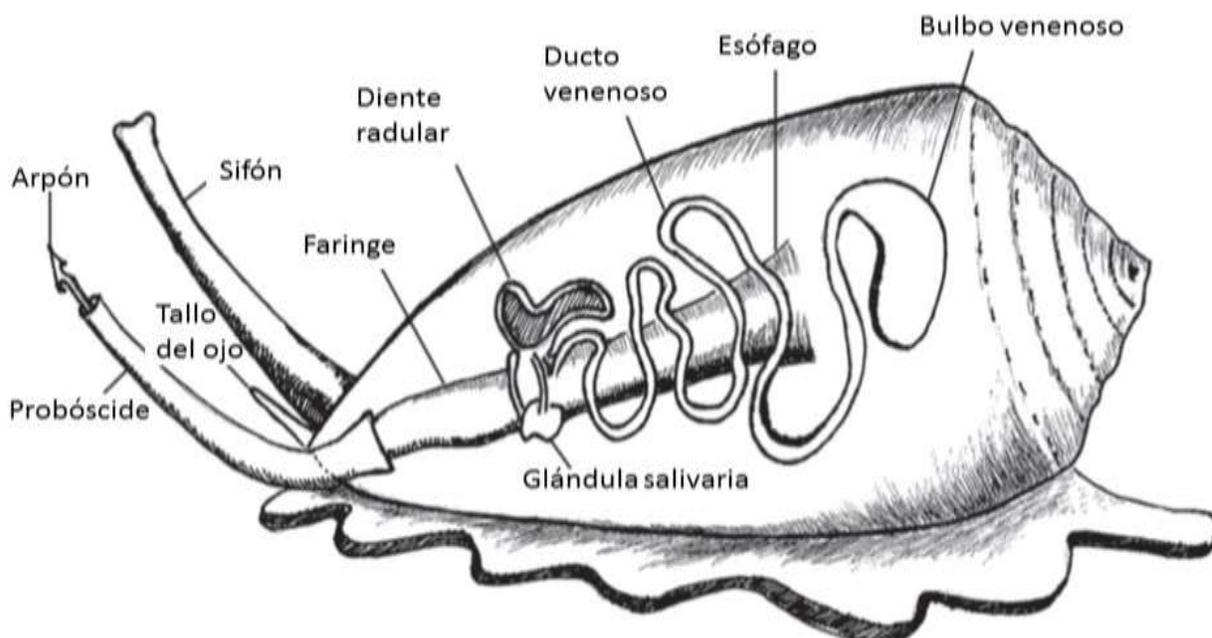


Figura 6. Diagrama del aparato venenoso de un caracol de la familia *Conidae*. Editado de (Halai y Craik, 2009).

1.1.6.1 Conotoxinas

Las conotoxinas, son moléculas de origen proteico, que presentan un rango de tamaño entre 10 a 71 aminoácidos, pero el 80% de ellos se encuentra entre 12 a 30 residuos de longitud. Presentan un alto grado de modificaciones postraduccionales (MPT), entre las que se encuentran proteólisis del amino y carboxilo terminal, amidación, hidroxilaciones de aminoácidos, carboxilación, epimerización, sulfatación, bromación de triptófano, glucosilación y ciclación; las cuales tienen una influencia en la estructura y actividad biológica de estos péptidos (Buczek et al., 2005; Gasperin, 2014). Pueden interactuar de manera agonista en un alto rango de blancos moleculares, que pueden incluir canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o transportadores de neurotransmisores (Palanisamy et al., 2015; Robinson & Norton, 2014). Con su alto rango de blancos moleculares, especificidad, potencia y estabilidad estructural, representan nuevas herramientas de investigación para ser usadas como péptidos neurofarmacológicamente activos.

1.1.6.2 Aplicaciones en biomedicina

En la página web de consulta de patentes mundiales, WIPO (World Intellectual Property Organization), aparecen cerca de 411 solicitudes de patentes con el criterio de conotoxinas para diferentes aplicaciones biomédicas, entre las que destacan los tratamientos para el dolor; tratamiento simpaticolítico de trastornos de la circulación de las extremidades, por ejemplo hipoxia, etc. (“WIPO - Search International and National Patent Collections”, s/f). Tal es el caso de la MVIIA una ω -conotoxina, la cual es conocida comercialmente como Prialt, usada en Estados Unidos y la Unión Europea como tratamiento para el dolor crónico, la cual fue aislada originalmente del caracol *Conus magnus* (Prommer, 2006; Skov et al., 2007). La α -conotoxina RgIA, proveniente de *Conus regius*, posee la capacidad de bloquear el subtipo $\alpha 9$ y 10 de los nAChR y puede usarse para tratar el dolor y la inflamación, incluido el dolor inflamatorio, el dolor relacionado con el cáncer y el dolor neuropático (Ellison et al., 2006). Otro ejemplo de esto, es la Ω -conotoxina GVIA o sus análogos como antagonistas presinápticos de iones de calcio en el tratamiento simpaticolítico de trastornos circulatorios de extremidades (WIPO DE000003926287).

1.1.6.3 Síntesis de conotoxinas

Uno de los principales obstáculos en el estudio de las conotoxinas, es la dificultad que presenta la obtención de estos péptidos de forma natural, es por ello que se buscan alternativas para su obtención (Gao et al., 2017). Una de las formas más efectiva es mediante la síntesis química, sin embargo, su elevado costo y la dificultad en la formación de múltiples enlaces disulfuro imponen una desventaja, es por ello que se está optando por su biosíntesis en diversos sistemas de expresión recombinante que permitan generar conotoxinas activas en gran cantidad y alta pureza (Akondi et al., 2014; Gasperin, 2014; Rosano y Ceccarelli, 2014).

El uso de conotoxinas sintéticas, representa muchas ventajas; desde un punto de vista bioético, al eliminar las prácticas con los especímenes vivos, ya que se requiere de la disección de una gran cantidad de caracoles para recabar suficiente material biológico; hasta el punto de vista técnico, dado que permite obtener un producto estandarizado, con elevada consistencia y reproducibilidad entre lotes, libre de contaminantes. Mejorando la calidad del producto y logrando una mayor cantidad de producto en menor tiempo (Guevara-Hernández et al., 2013; Rosano y Ceccarelli, 2014).

Para realizar la síntesis de las conotoxinas utilizadas en esta investigación, en trabajos previos se realizó la colecta de las especies *C. californicus* y *C. ximenes* en la región costera de Baja California, México. El veneno fue obtenido a partir de los ductos venenosos de los especímenes. Posteriormente, el extracto crudo fue purificado por RP-HPLC de acuerdo a su tiempo de retención y las fracciones cromatográficas fueron evaluadas mediante estudios electrofisiológicos o cultivo celular, evaluando actividad moduladora en la proliferación celular. (Bernáldez Sarabia, 2008; Cervantes, 2013). Es así, como una vez identificado el péptido con efecto modulador, este es secuenciado y sintetizado para su posterior evaluación en diferentes modelos biológicos (Oroz-Parra, 2011).

1.1.6.3.1 *Conasprella ximenes*

Conasprella ximenes, es una especie de caracol cono vermívoro que se encuentra en el Golfo de California, México. En trabajos anteriores, realizados por nuestro grupo de investigación, se describen tres péptidos aislados del veneno crudo de *C. ximenes*, que son similares en secuencia primaria, pero presentan estructura diferente. Mediante la técnica de fijación de membrana (en inglés patch clamp), se realizó un

registro electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus laevis*, técnica que permitió evaluar la actividad de diferentes subunidades de nAChR, al presentar estímulo con acetilcolina (ACh) a 200 μM y posteriormente en presencia de las conotoxinas a 5 μM , aplicada durante 30 segundos antes de agregar ACh. Cabe mencionar que se realizó periodos de lavado de 30 segundos entre diferentes aplicaciones de ACh, 200 segundos después de la aplicación de toxina (Fig. 8).

Determinando así, que la α -conotoxina xm1a se dirige de forma selectiva y preferentemente al $\alpha 7$ -nAChR, mientras su análogo con una C-terminal amidada, llamado xm1b, es aún más potente para este receptor, tal y como se muestra en la Figura 8. Además, xm1b presentó actividad hacia $\alpha 3\beta 4$ nAChRs. El último péptido, xm1c, el cual presenta una variación estructural con xm1a, presenta una hidrólisis entre Arg5 y Asp6, perdiendo el efecto modulador en el receptor $\alpha 7$, sin embargo, mantiene una ligera actividad con el $\alpha 3\beta 4$ nAChRs (Leebe, 2016).

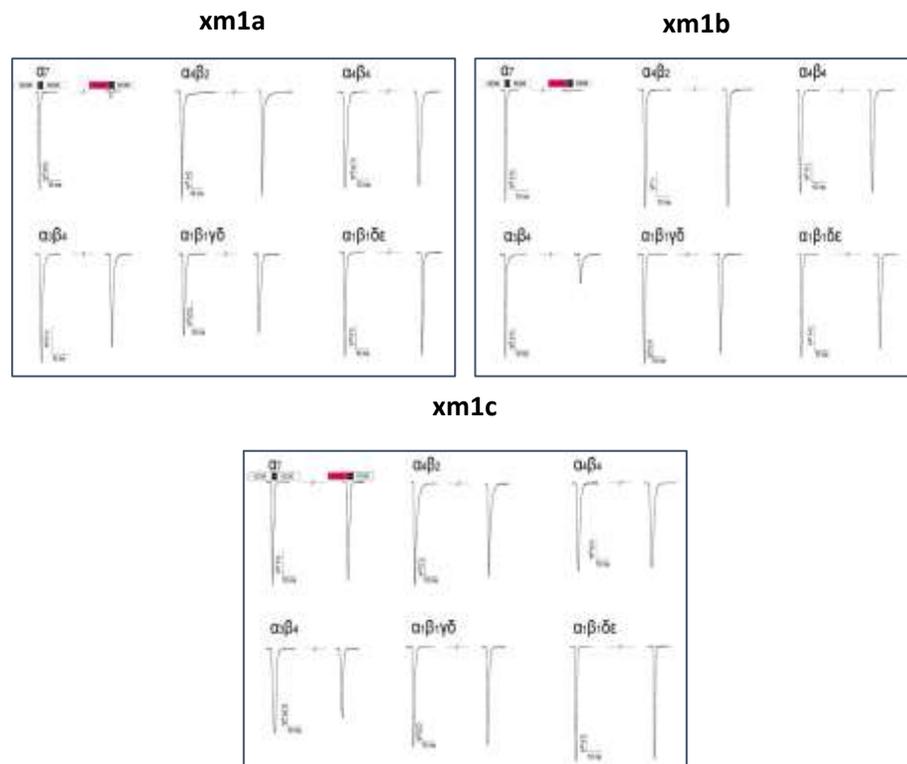


Figura 8. Perfil electrofisiológico de xm1a, xm1b y xm1c. Durante los registros, los ovocitos se perfundieron continuamente con solución ND96, a una velocidad de 2 ml/min, con 5 μM de cada conotoxina (barra roja) aplicada durante 30 segundos antes de agregar ACh. Se aplicó ACh (200 μM) durante 2 segundos a 2 ml/min, con períodos de lavado de 30 segundos entre diferentes aplicaciones de ACh y 200 segundos después de la aplicación de toxina (Leebe, 2016).

1.1.6.3.2 *Californiconus californicus*

Se encuentran en el Océano Pacífico oriental, desde la bahía de San Francisco, California hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur, México. No poseen una dieta especializada, por lo que pueden consumir hasta 56 organismos pertenecientes a diferentes phyla (Biggs et al., 2010).

Las conotoxinas cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c, se basan en toxinas nativas aislada del caracol marino *Californiconus californicus*. Por otra parte, las conotoxinas cal14.1a y cal14.1b, muestran una variación de un solo aminoácido en su secuencia, la modificación en el aminoácido 15, cambiando un ácido glutámico por una glicina (Oroz-Parra, 2011, 2016). El efecto citotóxico de estos péptidos ya sintéticos, fue previamente probada en una línea de cáncer de pulmón (Oroz-Parra et al., 2016), mostrando resultados significativos en la reducción de la proliferación (Fig. 9) , a la par se realizó una caracterización de las subunidades de nAChR (Fig.10), hipotetizando una relación entre la disminución de la viabilidad celular y las subunidades $\alpha 5$ y $\alpha 7$. En este trabajo de investigación se evaluaron en líneas celulares de cáncer pancreático.

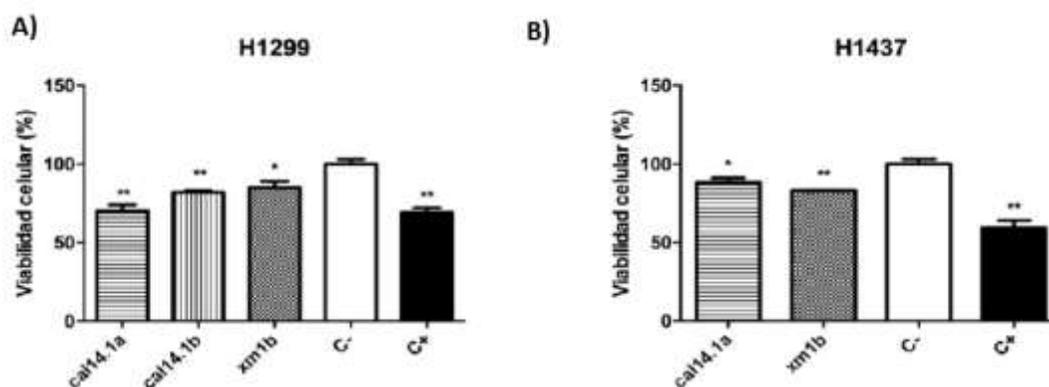


Figura 9. Efecto citotóxico de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en la supervivencia celular. Las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299 y H1437, se cultivaron en placas de 96 pozos y fueron tratadas con cal14.1a a 27 μ M, cal14.1b 28 μ M y xm1b 33 μ M, durante 24 h. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm con el reactivo MTS. Los resultados se normalizaron con el C- para obtener el porcentaje de supervivencia celular y se expresaron como la media \pm SEM. Para el C+ se utilizó estaurosporina a concentración final de 5 μ M. * p <0.05, ** p <0.001 y *** p <0.001 respecto al C- (t de Student's, no pareada) (Oroz-Parra, 2016).

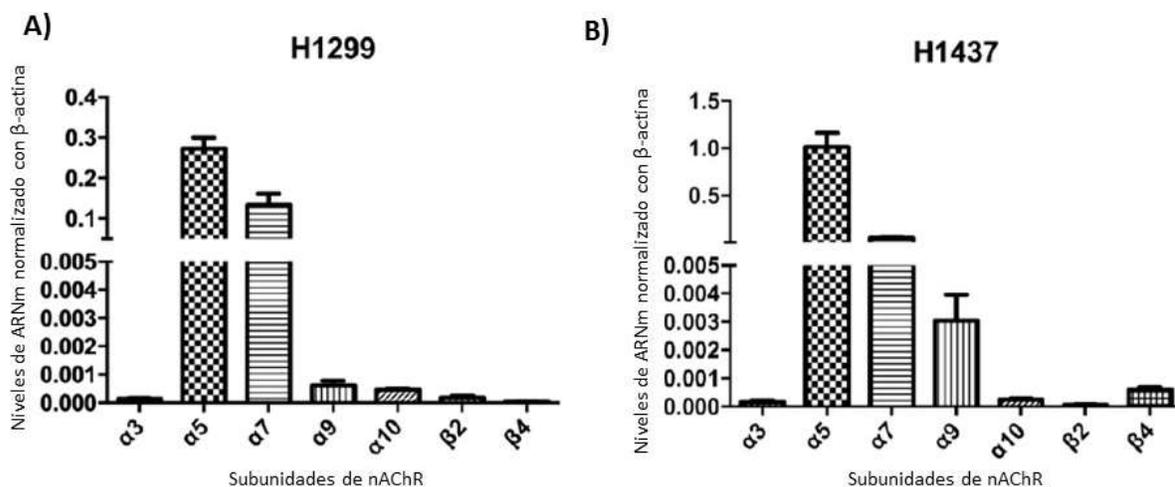


Figura 10. Expresión de subunidades de nAChRs en las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299 y H1437. Los niveles de ARNm se compararon por RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados con el gen β -actina y expresados como la media \pm SEM (Oroz-Parra et al., 2016).

1.2 Justificación

El cáncer de páncreas sigue siendo un importante problema de salud sin resolver, y los tratamientos convencionales contra éste, tienen poco éxito en la resolución de la enfermedad. Asimismo, se relacionan a los receptores nicotínicos de acetilcolina como moduladores de la proliferación celular, metástasis y apoptosis en el cáncer de páncreas.

Por otro lado, los caracoles cónidos son una fuente de diversos compuestos proteicos que actúan como moduladores de receptores iónicos dependientes de ligando, estos compuestos abren un gran campo de estudio para el desarrollo de nuevas terapias. La identificación de las α -conotoxinas, que actúan como moduladores del $\alpha 7$ -nAChR, pueden tener un papel importante en un nuevo enfoque que permita la disminución en la proliferación del cáncer.

1.3 Hipótesis

Debido a que las α -conotoxinas provenientes de *C. ximenes* (xm1a, xm1b y xm1c) y *C. californicus* (cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c) actúan sobre el receptor $\alpha 7$ -nAChR, estas inducirán apoptosis en células de cáncer pancreático.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

1. Determinar el efecto en la proliferación celular en líneas de cáncer pancreático al aplicar diferentes α -conotoxinas

1.4.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la expresión de diferentes subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina (α 3, α 4, α 7, α 9, α 10, β 2 y β 4) en las líneas celulares de cáncer pancreático PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3
2. Evaluar la actividad con las α -conotoxinas sintéticas provenientes de *C. ximenes* y *C. californicus*, en la viabilidad celular de líneas de cáncer pancreático PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3
3. Evaluar la muerte celular que inducen las α -conotoxinas analizadas en este estudio

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer de páncreas

2.1.1 Preparación de material y equipo

Se trabajó con 3 líneas celulares de cáncer de páncreas, PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3 (Tabla 1), dentro de una campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, LABCONCO).

Tabla 1. Características de líneas celulares de cáncer de páncreas (ATCC®).

Línea celular	Enfermedad	Características	Medio de cultivo	Radio de subcultivo
PANC-1	Adenocarcinoma epitelial	Células adherentes Morfología: Epitelial	Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), modificado para contener L-glutamina 4 mM, 4500 mg/l de glucosa, piruvato de sodio 1 mM y 1500 mg/l de bicarbonato de sodio.	1:2 a 1:4
CAPAN-2	Adenocarcinoma	Células adherentes Morfología: Poligonal	McCoy's 5A, modificado para contener L-glutamina 1,5 mM y de bicarbonato de sodio 2200 mg/l	1:2 a 1:4
BxPC-3	Adenocarcinoma	Células adherentes Morfología: Epitelial	RPMI-1640, modificado para contener L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 4,500 mg/l de glucosa, y 1,500 bicarbonato de sodio mg/l	1:3 a 1:8

Previo a trabajar con las líneas celulares, todo el material fue esterilizado y el equipo se limpió para tenerlo en condiciones de asepsia. Los medios utilizados se suplementaron con antibiótico antimicótico (penicilina 10,000 unidades/ml, estreptomycin 10 µg/ml y anfotericina B 25 µg/ml, marca Gibco®) al 1 % y suero fetal bovino (SFB) (Life technologies) al 10 %. Todo el trabajo se realizó con los medios suplementados,

exceptuando los tratamientos de “starving” o con bajos niveles de nutrientes, en cuyo caso se especifica que es medio sin suplementar.

2.1.2 Activación de líneas celulares

Se sacó un criovial de la línea celular a trabajar, se descongeló a baño María (37 °C) y el contenido de éste, se adicionó a un tubo falcón, con 9 ml de medio de cultivo previamente colocados. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 800 rcf durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio, posteriormente se agregó a una caja de cultivo celular (tratada para el crecimiento de tejido, área de cultivo 56.7 cm²) con 7 ml de medio de cultivo. Se colocó el cultivo en una incubadora a 37 °C con una atmósfera parcial de CO₂ a 5 % durante 24 horas.

2.1.3 Mantenimiento celular

Se observaron las células diariamente en un microscopio invertido, Axiovert 200, Zeiss, por contraste de fase con un objetivo de 4x a 40x. Posteriormente, se lavó con solución amortiguadora de fosfatos a 1X (PBS, ver Anexo 1) y se cambió el medio de cultivo de la caja 3 veces por semana, de acuerdo al procedimiento sugerido por ATCC para cada línea celular. Una vez alcanzado el 80 % de confluencia en monocapa celular en todo el cultivo se procedió a separar las células de la caja.

2.1.3.1 Tripsinización de líneas celulares

Se utilizó la enzima tripsina para separar las células del soporte al que están adheridas. Esto se realizó una vez que se observó, al menos, el 80 % de confluencia en la caja de cultivo celular, por medio del microscopio invertido por contraste de fases. Primeramente, se retiró el medio de cultivo de la caja con la ayuda de una pipeta, después se adicionaron 6 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) para retirar el excedente de medio de cultivo. Posteriormente, se retiró el PBS con la ayuda de una pipeta y se agregó 1 ml de tripsina (Tripsina-EDTA 0.25 %, rojo fenol de Gibco® a 1X), una vez realizado se colocó la caja en la incubadora a 37 °C al 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa durante 5 a 10 min, dependiendo

de la línea celular. Posteriormente, se agregaron 4 ml de medio para inhibir la tripsina, se homogenizó la suspensión y se transfirió a un tubo cónico de 15 ml.

2.1.3.2 Expansión de cultivo

Se transfirió 1 ml de la suspensión homogenizada (previamente obtenida del punto 2.1.3.1) a cada caja nueva, posteriormente se les adicionó 7 ml de medio, las cajas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Esto para un radio de expansión 1:8, sin embargo entre líneas celulares esto cambia (revisar Tabla 1).

2.1.3.3 Conteo celular

El conteo celular, se realizó por medio de un hematocitómetro, en el cual se colocaron 10 µl de una suspensión previamente preparada que contenía: 10 µl de suspensión celular (previamente obtenida del punto 2.1.4) y 10 µl del colorante azul de tripano (Trypan Blue Stain (0.4 %) de Gibco® 10X, diluido en PBS 1X, para una dilución de 1:10), dando una dilución de 1:1.

Las células se contabilizaron por cuadrante y se sumó el resultado. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$Total\ de\ células\ vivas = \left[\frac{Células\ vivas\ contadas}{No.de\ cuadrantes\ contados} \right] [Factor\ de\ dilución][10,000][Volumen\ final] \quad (1)$$

2.1.4 Criopreservado de líneas celulares

Se centrifugó la suspensión celular resultante del punto 2.1.3 a 800 rcf durante 5min, descartando el sobrenadante y homogenizando el sedimento celular con medio suplementado al 5 % de DMSO. Se dispensó en crioviales (con un rango de 1.5 a 2 millones de células por vial) y se pasó al recipiente de congelación Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ para llevarlo al ultracongelador a -80 °C.

2.2 Caracterización de receptores nicotínicos de acetilcolina

2.2.1 Aplicar tratamiento

Se sembraron 5,000 a 15, 000 células por pozo en placas de 12 pocillos, donde a unos pozos se les aplicó un tratamiento con nicotina a 100 nmol/l y se dejaron incubar 24 h para hacer la primera extracción de ARN, posteriormente a las 48 y 72 h se continuó con la segunda y tercera extracción.

2.2.2 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN de las células en monocapa con TRI Reagent® Solution de Applied Biosystems™ de acuerdo a las especificaciones del fabricante y con modificaciones en los ciclos del termociclador. El área de trabajo, así como el material a utilizar (micropipetas, gradillas, etc.), fueron previamente limpiados con RNAsa away (Anexo 2) y etanol al 70 %. Las células fueron lisadas en las placas de cultivo celular después de eliminar el medio, se agregó 1 ml de TRI Reagent™ por cada 10 cm² de superficie, se homogenizó y transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas. Se agregaron 100 µl de 1-bromo-3-cloropentano (BCP, 99 %, ACROS Organics™) por cada ml de reactivo TRI Reagent® utilizado para lisis, luego se agitó vigorosamente e incubó a temperatura ambiente por 5-15 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra durante 15 min a 12,000 rpm. La mezcla se separó, en la parte inferior e interfase se distinguió en rojo el fenol-cloroformo, y una fase acuosa superior incolora. La fase acuosa que contiene el ARN se transfirió a un tubo nuevo.

Se añadieron 500µl de isopropanol por ml de TRI Reagent® utilizado, la muestra fue agitada con un mezclador de vórtice y se dejó incubando de 5-10 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar durante 10 min a 12,000 rpm. El ARN se sedimentó en el fondo del tubo, se procedió a remover el sobrenadante y lavar el sedimento añadiendo 1 ml de etanol al 75 % por cada ml de reactivo TRI Reagent® utilizado. Se centrifugaron durante 8min a 12,000 rpm, se descartó el sobrenadante y dejó secar el sedimento por 5-10 min por aire. Finalmente, se resuspendió el ARN en agua con pirocarbonato de dietilo (DEPC ≥ 97 %, Sigma-Aldrich) al 0.1 % (Anexo 2).

El ARN fue cuantificado usando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000, y su calidad fue visualizada en un gel de agarosa al 2 % y 1 % de blanqueador comercial (concentración de hipoclorito de sodio al 3.5 %, marca Superior) (Anexo 2) (Aranda et al., 2012). Las muestras con una relación de A260/A280 \geq 1.9 fueron utilizadas para la síntesis de ADN complementario (ADNc).

2.2.3 Retrotranscripción del ARN a ADNc

Se empleó el kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase de Invitrogen™. En un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas, se agregaron los siguientes componentes: 0.5 μ l de oligo (dT)₂₀ (50 μ M), 0.5 μ l de hexámeros al azar (Random hexamers), 5 μ g de ARN total en 6 μ l y 1 μ l de buffer de templado (Annealing Buffer).

Se calentó la mezcla a 65 °C durante 5 minutos e incubó en hielo durante al menos 1 minuto, mientras se le agregaron 10 μ l de la mezcla de reacción (2X First-Strand Reaction Mix) y 2 μ l de enzima (SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix). Posteriormente se incubó a 25 °C durante 10 minutos, para luego aumentar la temperatura de reacción a 50 °C por 50 minutos y terminar con 85 °C por 5 minutos. Al término de la reacción se obtuvo una concentración aproximada de 100 ng/ μ l de ADNc, al aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADNc} = \frac{(\mu\text{l de ARN})(\text{Concentración de ARN})}{Vf \text{ de reacción}} \quad (2)$$

2.2.4 RT-qPCR

Para la amplificación del ADNc, se diseñaron cebadores para RT-qPCR utilizando el software Primer3 (Untergasser et al., 2012) con base en las secuencias de los transcritos seleccionados (Tabla 2), se utilizó β -actina como gen de referencia, y se buscó caracterizar las subunidades α 3, α 4, α 7, α 9, α 10, β 2 y β 4 de los receptores nicotínicos de acetilcolina, en las diferentes líneas celulares.

2.2.4.1 Validación de oligonucleótidos

Mediante una curva estándar de cada par de oligonucleótidos, se midieron cinco diluciones de una cantidad conocida de ADNc (100, 20, 4, 0.8 y 0.16 ng). Se realizó una mezcla con el reactivo SYBR® Green PCR Master Mix, oligonucleótidos del gen de interés a una concentración de 10 nM agregando 0.5 µl y ADNc a las concentraciones a probar en 4 µl, con un volumen final de 10 µl. Se amplificó en un equipo 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystem. El programa de amplificación consistió en: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C y 1 minuto a 60 °C, para la Curva de Fusión (Melt Curve) se continuó con 15 minutos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C y 15 segundos a 60 °C.

Para los tratamientos se realizó una mezcla con reactivo SYBR® Green PCR Master Mix agregando 5 µl; de oligonucleótidos del gen de interés a una concentración de 10 nM se adicionó 0.5 µl y de ADNc a 5 ng/µl un volumen de 4 µl, con un volumen final por pozo de 10 µl. Siguiendo el mismo programa de amplificación previamente descrito.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el análisis de genes por qPCR

	SECUENCIA	GENBANK
β-actina	S: GCGAGAAGATGACCCAGATC A: CCAGTGGTACGGCCAGAGG	NM_001101
α3-nAChR	S: CTGGTGAAGGTGGATGAAGT A: CTCGCAGCAGTTGTACTTGA	NM_001166694.1
α4-nAChR	S: TCAACACATAATGCCATGGC A: CCTCACGGACATCATTTTCC	NM_000745.3
α7-nAChR	S: GCCAATGACTCGCAACCACGTC A: CCAGCGTACATCGATGTAGCA	NM_000746.6
α9-nAChR	S: GACTGAGAGCTGCAGAGACG A: AATCTGCAGGGTCACATTCA	NM_017581.3
α10-nAChR	S: AGCTGTTCCGTGACCTCTTT A: TGTCGATGATCTGGGACAGT	NM_020402.2
β2-nAChR	S: ATGACCAGAGCGTGAGTGAG A: AAGAGAGGCTGCAGGAACAT	NM_000748.2
β4-nAChR	S: TGTGCAGGAGGCATTAGAAG A: GACGCACACAAACATGAACA	NM_000750.3

S: sentido; A: antisentido.

2.2.4.2 Análisis de resultados de RT-qPCR

Se analizaron primero todas las condiciones evaluando solamente el gen β -actina, posteriormente se realizó el método “*Fold Induction*” para que todos los valores del umbral de ciclo (Cycle Threshold C_t) de las muestras estén en el mismo rango, se tomaba como referencia el C_t más bajo (Fórmulas 3-4) y todas las demás muestras se diluían para alcanzar dicho valor (Fórmula 5).

Fórmulas:

$$\text{Diferencia de } C_t = C_{t \text{ referencia}} - C_{t \text{ evaluado}} \quad (3)$$

$$\text{Potencia} = 2^{\text{Diferencia}} \quad (4)$$

$$\text{Volumen de agua} = \left(\text{Volumen de muestra} \times \left(2^{C_{t \text{ referencia}} - C_{t \text{ evaluado}}} \right) \right) \quad (5)$$

Se volvió a correr otro qPCR para verificar que las diluciones se hicieron correctamente, y finalmente se procedió a evaluar todos los genes.

Para la comparación entre la expresión de genes de los tratamientos utilizados, se utilizó el método de ΔC_t sin la corrección de eficiencia (Fórmulas 6-7). Donde se supone una duplicación óptima del ADN objetivo en cada ciclo de RT-qPCR (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008).

Fórmulas:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta C_t} \quad (6)$$

$$\Delta C_t = C_{t \text{ gen de interés}} - C_{t \text{ gen de referencia}} \quad (7)$$

El gen β -actina se utilizó como gen de referencia durante todos los análisis.

2.3 Ensayos de viabilidad celular

En una placa de cultivo de 96 pozos, se sembraron de 5,000 a 20,000 células por pozo dependiendo de la línea celular, de PANC-1 se sembraron 5,000 células, CAPAN-2 20,000 y de BxPC-3 15,000, en un volumen

final de 100 μl y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO_2 y 95 % de humedad durante 24 h. Se adicionaron los 6 péptidos sintéticos por separado a la placa de cultivo incubada, los cuales estaban resuspendidos en agua destilada estéril, a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Tabla 3). Se tomó la cantidad indicada de toxina en la concentración mayor, posteriormente se multiplicó por la cantidad de réplicas.

Tabla 3. Cantidad de toxina utilizada por pozo para cada dilución. Toxinas resuspendidas en agua destilada estéril, con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Conotoxina	Masa molecular (Da o g/mol)	Diluciones en μM					
		5	0.5	0.05	0.005	0.0005	0.00005
xm1a	1519.6	7.60E-07	7.60E-08	7.60E-09	7.60E-10	7.60E-11	7.60E-12
xm1b	1519.6	7.60E-07	7.60E-08	7.60E-09	7.60E-10	7.60E-11	7.60E-12
xm1c	1538.78	7.69E-07	7.69E-08	7.69E-09	7.69E-10	7.69E-11	7.69E-12
cal14.1a	1847.16	9.24E-07	9.24E-08	9.24E-09	9.24E-10	9.24E-11	9.24E-12
cal14.1b	1775.1	8.88E-07	8.88E-08	8.88E-09	8.88E-10	8.88E-11	8.88E-12
cal14.1c	1858.1	9.29E-07	9.29E-08	9.29E-09	9.29E-10	9.29E-11	9.29E-12

Como controles positivos (C+) se utilizaron: Im1 a una concentración final de 5 μM (inhibidor del $\alpha 7$ -nAChR (Maslennikov et al., 1999)); cisplatino a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (332 μM) (fármaco quimioterapéutico de primera línea para diferentes tipos de cáncer); estaurosporina y etoposide a 5 μM (usados como medicamento para tratar algunos tipos de cáncer por su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales); y solución salina (solución de cloruro de sodio al 0.9 %) 100 μl . Adicionalmente se colocó un control de DMSO, esto debido a que estaurosporina y etoposide estaban disueltos en DMSO al 100 %, se tomó el volumen máximo utilizado dando una concentración final por pozo de 0.05 % de DMSO (Tabla 4). El control negativo (C-) fueron las células sin tratar y para eliminar el fondo de placa se colocó medio sin células. Posteriormente, se incubó la placa de cultivo a 37 °C con 5 % de CO_2 y 95 % de humedad durante 24 h, después se agregaron 10 μl del reactivo CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay por pozo, y se incubó durante 3 horas bajo las mismas condiciones anteriores.

Después de las 3 h se tomó lectura de la placa de cultivo en un microlector de placas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc) usando el software Gen5™ versión 2.01, a una longitud de onda de 490nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 4. Controles usados en los ensayos de viabilidad. Concentraciones iniciales de cada tratamiento, volumen utilizado y concentración final en el pozo.

Tratamiento	Concentración inicial	Volumen utilizado	Concentración final (vf=100ul)
Cisplatino	1 mg/ml = 3.32 mM	10 µl	332 µM
Im1	2 µg/µl = 1479.71 µM	0.3375 µl	5 µM
Etoposide	1 mM	0.05 µl	5 µM
Estaurosporina	1 mM	0.5 µl	5 µM
Control DMSO	100 %	0.5 µl	0.05 %
DMSO 10 %	100 %	10 µl	10 %
Solución salina	0.9 %	100 µl	0.9 %

2.3.1 Análisis de resultados en viabilidad celular

Para los resultados obtenidos de las absorbancias (ABS), se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \left[\frac{(ABS_{\text{Tratamiento}} - ABS_{\text{Fondo de placa}})}{(ABS_{\text{BCO}} - ABS_{\text{Fondo de placa}})} \right] \times 100 \quad (8)$$

Se graficó la media y la desviación estándar. Posteriormente, se realizó una ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($n=3$ $\alpha=0.05$). Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism® (Versión 5).

2.4 Ensayos de muerte celular por imagen de fluorescencia

En una placa de cultivo de 96 pozos, se adicionaron de 5,000 a 15,000 células por pozo en un volumen final de 100 µl y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad durante 24 h, posteriormente se agregó las α -conotoxinas provenientes de *C. californicus* para lograr una concentración final de 5 µM (Tabla 3).

Para los controles positivos, se utilizó cisplatino a 3.32 mM agregando 2.5 µl (concentración final = 83 µM), y estaurosporina a 1 mM se adicionó 0.125 µl (concentración final = 1.25 µM), esto para cada pozo. Las

células sin tratamiento fueron consideradas como control negativo (Tabla 5). Se incubaron las placas 24 h bajo las mismas condiciones.

Tabla 5. Controles usados en los ensayos in vitro de imagen por fluorescencia. Concentraciones iniciales de cada tratamiento, volumen utilizado y concentración final en el pozo.

Tratamiento	Concentración inicial	Volumen utilizado	Concentración final (vf=100ul)
Cisplatino	1 mg/ml = 3.32 mM	2.5 µl	83 µM
Estaurosporina	1 mM	0.125 µl	1.25 µM

Se diluyó en PBS 1X, 40 µl de ioduro de propidio o IP (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml y 10 µl de Hoechst 33342 triclorhidrato trihidrato (solución 10 mg/ml, Life Technologies) a 1 mg/ml. Se agregó 100 µl de la dilución a cada pozo, quedando un volumen final por pozo de 200 µl con IP a 15 µM y Hoechst a 8.11 µM. Se dejó incubar por 10 min a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, en resguardo de la luz. Se diluyó el CellEvent™Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Life Technologies) en PBS 1X con 5 % de SFB (Biowest), para una concentración final de 5 µM (Tabla 6). Se retiró el medio y adicionó 100 µl de la dilución de CellEvent™Caspase-3/7 Green Detection Reagent a cada pozo. Se incubó nuevamente durante 30 minutos y se observó en un microscopio de fluorescencia invertido EVOS® FLOID® Cell Imaging Station (Life technologies), con tres filtros azul (390-40/ 446-33 nm), verde (482-18/ 532-59 nm) y rojo (586-15/ 646-68 nm).

Tabla 6. Colorantes utilizados en el ensayos in vitro de imagen por fluorescencia. Concentraciones iniciales de cada reactivo, volumen utilizado y concentración final en el pozo.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen utilizado	Concentración final
Ioduro de propidio	1 mg/ml	40 µl	15 µM
Hoechst	1 mg/ml	10 µl	8.11 µM
CellEvent Caspase 3/7	2 mM	100 µl	5 µM

Se tomaron fotografías de cada pozo y se contó el número de células para cada colorante, tomando el conteo del colorante azul (Hoechst 33342) como el total de células y con base a eso se normalizó el total de células activas para los colorantes rojo (ioduro de propidio) y verde (CellEvent™Caspase-3/7).

2.4.1 Análisis de resultados de muerte celular

Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ (Schneider et al., 2012), que permitió contar de manera más eficiente las células positivas para cada uno de los colorantes. Tomando en consideración que las células teñidas con Hoechst representaban el total neto de la muestra (100 %), se aplicaron las siguientes fórmulas para conocer el porcentaje de activación de IP y caspasas 3/7:

$$\% \text{ de células positivas a IP} = \left[\frac{(\text{Cant de células positivas a IP})}{(\text{Cant de células positivas a Hoechst})} \right] \times 100 \quad (9)$$

$$\% \text{ de activación de caspasas 3/7} = \left[\frac{(\text{Cant de células positivas a Caspasa 3/7})}{(\text{Cant de células positivas a Hoechst})} \right] \times 100 \quad (10)$$

Se graficó la media y la desviación estándar. Posteriormente, se realizó una ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett (n=3 $\alpha=0.05$). Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism® (Versión 5).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización de receptores nicotínicos de acetilcolina

Se realizó la caracterización de los niveles de expresión de los receptores nicotínicos de acetilcolina en las líneas celulares PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3, por medio de un ensayo de RT-qPCR; se realizaron 3 extracciones de ARN a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 h) posteriores a un estímulo con nicotina a 100 nM. Los intervalos de tiempo para PANC-1 y BxPC-3 fueron 24, 48 y 72 h posteriores del tratamiento con nicotina, y en el caso de CAPAN-2 solo se realizó un conjunto de extracciones a 24 h del tratamiento.

En la línea celular PANC-1 se puede observar en los gráficos (Fig. 11), que solo en presencia de nicotina es expresada la subunidad $\alpha 4$, pero empieza a disminuir conforme transcurre el tiempo (Fig. 11-C). De igual manera ocurre con $\alpha 3$ en presencia y ausencia del tratamiento (Fig. 11-B), por el contrario en las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 4$ hay una inhibición de la expresión de estas subunidades al aplicar el tratamiento con nicotina (Fig. 11-D y -H). Por otro lado, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 2$ muestran un aumento del tiempo 24 al 48, sin embargo, disminuye a las 72 h (Fig. 11-E a -G). Las subunidades $\alpha 9$ y $\beta 2$ son las únicas que su expresión se ve favorecida en presencia de nicotina, esto transcurridas 48 h del tratamiento. Al aplicar el tratamiento de nicotina, se ve disminuida la expresión a las 24 h de las subunidades restantes ($\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 10$ y $\beta 2$) al compararlas con sus controles sin tratamiento. La mayor abundancia relativa está a cargo de las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 7$ en el control sin tratamiento de nicotina a 24 h (Fig. 11-A).

En la línea celular BxPC-3 (Fig. 12), al realizar la tasa de cambio (mejor conocido como “*Fold Induction*” o “*Fold Change*”), con respecto al primer control sin nicotina (tiempo 24) de cada gen, se puede ver una disminución de la expresión de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 10$ al aplicar un tratamiento con nicotina (Fig. 12-D y -F), por el contrario en las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ y $\beta 4$ se puede ver un aumento, el cual se ve favorecido con el transcurso del tiempo (Fig. 12-B,-G y -H). Sin embargo, al tener la abundancia relativa y comparar todos los genes a la par, la subunidad $\alpha 7$ presenta la mayor expresión relativa respecto a las otras subunidades, principalmente a las 72 h posteriores de la aplicación del tratamiento (Fig. 12-A).

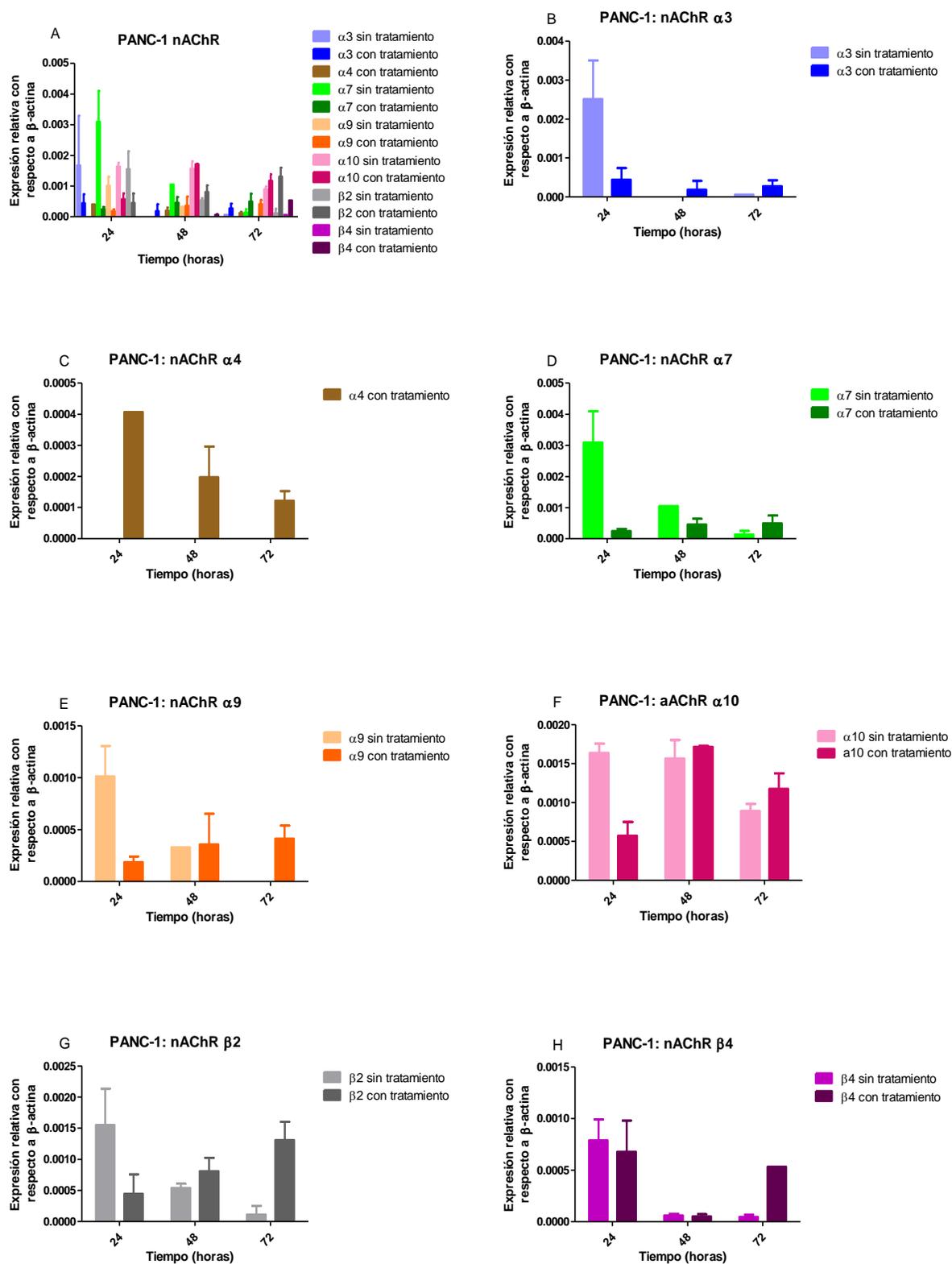


Figura 11. Caracterización de los nAChR en la línea celular PANC-1 a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 h) posteriores a la aplicación del tratamiento con nicotina a 100nM. A) Todas las subunidades de nAChR probadas en la línea celular. B a H) Gráficas individuales de las diferentes subunidades de nAChR para mejor apreciación. Los resultados son normalizados con respecto a la expresión relativa de β -actina y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (n=3 α =0.05).

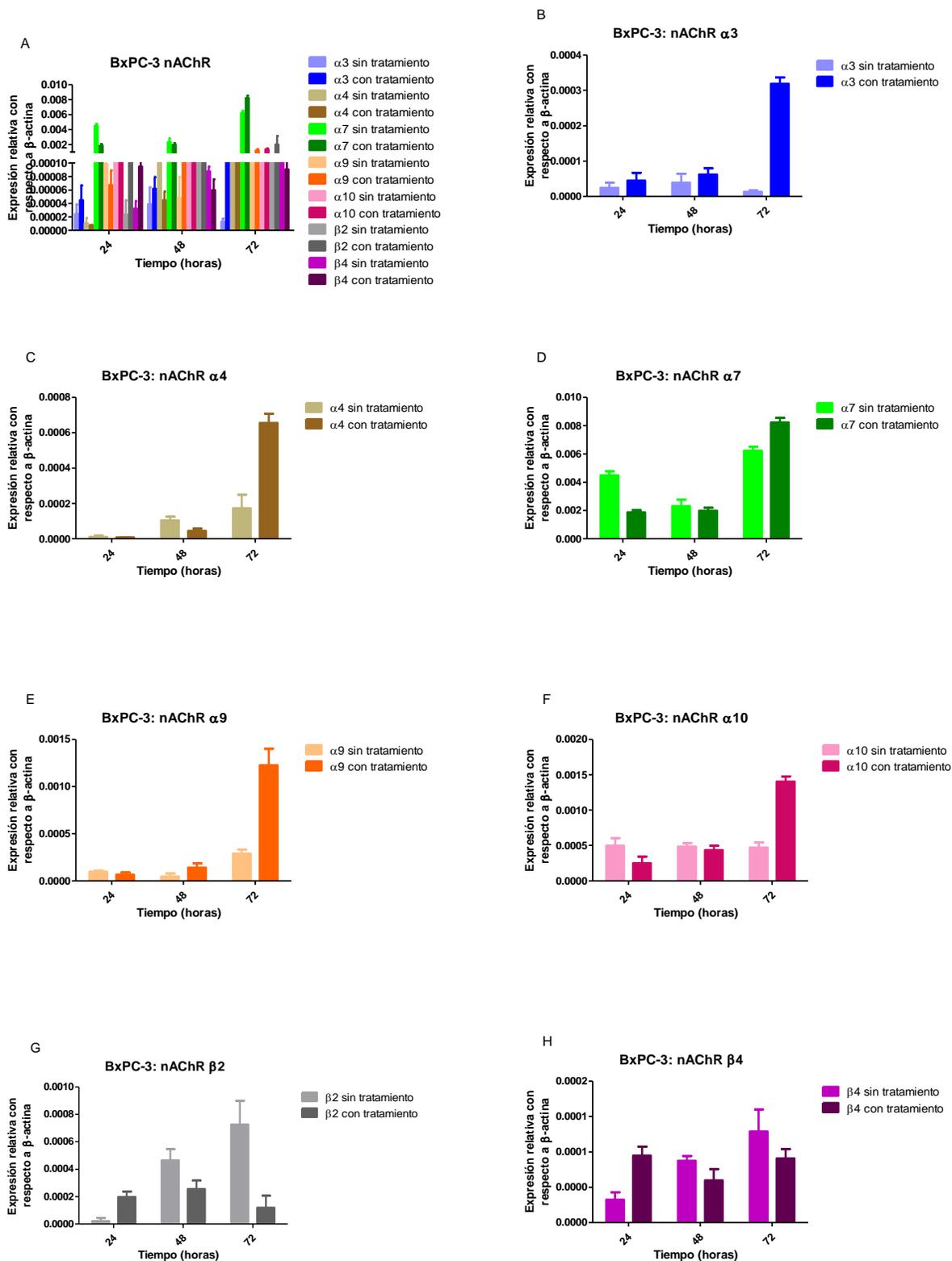


Figura 12. Caracterización de las diferentes subunidades de nAChR en la línea celular BxPC-3 a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 h) posteriores a la aplicación del tratamiento con nicotina a 100nM. A) Todas las subunidades de nAChR probadas en la línea celular. B a H) Gráficas individuales de las diferentes subunidades de nAChR para mejor apreciación. Los resultados son normalizados con respecto a la expresión relativa de β -actina y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni ($n=3$ $\alpha=0.05$).

En la línea celular CAPAN-2, la expresión relativa de las diferentes subunidades de nAChR con o sin tratamiento de nicotina, no se observan diferencias significativas (Fig. 13), mostrando así que al menos a 24 h posteriores de la exposición con nicotina no tiene efecto alguno en la expresión de ninguna subunidad. En la Figura 13 se puede ver que la subunidad más predominante en esta línea celular es $\beta 2$, de ahí le sigue $\alpha 10$ y $\alpha 9$.

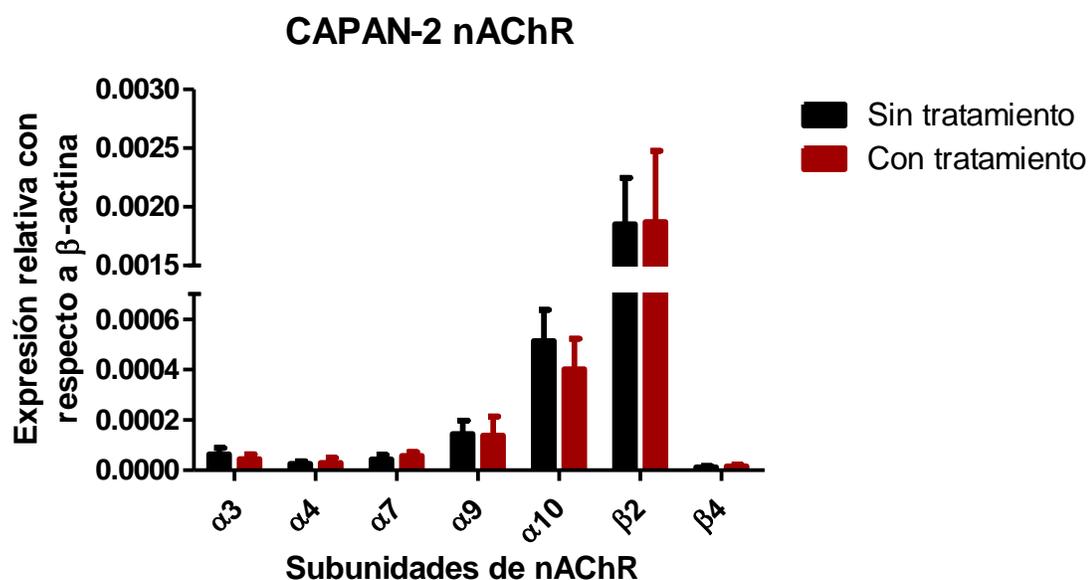


Figura 13. Caracterización de las diferentes subunidades de nAChR en la línea celular CAPAN-2, 24 h posteriores a la aplicación del tratamiento con nicotina a 100nM. Los resultados son normalizados con respecto a la expresión relativa de β -actina y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni (n=3 α =0.05).

3.2 Ensayos de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular, se utilizó el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, el cual es un método colorimétrico para determinar el “número de células viables” en proporción, pues lo que mide en realidad este ensayo es la actividad metabólica de las mitocondrias en las células, por parte de las deshidrogenasas. El reactivo contiene un compuesto de tretazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (sal MTS) y fenazina etodulfato (PMS, por sus siglas en inglés) un reactivo de acoplamiento de electrones. El compuesto de tetrazolio MTS es bio-reducido por las células en un producto de formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo y provoca un cambio de color. Esta conversión es realizada por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

(NADP⁺ en su forma oxidada y NADPH⁺ en su forma reducida) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina (abreviado NAD⁺ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida), producidas por las enzimas deshidrogenasas, en células metabólicamente activas. La cantidad de producto de formazán, medida por la absorbancia a 490 nm, es entonces directamente proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo (Promega®).

En las líneas celulares PANC-1 y BxPC-3 se probaron 6 conotoxinas en diferentes concentraciones partiendo de 5 µM a 50 pM, en diluciones 1:10. Los controles positivos utilizados fueron cisplatino (CDDP) a 100 µg/ml (332 µM), pues es uno de los principales fármacos quimioterapéuticos para tratar diferentes tipos de cáncer (He et al., 2016); estaurosporina (STS) un alcaloide aislado de *Streptomyces staurosporeus* que se conoce por activar apoptosis en células de cáncer (Yadav et al., 2015; Yadav et al., 2015); etopósido (ETO) a 5 µM, también conocido como VP-16, una podofilina semisintética derivada de la planta de podofilo *Podophyllum notatum*, usada como medicamento para tratar algunos tipos de cáncer por su capacidad de inhibir la replicación de las células tumorales (O'Dwyer et al., 1985; N. Yadav et al., 2015); solución salina (SS) y DMSO 10 %. Como control negativo, se utilizaron células sin tratamiento (BCO). Debido a que estaurosporina y etopósido estaban diluidas en DMSO al 100 %, se puso un control de DMSO (CT DMSO) para verificar que el efecto citotóxico de estos fármacos se debiera a ellos y no al DMSO en que están disueltos, se tomó el volumen máximo utilizado dando una concentración final por pozo de 0.05 % de DMSO.

En los controles con etopósido a 5 µM, no mostró tener efecto significativo en ninguna de las líneas celulares, mientras que estaurosporina redujo un 79 % en PANC-1 y un 97 % en BxPC-3. El control de DMSO no redujo la supervivencia celular, demostrando así que el efecto de los fármacos etopósido y estaurosporina se deben a ellos y no al DMSO en el que están disueltos. Mientras que con el fármaco cisplatino se produjo una reducción del 75 al 88 % dependiendo de la línea celular. La solución salina causa muerte por choque osmótico y falta de nutrientes, en ambas líneas celulares se observan resultados muy similares. Mientras que con DMSO al 10 %, tuvieron un efecto citotóxico en el 80 al 95 % de las células. Siendo la línea celular BxPC-3 la que tuvo una mayor sensibilidad a los tratamientos con los controles positivos.

En la línea celular PANC-1 (Fig. 14), existe una disminución del 23 % con los tratamientos de xm1a y xm1c (Fig. 14-A y -C), mientras que con xm1b solo hubo un 18 % (Fig. 14-B). Se puede observar un efecto dosis respuesta con cal14.1a, siendo la concentración de 5 µM la que presentó un mayor resultado con 48 % de decremento en la viabilidad, seguido de 0.5 µM con 28 % (Fig. 14-D); mientras que con cal14.1c fue del 37

% a esa misma concentración (Fig. 14-F). Por otro lado cal14.1b tuvo el efecto contrario, aumentando un 16 % la viabilidad celular (Fig. 14-E).

En la línea celular BxPC-3 (Fig. 15), al aplicar las conotoxinas xm1a y xm1b se puede observar una disminución del 30 % en la viabilidad celular (Fig. 15-A y -B), mientras que con xm1c solo es de un 16 %, esto solo a una concentración de 5 μM (Fig. 15-C). Hubo un efecto mayor en la reducción de la supervivencia celular con cal14.1a, de aproximadamente un 46 %, cal14.1b un 53 % y con cal14.1c el decremento fue de un 44 % (Fig. 15-D a -F).

En un ensayo posterior se amplió la concentración de las conotoxinas para verificar si se intensificaba el efecto en las líneas celulares PANC-1 y BxPC-3. La concentración máxima probada en estos segundos ensayos fue 10 veces mayor al primer experimento, siendo ahora 50, 25, 5 y 0.5 μM las concentraciones a tratar. Se puede observar que el efecto no se ve intensificado al aumentar la concentración del tratamiento en ninguna de las dos líneas. (Fig. 16 y 17). Para los controles se utilizó, el cisplatino a 100 $\mu\text{g/ml}$ (332 μM) y la α -conotoxina Im1 a 5 μM , debido a que es un conocido inhibidor del $\alpha 7$ -nAChR (Maslennikov et al., 1999; Wu et al., 2011).

En PANC-1 los tratamientos con las conotoxinas xm1a y xm1b, mostraron tener un efecto también a las concentraciones 50, 25 y 5 μM muy similar entre sí, sin embargo, cuando lo comparamos con el blanco, la concentración con mayor efecto fue de 5 μM con tres grados de significancia, mientras que 50 y 25 μM solo tuvo dos grados de significancia (Fig. 16-A y -B). Por otra parte, las conotoxinas xm1c, cal14.1a y cal14.1c al aumentar la concentración el efecto modulador en la viabilidad celular se pierde por completo (Fig. 16-C, -D y -F). En el caso de cal14.1b a ninguna concentración se observa un efecto significativo, mientras que en ensayos previos mostraba un aumento del 16 % (Fig. 16-E).

En la línea celular BxPC-3, los tratamientos con las conotoxinas xm1a y xm1c a 25 y 5 μM (Fig. 17-A y -C) mostraron un efecto significativo muy similar en la disminución de la viabilidad celular, con respecto al blanco. Sin embargo, la conotoxinas xm1b y cal14.1b solo a la concentración de 5 μM , tienen un efecto (Fig. 17-B y -E). Por otro lado, con las conotoxinas xm1c (Fig. 17-C), cal14.1a (Fig. 17-D), cal14.1b (Fig. 17-E) y cal14.1c (Fig. 17-F), al aumentar la concentración de la conotoxina, a la par lo hizo la disminución en el porcentaje en la supervivencia celular. En cal14.1a a 50 y 25 μM , hay una disminución del 17 % en la supervivencia celular en ambas concentraciones, mientras que a 5 y 0.5 μM fue mayor del 35 % (Fig. 17-D).

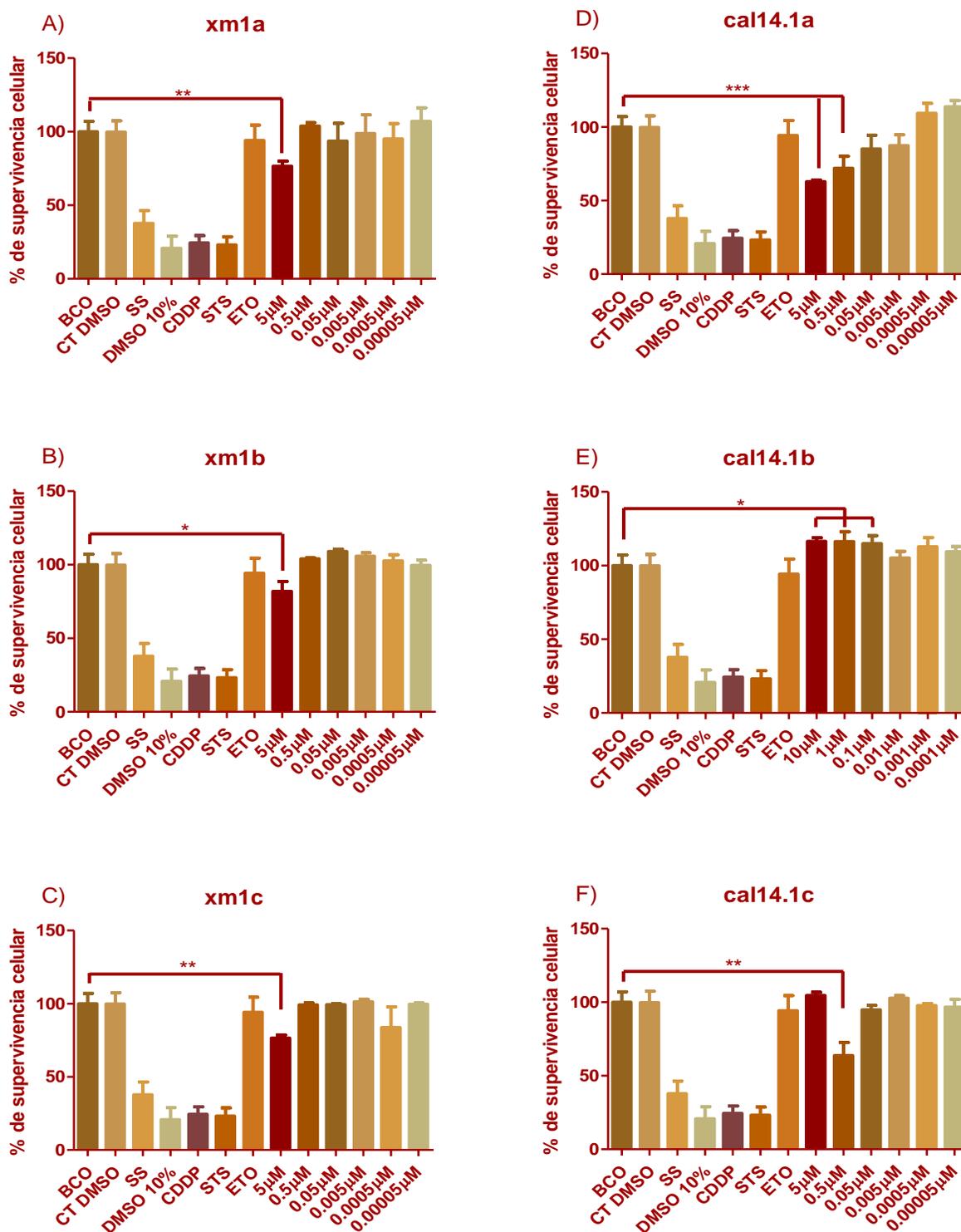


Figura 14. Ensayo de viabilidad celular en la línea PANC-1. A-C) Conotoxinas de *C. ximenes*. D-F) Conotoxinas de *C. californicus*. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratamiento) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples (n=3 α =0.05). Se utilizaron los siguientes controles positivos: CT DMSO= Control de DMSO al 0.05 %; SS= Solución salina; DMSO al 10%; CDDP= Cisplatino 332 μ M; STS= Estaurosporina 5 μ M; ETO= Etoposide 5 μ M.

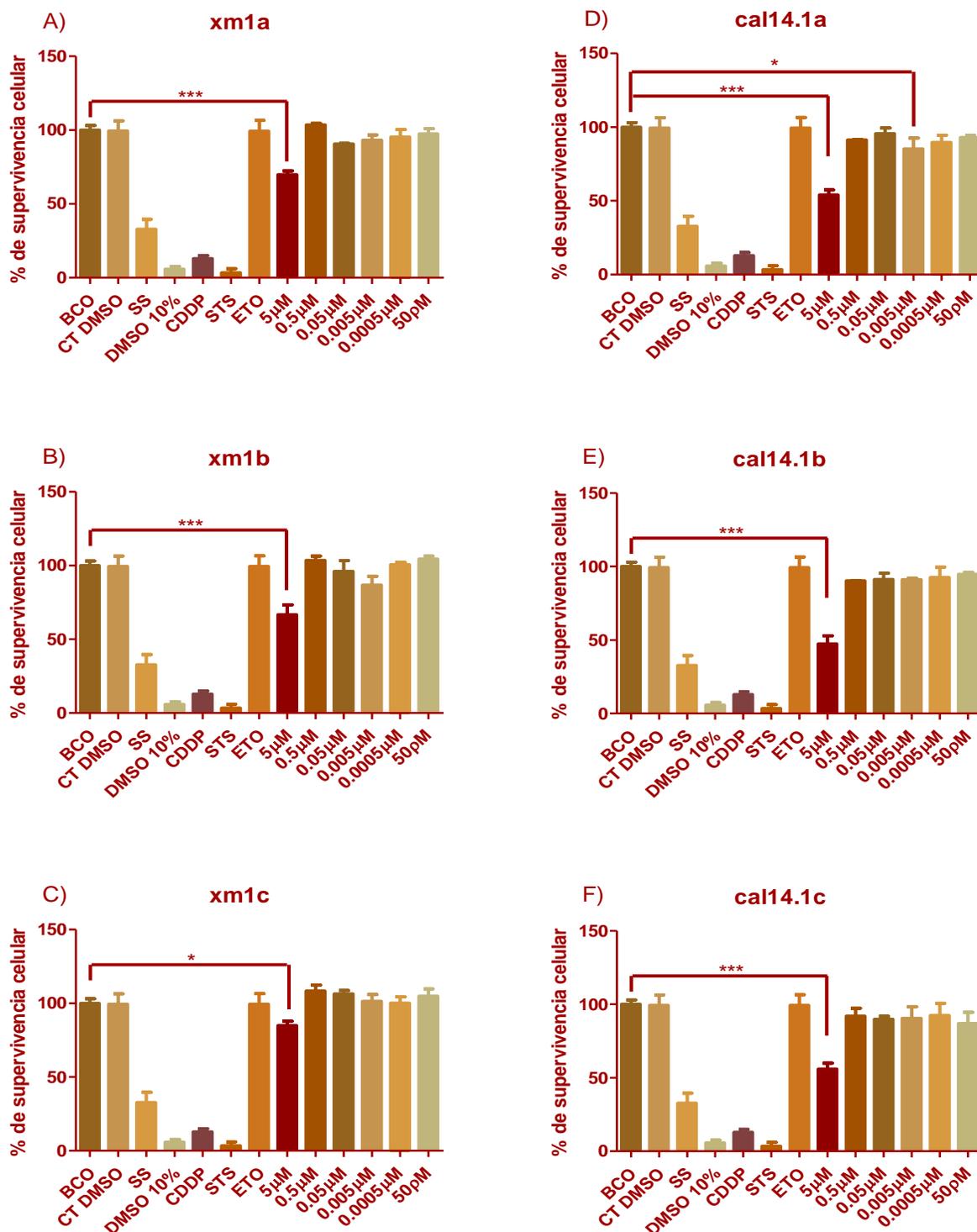


Figura 15. Ensayo de viabilidad celular en la línea BxPC-3. A-C) Conotoxinas de *C. ximenes*. D-F) Conotoxinas de *C. californicus*. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratamiento) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples ($n=3$ $\alpha=0.05$). Se utilizaron los siguientes controles positivos: CT DMSO= Control de DMSO al 0.05 %; SS= Solución salina; DMSO al 10%; CDDP= Cisplatino 332 μ M; STS= Estaurosporina 5 μ M; ETO= Etoposide 5 μ M.

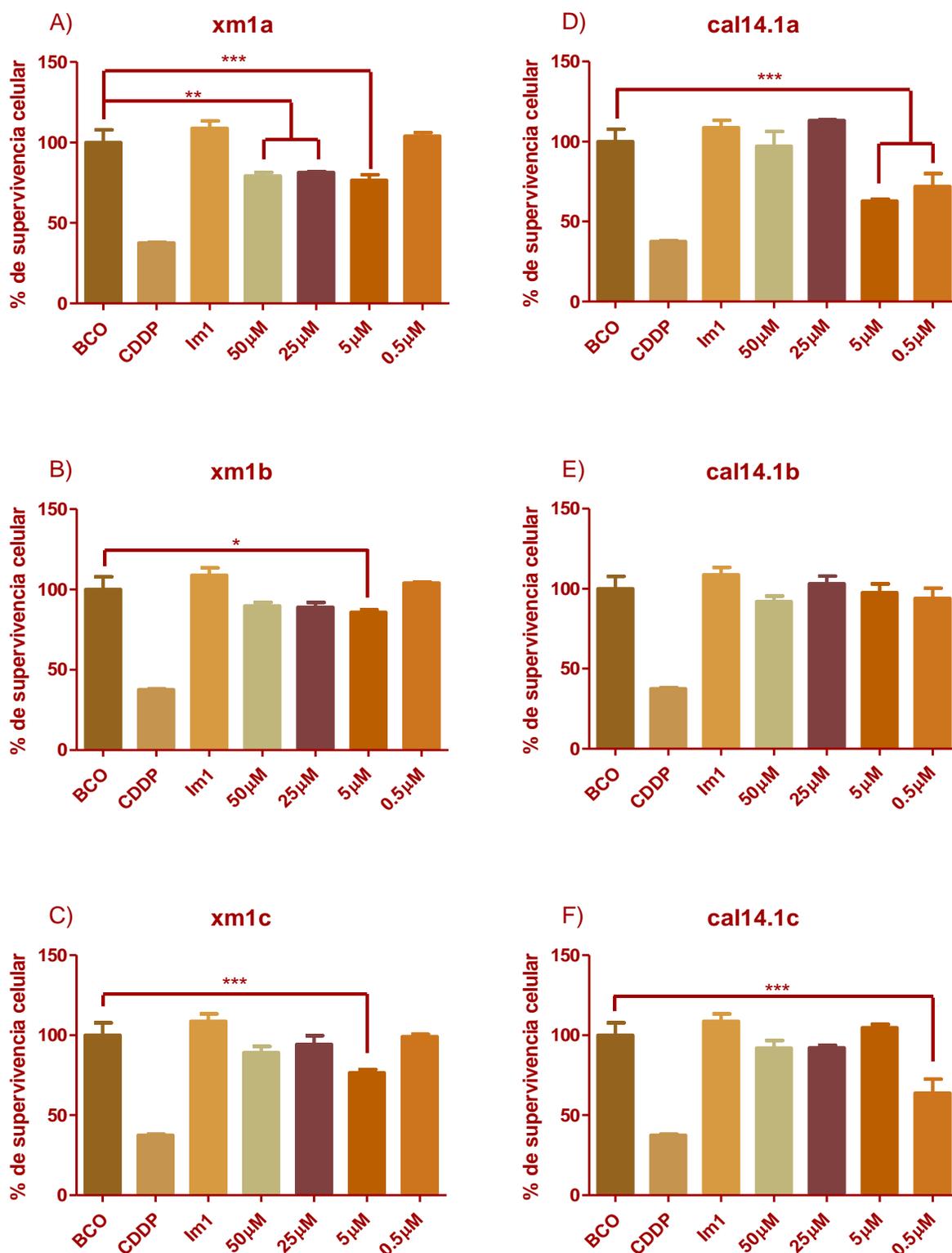


Figura 16. Ensayo extendido de viabilidad en la línea PANC-1 donde se aumentó la concentración máxima a 50 µM. A-C) Conotoxinas de *C. ximenes*. D-F) Conotoxinas de *C. californicus*. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratamiento) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media±SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples ($n=3$ $\alpha=0.05$). Se utilizaron los siguientes controles positivos: CDDP= Cisplatino 332 µM; Im1= Conotoxina Im1 5 µM.

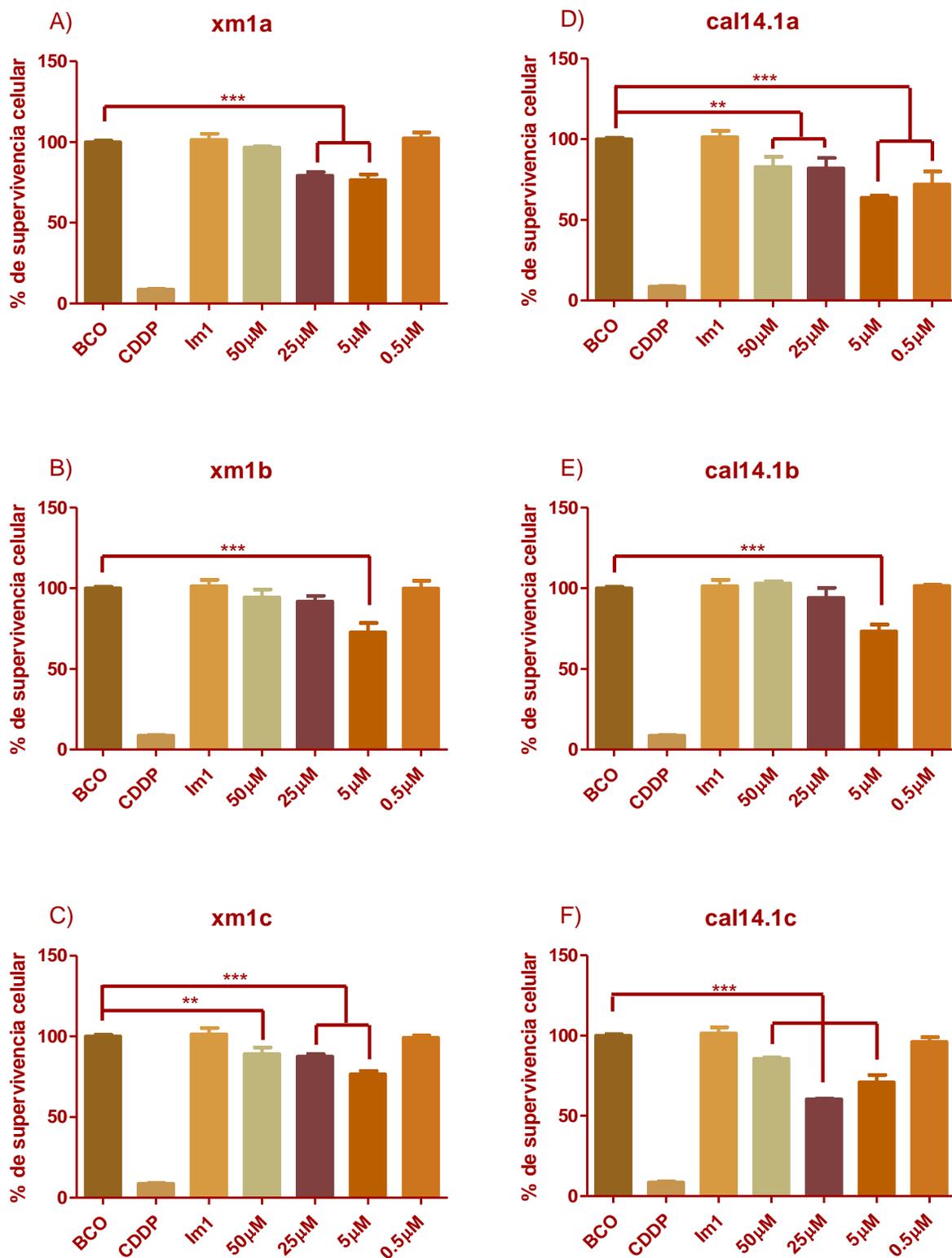


Figura 17. Ensayo extendido de viabilidad en la línea BxPC-3 donde se aumentó la concentración máxima a 50 μM . A-C) Conotoxinas de *C. ximenes*. D-F) Conotoxinas de *C. californicus*. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratamiento) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples ($n=3$ $\alpha=0.05$). Se utilizaron los siguientes controles positivos: CDDP= Cisplatino 332 μM ; Im1= Conotoxina Im1 5 μM .

En la línea celular CAPAN-2 (Fig. 18), se probaron las mismas conotoxinas pero solo a una concentración de 5 μM ; de control positivo se utilizó la α -conotoxina Im1 a 5 μM , y cisplatino a 100 $\mu\text{g/ml}$ (332 μM). El tratamiento con el fármaco cisplatino mostró una reducción del 20 % en la viabilidad celular, por el contrario, los tratamientos con las conotoxinas xm1a y cal14.1b presentan un aumento del 10 % en la supervivencia. Mientras que con las conotoxinas Im1, xm1b, xm1c, cal14.1a y cal14.1c no se observó una diferencia significativa con respecto al blanco.

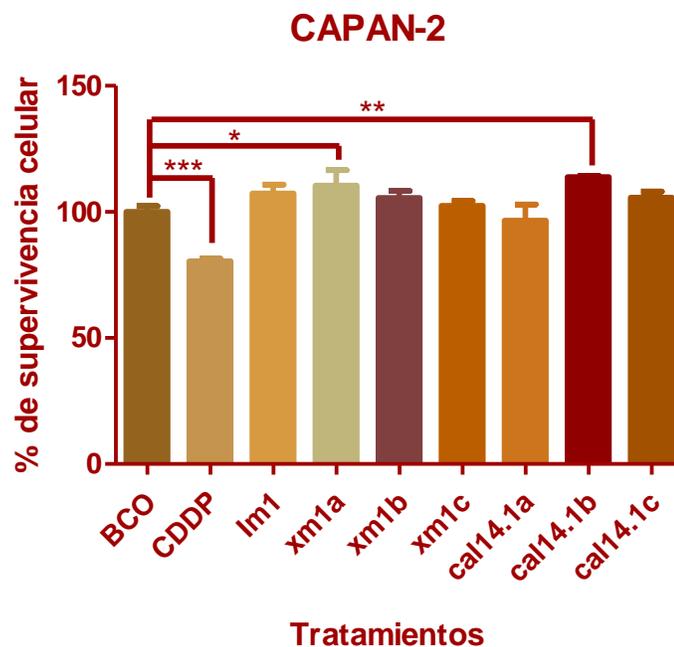


Figura 18. Ensayo de viabilidad celular en la línea CAPAN-2 con las conotoxinas de *C. ximenes* (xm1a, xm1b y xm1c) y *C. Californiconus* (cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c) a 5 μM . Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratamiento) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples (n=3 α =0.05). Se utilizaron los siguientes controles positivos: CDDP= Cisplatino 332 μM ; Im1= Conotoxina Im1 5 μM .

3.3 Ensayos de muerte celular por imagen de fluorescencia

En este ensayo se buscó determinar la muerte celular que inducían las conotoxinas, para ello solo se usaron los péptidos sintéticos cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c, las cuales tuvieron un mayor efecto en la disminución celular mediante el ensayo MTS, en las líneas celulares PANC-1 y BxPC-3. Como control positivo se aplicaron tratamientos con cisplatino a 83 μM y estaurosporina a 1.25 μM ; como control negativo, fueron usadas células sin tratamiento (BCO). Mediante microscopía fluorescente se pudieron

observar células positivas para los colorantes IP, Hoechst y CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent.

Para las tinciones celulares se usaron los siguientes reactivos: (1) Hoechst, un colorante fluorescente permeable a la membrana celular y que tiñe al ADN, empleado para visualizar núcleos y mitocondrias, tomado como control de la densidad celular; (2) CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent, con el cual se pueden detectar las células positivas para caspasas 3/7, ya que es un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD) conjugado con un colorante fluorescente de unión a ácidos nucleicos, después de la activación de las caspasas 3/7 en células apoptóticas, el péptido DEVD se escinde, lo que permite que el fluoróforo se una al ADN y produzca una respuesta fluorescente; y (3) el yoduro de propidio, el cual se une al ADN, este colorante no es permeable a la membrana, por lo que es útil para diferenciar las células necróticas, apoptóticas y sanas en función de la integridad de su membrana.

Las células BxPC-3 tratadas con las conotoxinas cal14.1a y cal14.1c son doble positivas (CellEvent™ / IP), es decir presentan actividad de las caspasas 3/7 así como una pérdida de integridad en su membrana celular. Los controles de estaurosporina y cisplatino tuvieron una activación de caspasas 3/7 mayor del 95 %, sin embargo, se puede ver una diferencia con respecto al IP. Para ello se realizó la prueba de Bonferroni, que nos muestra una diferencia significativa entre la activación de caspasas 3/7 y la integridad de la membrana celular (células positivas a IP), esto solo con el tratamiento con cisplatino (Fig. 19). Lo cual se puede observar de manera más visual en las fotografías de cada uno de los tratamientos (Fig. 20 a 25).

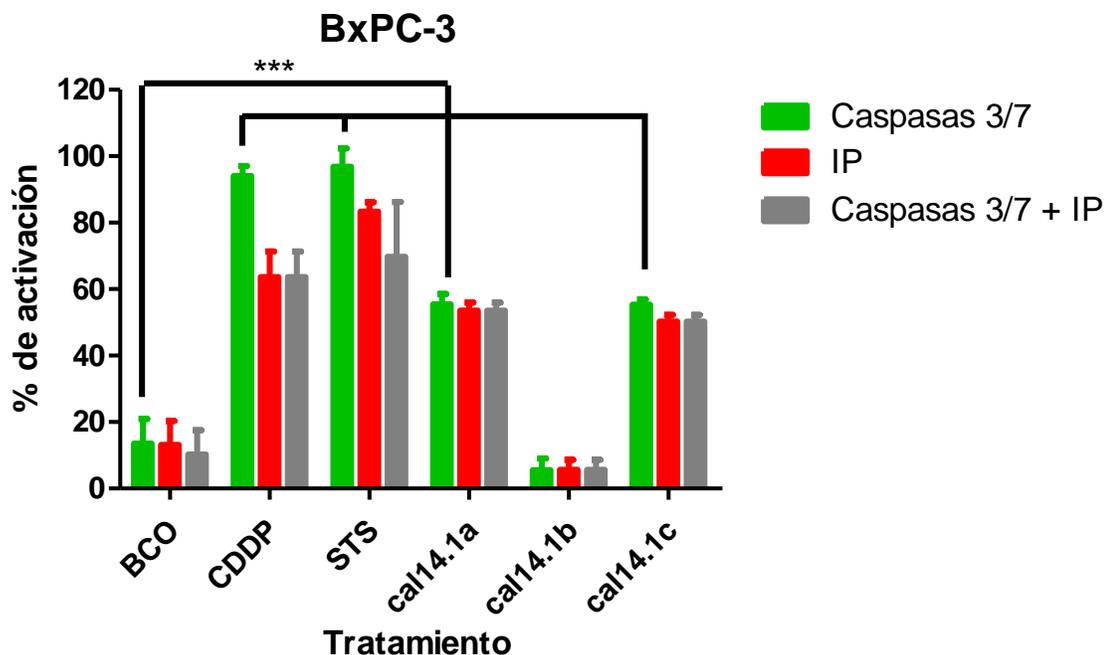


Figura 19. Ensayo de microscopía fluorescente de la línea celular BxPC-3, con células positivas a IP y CellEvent™, 24 h posteriores al tratamiento con conotoxinas (cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c) a 5 μ M y los controles. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células positivas a caspasas 3/7 (verde) y a IP (rojo), y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples (n=3 α =0.05). Los controles utilizados fueron: BCO= Células sin tratar; CDDP= Cisplatino a 83 μ M; STS= Estaurosporina a 1.25 μ M.

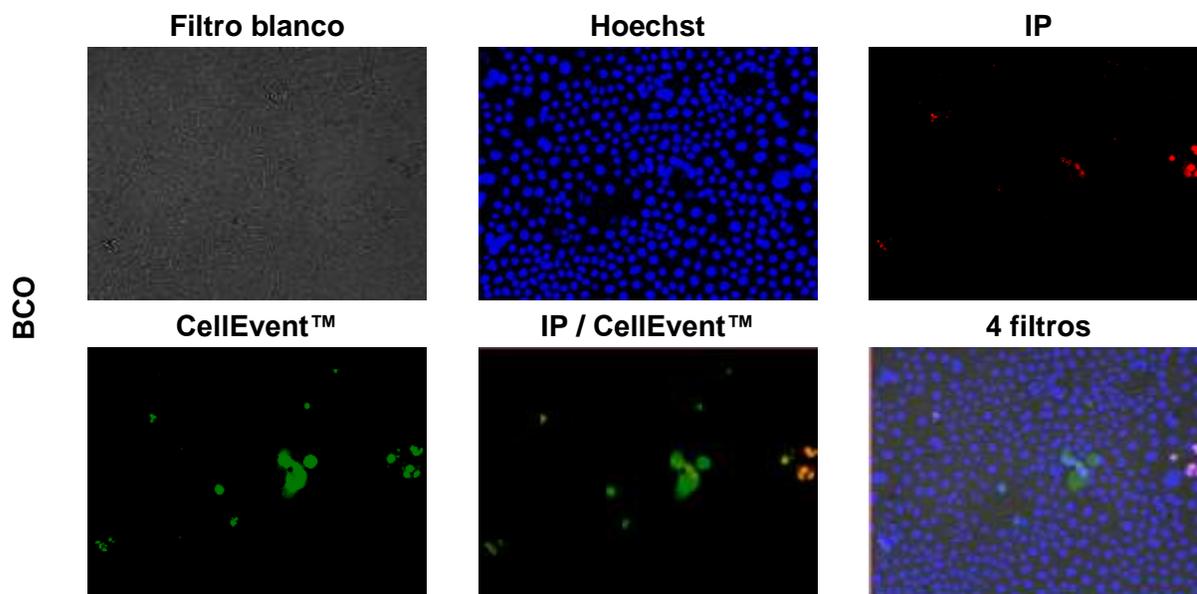


Figura 20. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 sin tratamiento (BCO). Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂.

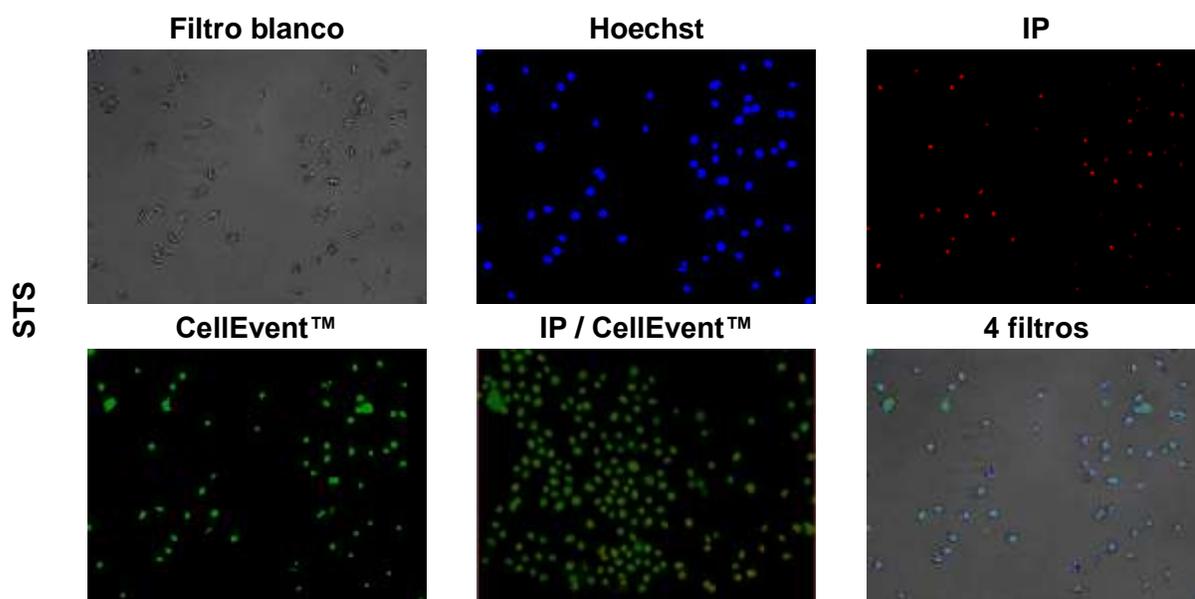


Figura 21. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con estaurosporina (STS) a $1.25 \mu\text{M}$ por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37°C y 5 % de CO_2 .

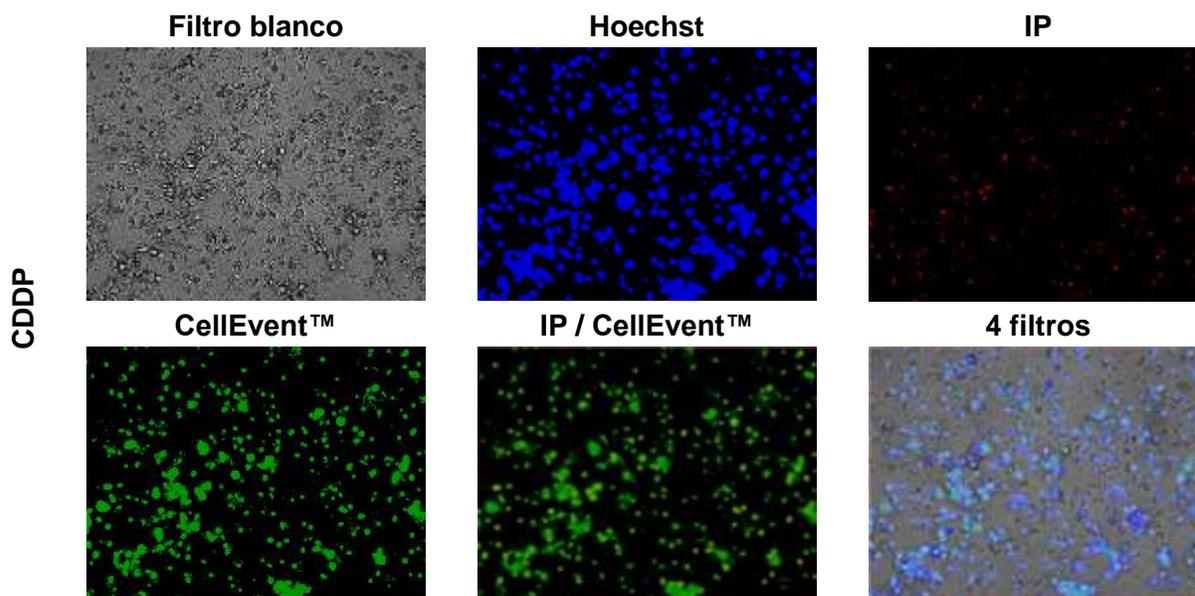


Figura 22. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con cisplatino (CDDP) a $83 \mu\text{M}$ por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37°C y 5 % de CO_2 .

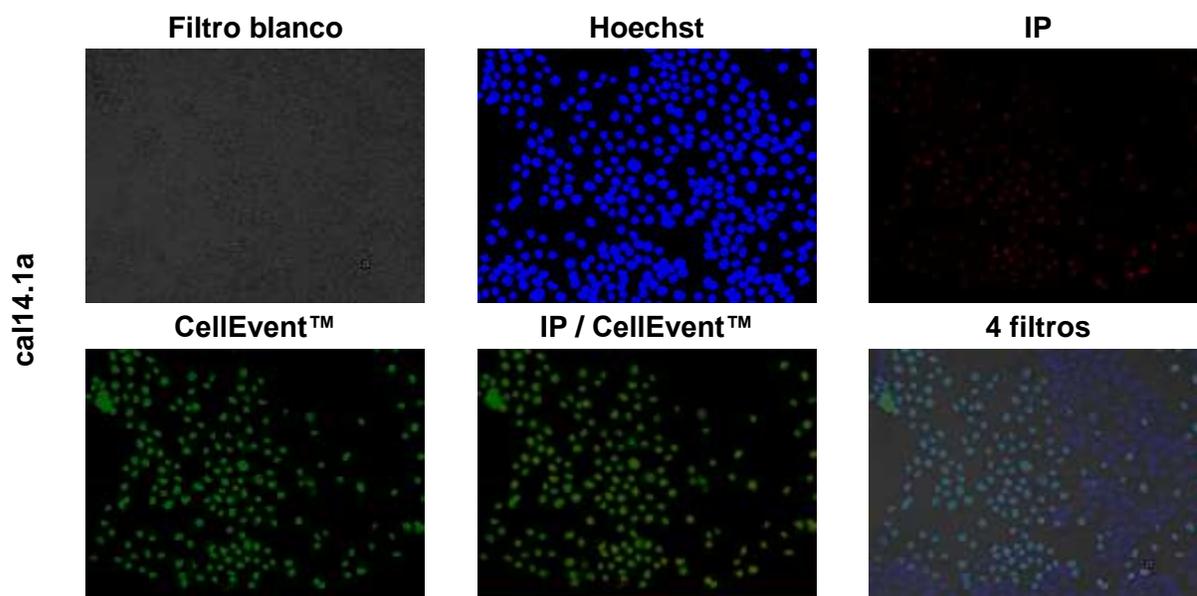


Figura 23. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con la conotoxina cal14.1a a 5 μ M por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂.

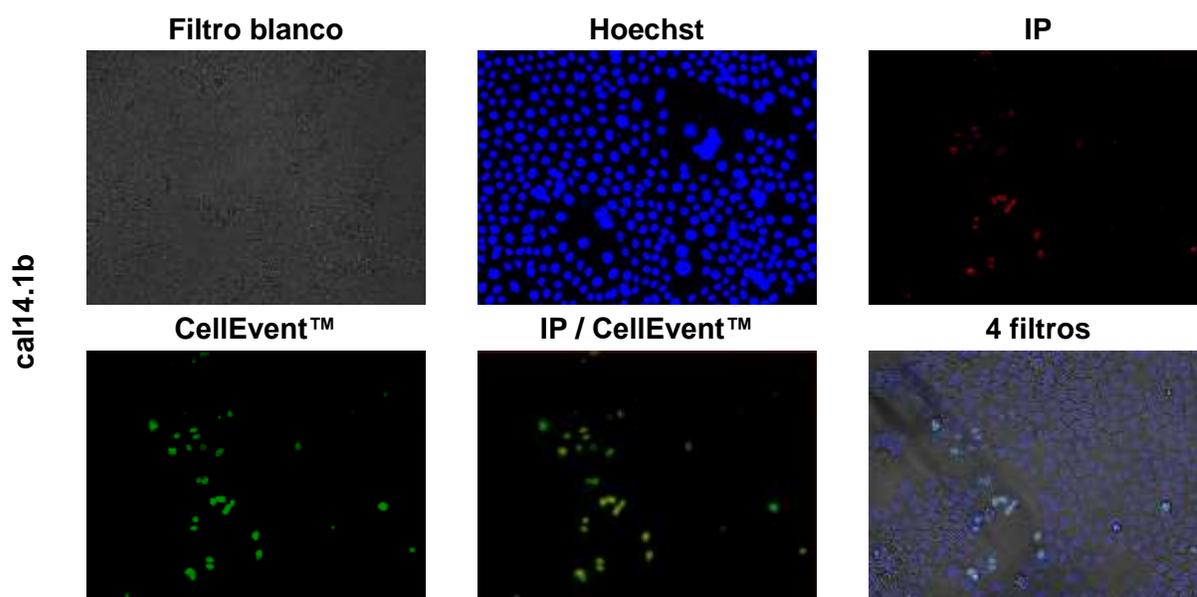


Figura 24. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con la conotoxina cal14.1b a 5 μ M por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂.

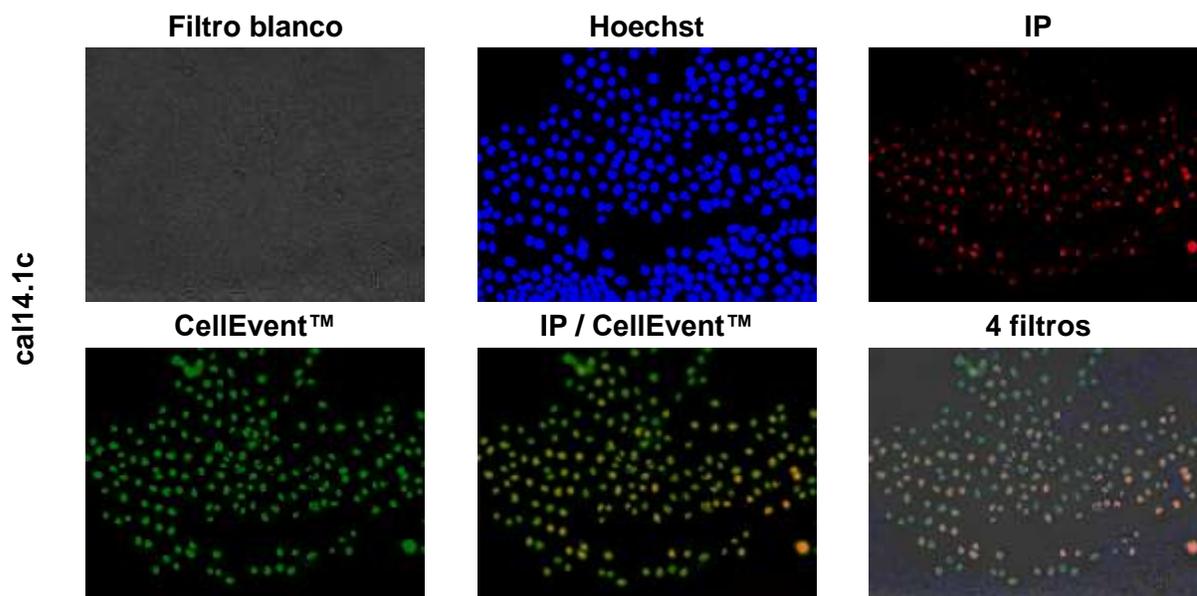


Figura 25. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células BxPC-3 tratadas con la conotoxina cal14.1c a 5 μ M por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) e IP (rojo) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂.

Comparamos la reacción de la línea celular PANC-1 a los diferentes tratamientos (CDDP, STS, cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c), utilizando un control negativo como marco de referencia (células sin tratamiento, BCO), con el objetivo de medir la activación de caspasas 3/7 e IP. Encontramos un aumento significativo en caspasas 3/7 con los tratamientos CDDP y cal14.1c. Mientras que, las células que tuvieron como tratamiento CDDP y STS mostraron un aumento significativo en activación de IP (Fig. 26).

Cabe destacar que con los tratamientos de las conotoxinas y STS, las células mostraron ser positivas a caspasas e IP de manera muy semejante y no se encontró ninguna diferencia significativa entre la activación de ambos colorantes. En su mayoría las células fueron doble positivas, mostrando una cantidad mayor de positivas a caspasas 3/7. Se alcanzan a visualizar en las fotografías de la línea celular PANC-1 la formación de cuerpos apoptóticos, alteración de la membrana, pérdida de la definición y estructura de las células que fueron tratadas con las conotoxinas (Fig. 27 a 32).

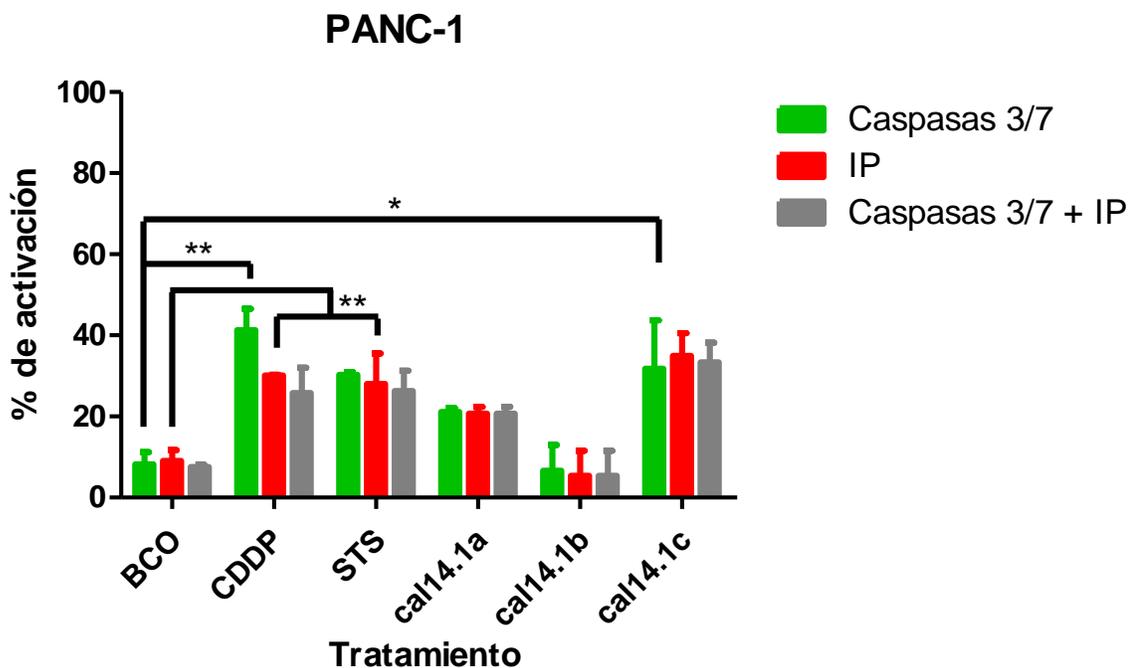


Figura 26. Ensayo de microscopía fluorescente de la línea celular PANC-1, con células positivas a IP y CellEvent™, 24 h posteriores al tratamiento con conotoxinas (cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c) a 5 μ M. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células positivas a caspasas 3/7 (verde) y a IP (rojo), y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples ($n=3$ $\alpha=0.05$). Se utilizaron los siguientes controles: BCO= Células sin tratar; CDDP= Cisplatino 332 μ M; STS= Estaurosporina 5 μ M.

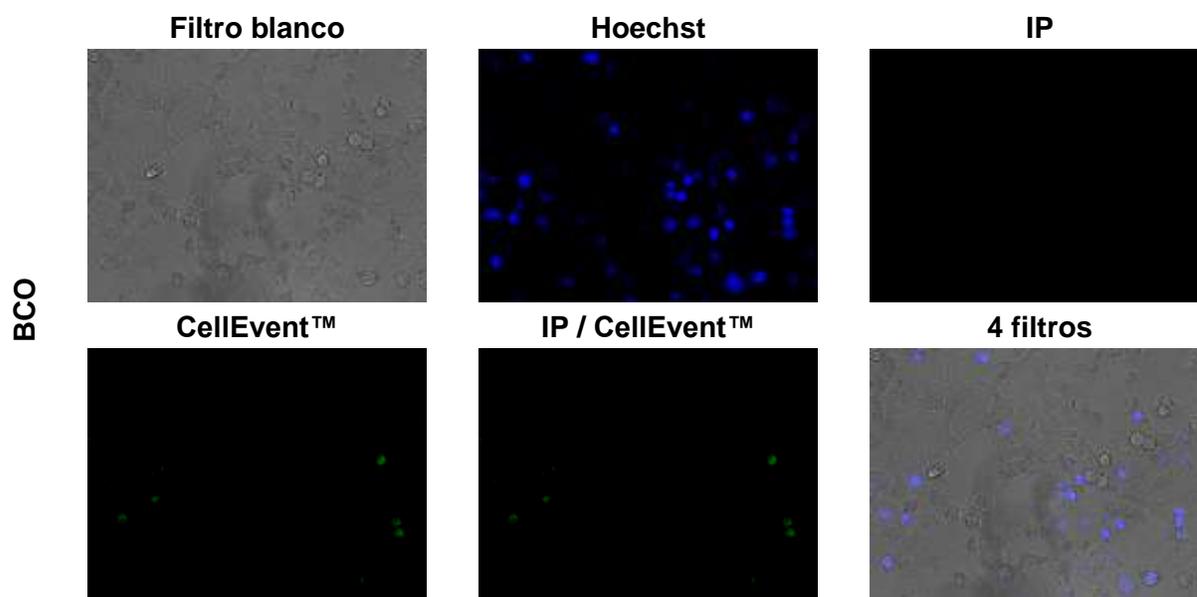


Figura 27. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 sin tratamiento (BCO). Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C y 5 % de CO₂.

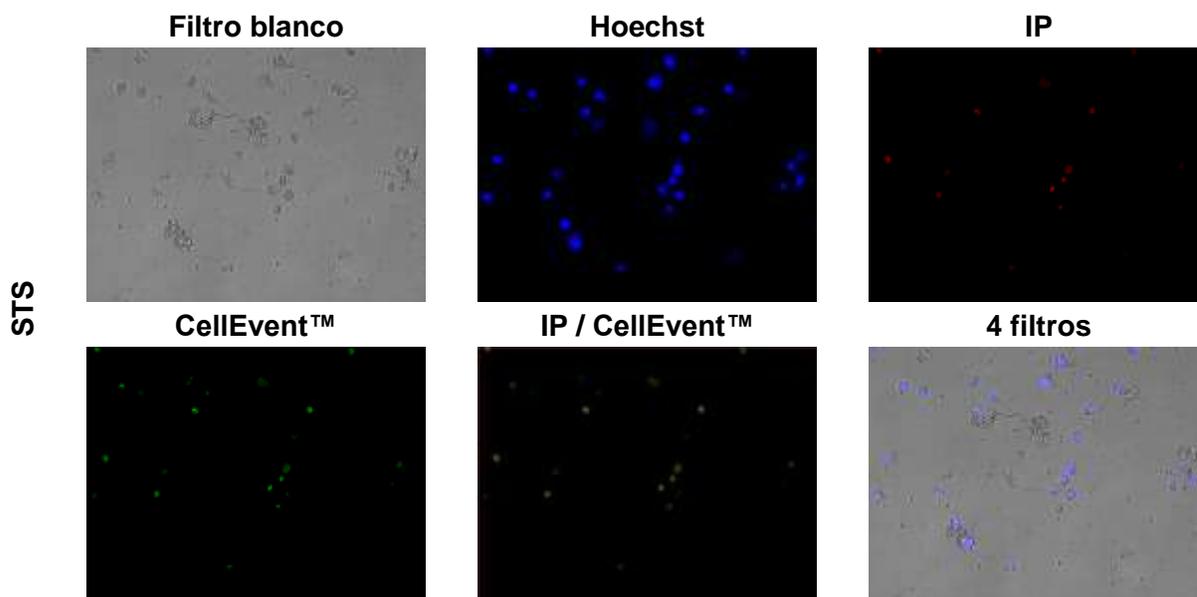


Figura 28. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 con estaurosporina (STS) a $1.25 \mu\text{M}$ por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37°C y 5 % de CO_2 .

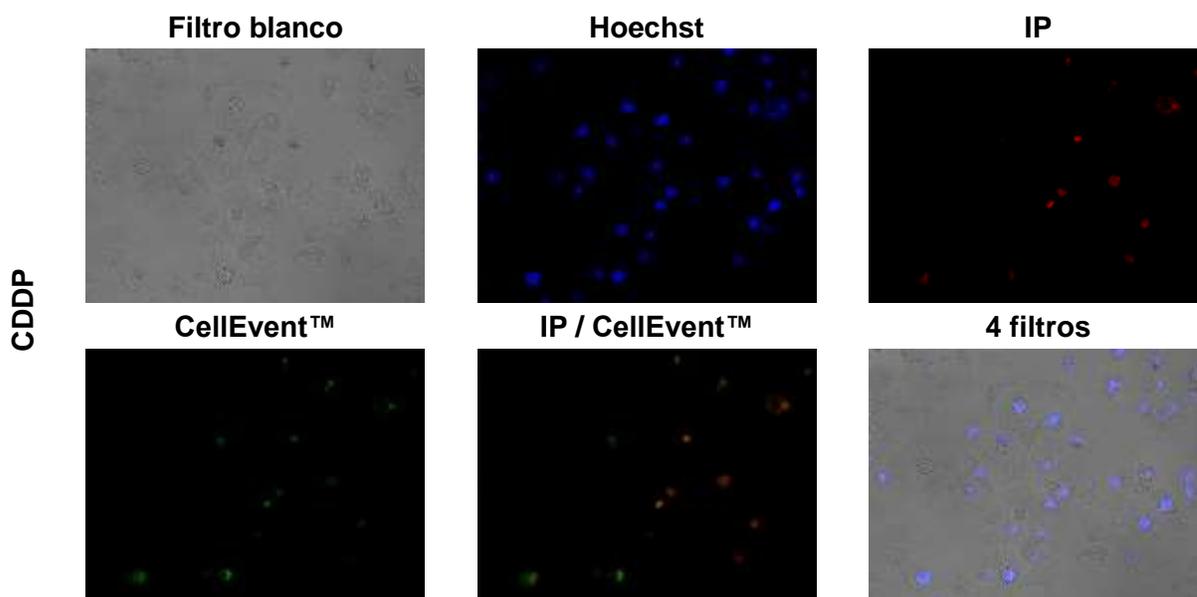


Figura 29. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 tratadas con cisplatino (CDDP) a $83 \mu\text{M}$ por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37°C y 5 % de CO_2 .

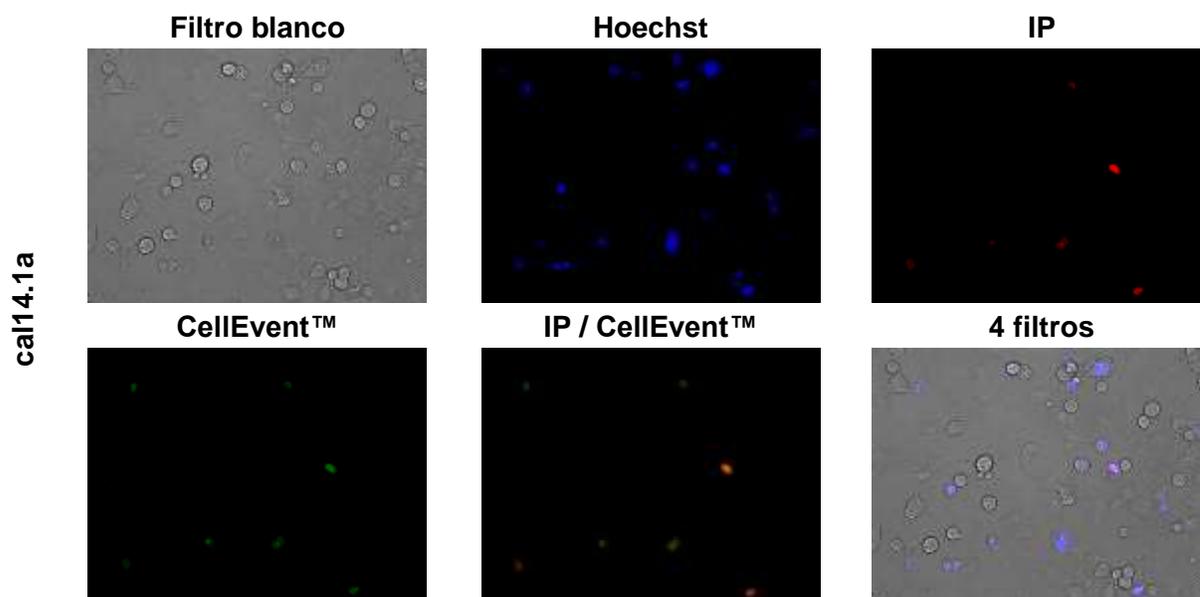


Figura 30. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 con la conotoxina cal14.1a a 5 μ M por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂.

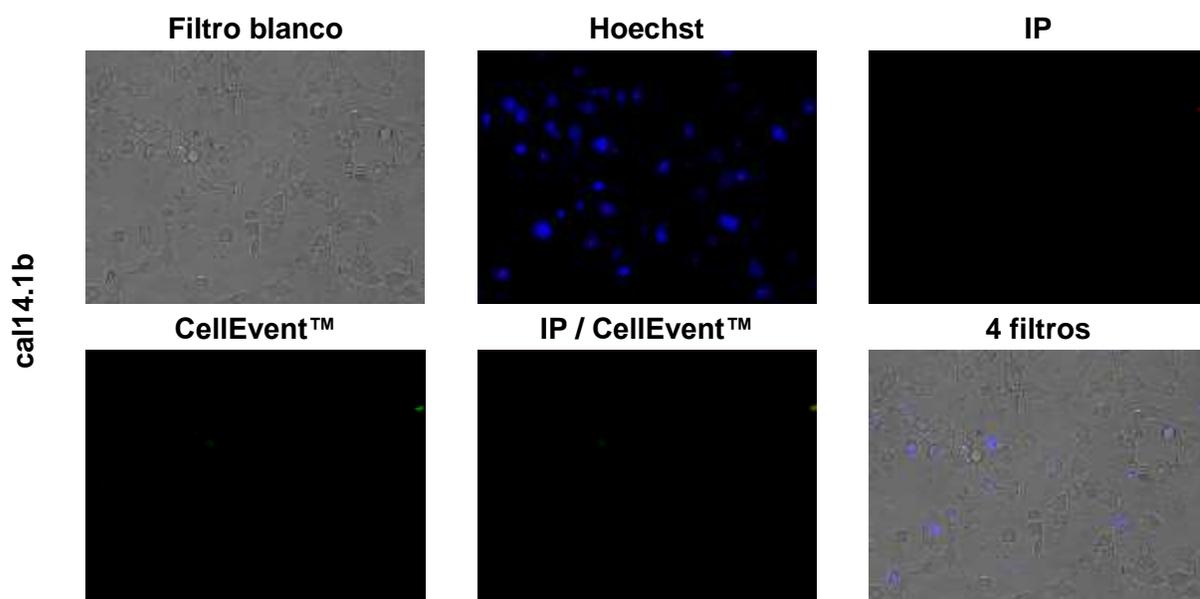


Figura 31. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 con la conotoxina cal14.1b a 5 μ M por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂.

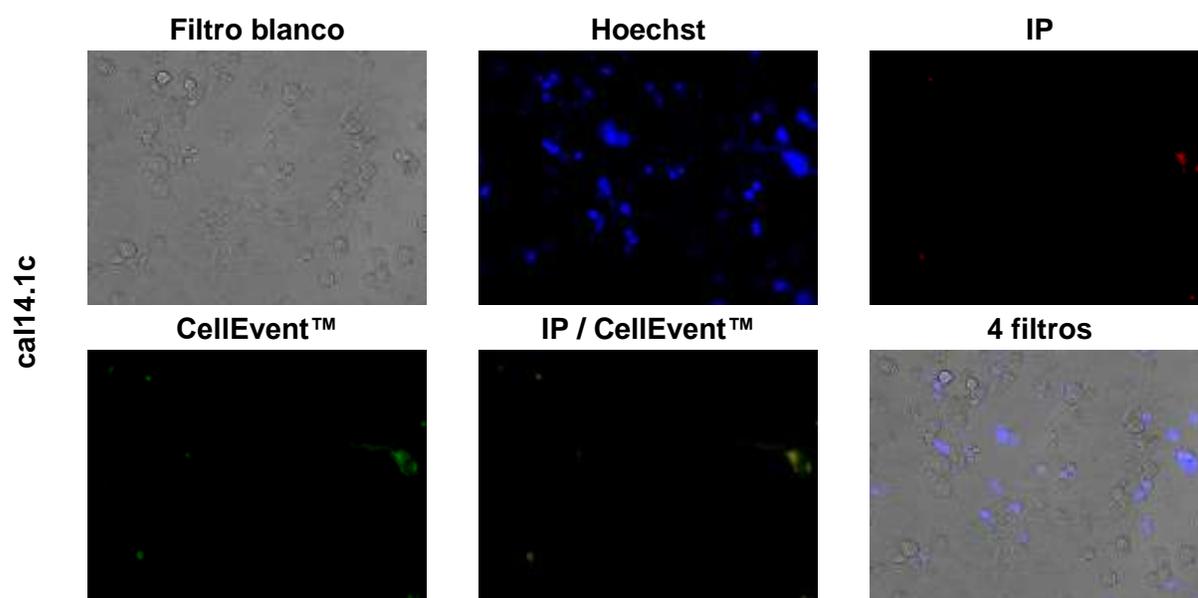


Figura 32. Fotografías representativas del microscopio de fluorescencia, mostrando cada uno de los campos para su mejor análisis, de las células PANC-1 con la conotoxina cal14.1c a 5 μ M por 24 h. Las células se incubaron con CellEvent™ Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) e IP (rojo) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂.

Capítulo 4. Discusión

4. 1 Características de los péptidos sintéticos

Las conotoxinas utilizadas, provenientes de *C. ximenes*, están clasificadas como α -conotoxinas, dentro de la subclasificación por el número de residuos, que existe entre las cisteínas conocidas como α -4/3, las cuales son bloqueadores selectivos de nAChR. Las conotoxinas α -4/3, poseen un arreglo de aminoácidos menos común, se cree que son más afines a receptores compuestos solo de subunidades α (Dutton y Craik, 2001; Ellison y Olivera, 2007). Algunos ejemplos de péptidos en la familia α -4/3 son α -Im1 (de *Conus imperialis*) y α -RglA (de *Conus regius*), los cuales presentan una gran similitud en secuencia con los péptidos analizados en este trabajo de *C. ximenes* (xm1a, xm1b y xm1c), para términos prácticos solo se muestra la alineación con xm1a dado que las 3 conotoxinas poseen la misma secuencia (Fig. 33, Tabla 7). α -Im1 es un potente inhibidor de los subtipos α 7 y α 3 β 2 nAChR, mientras que α -RglA bloquea selectivamente el subtipo α 9 α 10 (Ellison et al., 2008).

RglA (62 %)	-	G	C	C	S	D	P	R	C	R	Y	R	C	R	13
Im1 (75 %)	-	G	C	C	S	D	P	R	C	A	W	R	C	-	12
xm1a	D	G	C	C	R	D	P	R	C	A	I	N	C	V	14

Figura 33. Alineación de xm1a con otras conotoxinas α -4/3, indicando porcentaje de similitud en secuencia (Leebe, 2016).

Se han reportado que varias modificaciones químicas, incluidas las sustituciones de residuos, la ciclación del esqueleto y la modificación de enlaces disulfuro; aumentan la estabilidad de los conopéptidos ante proteasas, cambian el plegamiento y la actividad biológica (Kang et al., 2007), este conjunto de modificaciones postraduccionales que ocurren naturalmente, logran cambios importantes en la afinidad de las conotoxinas (Craik y Adams, 2007), tal es el caso de xm1a y xm1b, ambas toxinas se encuentran de forma nativa en el veneno del caracol, sin embargo la amidación en el carboxilo terminal del ultimo le confiere una mayor potencia hacia la subunidad de nAChR α 3 β 4 (como se pudo observar en la Figura 3).

Otro ejemplo de esto, son los resultados con la toxina α -Im1, los cuales sugieren que la amidación en el carboxilo terminal, y el penúltimo residuo de prolina en el primer bucle intercisteína, juegan papeles importantes como interruptores conformacionales. Pues cuando están presentes, los péptidos se pliegan

en una conformación globular, y en su ausencia, los péptidos se pliegan en la conformación de cinta (Kang et al., 2007).

En xm1c, aun cuando presenta la misma secuencia y patrón de cisteínas de las conotoxinas xm1a y xm1b, tiene un procesamiento adicional, realizado por el caracol, en el cual se hipotetiza que entre la arginina 5 y el aspartato 6 hay una hidrólisis de la proteína, mostrando dos péptidos unidos intermolecularmente por enlaces disulfuro (Camorlinga Rojas, 2018). Dicha hidrólisis es solo una conjetura, pues aún se desconoce si xm1c se genera o no por hidrólisis de un enlace peptídico o tal vez sigue una biosíntesis parecida a la de insulina (Leebe, 2016).

Tabla 7. Características de las conotoxinas de *Conasprella ximenes* (Oroz-Parra, 2016).

Nombre	Origen	Masa molecular	Núm. de aa	Secuencia	Modificación	Patrón de cisteínas
xm1a	<i>Conasprella ximenes</i>	1519.6	14	DGCCRDPRCAINCV	-	C-C-CC
xm1b		1519.6		DGCCRDPRCAINCV	Amidación COO-terminal	
xm1c		1538.78		DGCCR DPRCAINCV	Hidrólisis Arg5 y Asp6	

*Núm. de aa = Número de aminoácidos

Por otra parte, los péptidos analizados de *C. californicus*, forman parte de la superfamilia denominada α 2 (Biggs et al., 2010), y poseen una longitud de 17 aminoácidos, manteniendo un arreglo de cisteínas XIV (C-C-C-C) (Tabla 8). Las conotoxinas cal14.1a y cal14.1b poseen casi la misma secuencia, solo cambia un aminoácido, un glutamato por una glicina en la posición 15. El glutamato es un aminoácido polar, es decir, presenta carga negativa, mientras que la glicina no es polar y es uno de los aminoácidos más pequeños. Si analizamos las diferencias entre los aminoácidos nos podremos percatar que la glicina, por su hidrógeno en la cadena lateral, le confiere una mayor flexibilidad y torsión a la proteína, permitiendo que se pliegue de manera diferente (Betts y Russell, 2003).

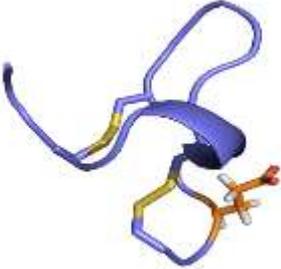
Tabla 8. Características de las conotoxinas de *Californiconus californicus* (Oroz-Parra, 2016)

Nombre	Origen	Masa molecular	Núm. de aa	Secuencia	Patrón de cisteínas
cal14.1a	<i>Californiconus californicus</i>	1847.16	17	GDCPPWCVGARCRA E KC	XIV C-C-C-C
cal14.1b		1775.1		GDCPPWCVGARCRA G KC	
cal14.1c		1858.1		RECPPWCPTSHCNAGTC	

*Núm. de aa = Número de aminoácidos

La diferencia en el plegamiento de las proteínas debido a la modificación de glutamato por glicina, se logra ver en el modelo de listón (Tabla 9). Este cambio estructural en la conotoxina, deja expuestos grupos funcionales distintos, que por ende interactuarán diferente con los receptores, pudiendo ser esta la causa por la cual, en la línea PANC-1, la conotoxina cal14.1a a 5 μM logra una disminución del 38 % en la viabilidad, mientras que cal14.1b por el contrario causa un aumento en la supervivencia celular del 16 %. Sin embargo, aún se necesitan más experimentos que sustenten esta hipótesis, y permitan esclarecer si esta diferencia en grupos funcionales expuestos, son importantes en la determinación de la relación estructura-función de las conotoxinas.

Tabla 9. Comparación de las conotoxinas cal14.1a y cal14.1b, con respecto a su secuencia (Cervantes, 2013).

	cal14.1a	cal14.1b
Secuencia	GDCPPWCVGARCRA E KC	GDCPPWCVGARCRA G KC
Aminoácidos	Glutamato (E) $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{}^2\text{HN} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Glicina (G) $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Modelo de listón		

En la conotoxina cal14.1c, hay solo una similitud del 47.05 % y 52.94 % con cal14.1a y cal14.1b, respectivamente (Fig. 34). Aun cuando la diferencia en secuencia es significativa, mantiene el mismo patrón de cisteínas que las otras toxinas.

	Secuencia														Porcentaje de similitud			
cal14.1a	G	D	C	P	P	W	C	V	G	A	R	C	R	A	G	K	C	47.05 %
cal14.1b	G	D	C	P	P	W	C	V	G	A	R	C	R	A	E	K	C	52.94%
cal14.1c	R	E	C	P	P	W	C	P	T	S	H	C	N	A	G	T	C	-

Figura 34. Alineación de las conotoxinas cal14.1a, cal14.1b y cal14.1c, mostrando el porcentaje de similitud entre cal14.1c con respecto a las otras.

En el caso de las conotoxinas probadas de *C. ximenes* (xm1a, xm1b y xm1c) y *C. californicus* (cal14.1a y cal14.1b), nos podemos percatar que los caracoles muestran una “estrategia de hipervariación” de conotoxinas. Dado que, la misma secuencia peptídica conduce a proteínas diferentes, que actúan sobre objetivos distintos o generan una respuesta contraria o intensificada en el mismo objetivo. Hablando evolutivamente, esto es de gran ventaja para el caracol. De esta manera, puede contrarrestar la resistencia de las presas, permite cambios en la preferencia de las presas y facilita la diversificación de nichos (Kumar et al., 2015; Leebe, 2016).

4.2 Relación entre la expresión de las subunidades de nAChR y los resultados de viabilidad celular

Existe una relación importante entre los diferentes subtipos de nAChR en la proliferación, angiogénesis, metástasis y resistencia a apoptosis, que en parte dan como resultado una reducción en la sensibilidad a la quimioterapia (Grando, 2014). A la par, la diversidad de combinaciones con diferentes subunidades de los receptores nicotínicos, le confieren diferentes propiedades funcionales, características farmacológicas, así como afinidad particular por agonista y antagonistas (Dani, 2016).

En trabajos previos, se observa como la incubación con nicotina ofrece un efecto protector a los linfocitos antes de incubarlos con un inductor apoptótico (cortisol), y que este resultado es dependiente de la concentración de nicotina (De Rosa et al., 2005); otro ejemplo es el efecto neuroprotector en presencia de la subunidad $\alpha 7$ -nAChR en cultivos primarios de hipocampo. Sin embargo, aún no es posible determinar si la regulación positiva de $\alpha 7$ -nAChR y la protección contra apoptosis, ocurren en paralelo o si esto último es consecuencia del aumento en la expresión de la subunidad $\alpha 7$ (De Rosa et al., 2005; Pohanka, 2012). En pruebas con cáncer gástrico, el receptor $\alpha 7$ -nAChR resultó ser una molécula clave que media la progresión

del cáncer, la metástasis y las respuestas al tratamiento; para estos ensayos, la expresión de $\alpha 7$ -nAChR fue silenciada con la tecnología de ARN de interferencia pequeño (siRNA), comprobando su papel en la eficacia terapéutica de ixabepilona, puesto que su eliminación aumentó la sensibilidad de las células de cáncer gástrico a la administración del fármaco (Tu et al., 2016).

Por otro lado, los agonistas, como la acetilcolina endógena (ACh) o la nicotina exógena (que se puede obtener del tabaco al fumar), estabilizan la conformación abierta de los nAChR, favoreciendo la entrada de pequeños cationes monovalentes y divalentes, siendo las principales Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , esto durante varios milisegundos antes de volver a un estado de reposo o cerrar a un estado desensibilizado. Dicho estado no responde a los agonistas. Con las conotoxinas de *C. californicus*, cuando se aumentó la concentración hasta $50 \mu\text{M}$, no se obtuvieron cambios en la viabilidad celular, sin embargo, previamente a concentraciones de 5 y $0.5 \mu\text{M}$ se presentó una reducción mayor del 40 % en viabilidad, pudiendo indicar, que al incrementar la concentración hay una posible desestabilización del receptor, por una sobresaturación y por ende no responde ante el estímulo.

No obstante, se pudo observar que al añadir más concentración de los péptidos sintéticos de *C. ximenes* a las células el efecto en la disminución de la viabilidad celular era relativamente semejante, no se presentaron cambios significativos entre 50 , 25 y $5 \mu\text{M}$, se propone entonces que se logró un equilibrio entre receptor y ligando, pues aunque continuáramos aumentando la concentración de las conotoxinas, no se mostraba una diferencia significativa la viabilidad celular, pues todos los nAChR estaban saturados. Por ende se puede concluir, que $5 \mu\text{M}$ es la concentración necesaria para interactuar con los receptores de las células. El ligando, en este caso la conotoxina, se une al receptor hasta lograr una saturación del mismo.

Puesto que, se obtienen resultados diferentes en los ensayos de viabilidad entre las líneas celulares, se puede relacionar con las diferencias en expresión de las subunidades, siendo BxPC-3 la línea más sensible a los tratamientos con las conotoxinas a la par que es la que tiene una mayor expresión relativa de la subunidad $\alpha 7$.

Al ser CAPAN-2, la última línea celular con la cual se trabajó, se decidió primero realizar una prueba de viabilidad celular con las concentraciones que previamente habían tenido el mayor efecto en las líneas BxPC-3 y PANC-1. Al tener los resultados de nuestras conotoxinas sin efecto alguno y los controles con tanta disparidad, se procedió a hacer un tamizado de las subunidades de los nAChR en esta línea. Como los ensayos de MTS se realizaron a las 24 h posteriores del tratamiento con las conotoxinas, el tiempo de

prueba para la caracterización de los nAChR fue solo a 24 h, siendo esta línea celular la que presentó la menor expresión relativa de la subunidad $\alpha 7$.

Finalmente, se propone entonces, que las conotoxinas actúan de manera antagonista con el receptor, sin embargo, aún se desconoce la interacción directa entre receptor, conotoxina y nicotina. Se necesitan más pruebas para determinar si es una interacción de tipo competitivo o no competitivo, por el receptor entre la nicotina y la conotoxina, o si se trata de un bloqueo físico o una modulación con el receptor.

4. 3 Diferencias entre líneas celulares

Se deben analizar las diferencias entre las líneas celulares, pues aunque las tres son de cáncer de páncreas, presentan respuestas diferentes ante los tratamientos, así como expresión de las subunidades de nAChR. Incluso en los controles hay diferencias muy marcadas, tal es el caso del cisplatino, en las líneas PANC-1 y BxPC-3 hubo una disminución del 75 al 88 %, respectivamente en la viabilidad celular, mientras que para CAPAN-2 fue solo del 19.58 %. En la literatura, hacen igualmente referencia a CAPAN-2 como una de las líneas más resistentes, mostrando similitudes con los ensayos realizados (Lopes et al., 2007; Mezencev et al., 2016; Sakai et al., 2008).

Por ello, se realizó una investigación más profunda para conocer estas diferencias entre las líneas celulares con las que trabajamos (Tabla 10), iniciando desde el tipo de enfermedad pues, aunque son de cáncer pancreático, difieren en el tipo. Por una parte, PANC-1 son células de carcinoma epitelioide, es decir, células que forman parte del tejido epitelial, que forma la piel, recubren órganos internos y delimitan cavidades. Mientras que, CAPAN-2 y BxPC-3 provienen de células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de secreción externa, que formaron una clase de tumor diferente, llamado adenocarcinoma.

Tabla 10. Características de las líneas celulares PANC-1, CAPAN-2 y BxPC-3. Realizada con datos de ATCC®.

Característica	PANC-1	CAPAN-2	BxPC-3
Clave ATCC®	CRL-1469™	HTB-80™	CRL-1687™
Organismo	Homo sapiens, humano		
Tejido	Páncreas/ conducto	Páncreas	
Enfermedad	Carcinoma epitelioides	Adenocarcinoma	
Genes expresados	N/E	Altos niveles de ARNm MUC-1, bajos de MUC-2 pero no expresa MUC-3 Expresión del antígeno: Tipo sanguíneo B,Rh+	Mucina, antígeno específico del cáncer pancreático, antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés)
Perfil STR	D5S818: 11,13 D13S317: 11 D7S820: 8,10 D16S539: 11 vWA: 15 THO1: 7,8 Amelogenina: X TPOX: 8,11 CSF1PO: 10,12	Amelogenina: X CSF1PO: 11,12 D13S317: 11,12 D16S539: 9,13 D5S818: 11,12 D7S820: 9,11 THO1: 9.3 TPOX: 8 vWA: 17	D5S818: 11 D13S317: 11 D7S820: 10,13 D16S539: 9,11 vWA: 14,18 THO1: 9 Amelogenina: X TPOX: 8 CSF1PO: 13
Isoenzimas	G6PD, B	AK-1, 1 ES-D, 1 G6PD, B GLO-I, 2 Me-2, 2 PGM1, 1 PGM3, 2	N/E

4. 4 Ensayo de muerte celular por imagen de fluorescencia

La muerte celular, es uno de los procesos más complejos de clasificar, la idea general que se tenía en solo considerar la apoptosis si hay activación de caspasas, o necrosis si hay ruptura en la membrana, se deja atrás, y ahora hay todo un Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCDD, Nomenclature Committee on Cell Death), donde nos presentan nuevas formas de muerte celular. De igual manera, que las vías de señalización, las rutas para apoptosis son muy complejas, ya que comparten o convergen en elementos altamente promiscuos, ejemplo de esto son las caspasas que actúan en diferentes partes del proceso de muerte celular y no exclusivamente para apoptosis.

Las caspasas son una familia de enzimas perteneciente al grupo de cisteín-proteasas, que tienen un papel muy importante en la apoptosis. Por una parte, las caspasas de corte se producen a nivel de un residuo de aspartato, del que deriva su nombre, cisteinil-aspartato proteasas. Las cuales se pueden dividir en tres grupos funcionales: (1) las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9, 10) y (2) caspasas inflamatorias (caspasas 1, 4, 5, 11, 12), las cuales están relacionadas con las señales pro-apoptóticas, una vez activadas estas caspasas, escinden y activan al grupo (3) las caspasas efectoras (caspasas 3, 6, 7), que ejecutan la apoptosis mediante la escisión de las proteínas celulares después de residuos aspartato específicos.

En este ensayo se empleó el reactivo de Hoechst para teñir los núcleos (azul) y fue usado como control (referencia) de la densidad celular; las células apoptóticas con caspasas 3/7 activada, tuvieron núcleos verde brillante, mientras que las células necróticas (o con la integridad de la membrana celular comprometida) fueron positivas a yoduro de propidio (IP). Se podría esperar que algunas tinciones fueran excluyentes, es decir, las células positivas a caspasas no lo fueran para IP, pues se supondría que las caspasas actúan en la apoptosis, un proceso de muerte más organizado, donde no hay desestabilización de la membrana, sin embargo, ese no fue el caso y la mayor parte de las células presentaron ser doble positivas, presentando actividad de las caspasas 3/7 a la par que permeabilidad en la membrana para IP.

Se probaron solo las conotoxinas cal14.1a, cal14.1b y cal 14.1c, dado que en la prueba con MTS mostraban una disminución del 46, 53 y 44 % de viabilidad celular respectivamente en la línea BxPC-3. Sin embargo, en la activación de caspasas 3/7 solo cal14.1a y cal 14.1c mostraron una activación mayor del 55 %, concordando con los ensayos previos de MTS. Por otro lado, para cal14.1b la activación solo fue del 5 % para caspasas 3/7. Este efecto previamente se describió en la línea celular H1299, que fue probada con cal14.1a y cal14.1b, dando una activación por caspasas mayor de 40 % en el caso de cal14.1a, mientras que cal14.1b fue menor del 10 % (Oroz-Parra, 2016). Sugiriendo entonces que la conotoxina cal14.1b induce una muerte celular independiente de estas caspasas 3/7 ejecutoras, planteando entonces una posible muerte mediada por Aif o EndoG (Fig. 35), siendo la ruta intrínseca o por mitocondrias la opción más probable, sin embargo, aún faltan estudios que sustenten esta hipótesis.

En los controles de cisplatino y estaurosporina solo se empleó $\frac{1}{4}$ de la concentración usada en los ensayos de viabilidad celular, es decir 83 μ M en cisplatino y de 1.25 μ M para estaurosporina; estos controles para el caso de BxPC-3 coincidieron en ambas pruebas, mostrando por una parte una disminución de 85 a 95 % en la viabilidad celular y una activación de caspasas e IP mayor del 90 %. Sin embargo, en la línea PANC-1, esta disminución en la concentración sí se vio reflejada con una menor activación de caspasas e IP del 30 al 40 %, mientras que en los resultados de viabilidad se presentaba una disminución superior al 70 %.

Según la clasificación por morfotipos, la muerte celular se puede clasificar en tres formas diferentes: (1) muerte celular de tipo I o apoptosis, exhibe encogimiento citoplasmático, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear (cariorrhexis) y “ampollas” en la membrana plasmática, culminando en la formación de vesículas pequeñas (comúnmente conocidas como cuerpos apoptóticos), los cuales son fagocitados por células vecinas; (2) muerte celular II o autofagia, que se manifiesta con una vacuolización masiva del citoplasma, con la formación de vesículas autofágicas que van digiriendo partes de la célula; (3) muerte celular de tipo III o necrosis, incluyendo el tipo I y II de muerte, con la adición de la disociación de la membrana y difusión del citoplasma (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009). En las imágenes de PANC-1, se logran apreciar cambios morfológicos muy marcados en las células con los tratamientos aplicados, a diferencia del control negativo (BCO), pues hay la aparición de cuerpos apoptóticos, los cuales son característicos de la apoptosis tardía.

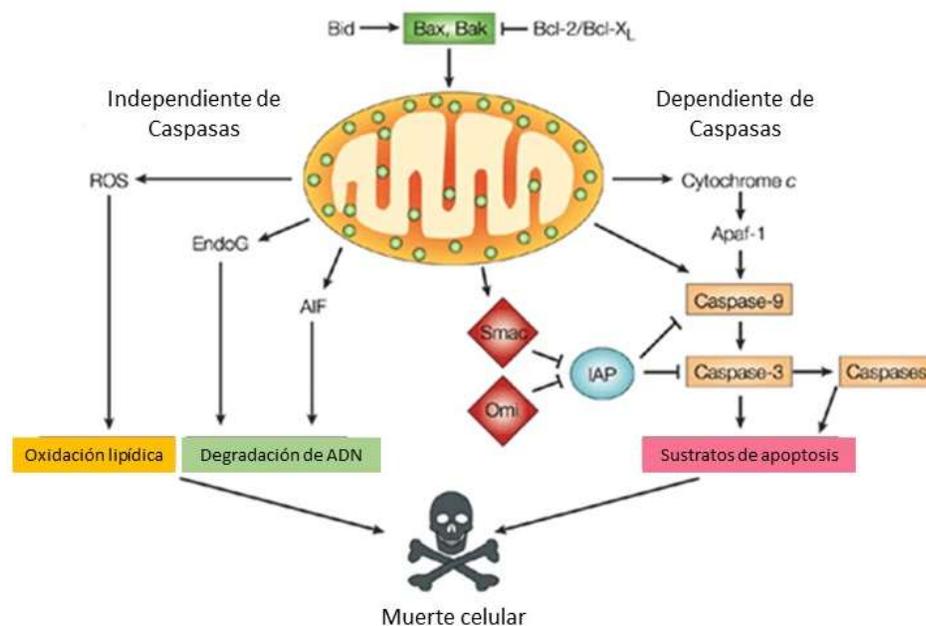


Figura 35. Rutas de muerte celular en mamíferos, dependiente e independiente de caspasas. Modificado de (Jin y Reed, 2002).

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Conclusiones finales

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir lo siguiente:

- Existe un efecto en la expresión de las diferentes subunidades de los nAChR, al aplicar el tratamiento con nicotina, esto en función del tiempo, en las líneas celulares BxPC-3 y PANC-1
- La subunidad con la mayor expresión relativa con respecto al gen de referencia (β -actina) fue $\alpha 7$, para BxPC-3 y PANC-1; mientras que para CAPAN-2 fue $\beta 2$
- La concentración de 5 μ M mostró el mayor efecto en la reducción de la viabilidad celular en las líneas BxPC-3 y PANC-1.
- En CAPAN-2 ninguna de las conotoxinas a la concentración de 5 μ M tuvo efecto.
- Se observó un efecto de saturación en los receptores nAChR, cuando aplicamos las conotoxinas de *C. ximenes* a 50, 25 y 5 μ M, no habiendo diferencia significativa en la viabilidad celular. Las conotoxinas de *C. californicus*, al aumentar la concentración del tratamiento, el efecto en la disminución celular se pierde, siendo efectivo solo de 5 a 0.5 μ M.
- Las conotoxinas cal14.1a y cal14.1c en la línea celular BxPC-3 muestran activación de caspasas 3/7, mientras que la conotoxina cal14.1b no es positiva a caspasas 3/7 sugiriendo una activación de muerte celular independiente de estas caspasas.
- La línea celular más sensible a los tratamientos aplicados fue BxPC-3, la cual corresponde a la línea con una mayor expresión relativa de la subunidad $\alpha 7$, le sigue la línea PANC-1 y por último CAPAN-2 con una expresión mínima de esta subunidad.
- Finalmente, nuestros resultados sugieren que nuestra hipótesis inicial es correcta, las α -conotoxinas actúan sobre los nAChR, induciendo muerte celular en las líneas de cáncer pancreático, cuando estas tienen expresada la subunidad $\alpha 7$.

5.2 Perspectivas del trabajo

Las perspectivas generadas a partir de los resultados de este trabajo son las siguientes:

- Futuros experimentos podrían centrarse en demostrar la relación directa de la subunidad $\alpha 7$ con las conotoxinas probadas.
 - Donde se pudiera inhibir la expresión de la subunidad $\alpha 7$ en BxPC-3 o PANC-1 para demostrar que las toxinas tienen menos efecto en ausencia de esta subunidad.
 - O al contrario, si se sobreexpresará esta subunidad en CAPAN-2, y ver si existe una sensibilización a los tratamientos.
 - Así mismo, determinar el tipo de interacción de los nAChR con las conotoxinas, al probarlas con inhibidores específicos de esta subunidad.
- Otra posible línea de trabajo, es la utilización de herramientas proteómicas, para evaluar la muerte celular que inducen las diferentes conotoxinas empleadas.
 - Permitiéndonos conocer los cambios en niveles de expresión de diferentes proteínas, los mecanismos moleculares involucrados y las rutas de señalización activadas, esto al aplicar los tratamientos con las conotoxinas.

Literatura citada

- Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J., Alewood, P. F. 2014. Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chemical Reviews*, 114(11), 5815–5847. doi:10.1021/cr400401e
- Amedei, A., Niccolai, E., Prisco, D. 2014. Pancreatic cancer: role of the immune system in cancer progression and vaccine-based immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(11), 3354–3368. doi:10.4161/hv.34392
- Aranda, P., LaJoie, D., Jorcyk, C. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *National Institutes of Health*, 33(2), 366–369. doi:10.1002/elps.201100335
- Arredondo, J. 2006. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. *The FASEB Journal*, 20(12), 2093–2101. doi:10.1096/fj.06-6191com
- Azam, L., McIntosh, J. M. 2009. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 30. doi:10.1038/aps.2009.47
- Bernáldez Sarabia, J. 2008. Caracterización electrofisiológica de toxinas peptídicas del caracol marino *Conus californicus* en canales iónicos de calcio. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 122 pp.
- Betts, M. J., Russell, R. B. 2003. Amino-Acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for Geneticists*. doi:10.1002/9780470059180.ch13
- Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.-P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K. J., Bernaldez, J., Licea-Navarro, A., Corneli, P. S., Olivera, B. M. 2010. Evolution of *Conus* peptide toxins: analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 1–12. doi:10.1016/j.ympev.2010.03.029
- Bouchet & Rocroi, J. P., P. 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia*. En G. M. Davis (Ed.), *International Journal of Malacology*. ConchBooks: Paris, France.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Buczek, O., Bulaj, G., Olivera, B. M. 2005. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(24), 3067–3079. doi:10.1007/s00018-005-5283-0
- Camorlinga Rojas, A. G. 2018. Efecto de las conotoxinas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d del cono de mar *Conasprella ximenes* en cultivo celular de macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

- Carrato, A., Falcone, A., Ducreux, M., Valle, J. W., Parnaby, A., Djazouli, K., Alnwick-Allu, K., Hutchings, A., Palaska, C., Parthenaki, I. 2015. A Systematic review of the burden of pancreatic cancer in Europe: real-world impact on survival, quality of life and costs. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 46(3), 201–211. doi:10.1007/s12029-015-9724-1
- Cervantes, K. 2013. Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género *Conus*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 67 pp.
- Corringer, P.-J., Le Novère, N., Changeux, J.-P. 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual Review of pharmacology and toxicology*, 62(40), 431–458. doi:10.1227/01.NEU.0000255470.75752.02
- Craik, D. J., Adams, D. J. 2007. Chemical modification of conotoxins to improve stability and activity. *ACS Chemical Biology*, 2(7), 457–468. doi:https://doi.org/10.1021/cb700091j
- Dani, J. A. 2016. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. *international review of neurobiology*, 124, 3–19. doi:10.1016/bs.irn.2015.07.001
- Dasgupta, P., Rizwani, W., Pillai, S., Kinkade, R., Kovacs, M., Rastogi, S., Banerjee, S., Carless, M., Kim, E., Coppola, D., Haura, E., Chellappan, S. 2009. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 124(1), 36–45. doi:10.1002/ijc.23894
- De Rosa, M. J., Esandi, M. D. C., Garelli, A., Rayes, D., Bouzat, C. 2005. Relationship between $\alpha 7$ nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 160(1–2), 154–161. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.11.010
- Dutton, J. L., Craik, D. J. 2001. Alpha conotoxins nicotinic acetylcholine receptor antagonists as pharmacological tools and potential drug leads. *Current Medicinal Chemistry*, 8(4), 327–344. doi:10.2174/0929867013373453
- Editores de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. 2016. ¿Qué es el cáncer de páncreas? de Sociedad Americana Contra El Cáncer website: https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pancreas/acerca/que-es-el-cancer-de-pancreas.html#escrito_por
- Ellison, M., Feng, Z.-P., Park, A. J., Zhang, X., Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Norton, R. S. 2008. Alpha-RgIA, a novel conotoxin that blocks the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR: structure and identification of key receptor-binding residues. *Journal of Molecular Biology*, 377(4), 1216–1227. doi:10.1016/j.jmb.2008.01.082
- Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M. E., Watkins, M., Elgoyhen, A. B., McIntosh, J. M., Olivera, B. M. 2006. α -RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR \dagger , \ddagger . *Biochemistry*, 45(5), 1511–1517. doi:10.1021/bi0520129
- Ellison, M., Olivera, B. M. 2007. $\alpha 4/3$ Conotoxins: phylogenetic distribution, functional properties, and structure–function insights. *The Chemical Record*, 7(6), 341–353. doi:10.1002/tcr.20131

- Flores, S., Segura, T. 2005. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *New.Medigraphic.Com*, 6(4), 315–326. doi:10.1038/ijo.2010.164
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., ... Kroemer, G. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- Gao, B., Peng, C., Yang, J., Yi, Y., Zhang, J., Shi, Q. 2017. Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery. *Toxins*, 9(12), 1–17. doi:10.3390/toxins9120397
- Garrido-Laguna, I., Hidalgo, M. 2015. Pancreatic cancer: From state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(6), 319–334. doi:10.1038/nrclinonc.2015.53
- Gasperin, J. 2014. Clonación y expresión de la conotoxina recombinante cal26a de *Conus californicus* en *Escherichia coli*. Tesis de maestría en Ciencias de la Vida. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/657/1/242751.pdf>
- Gnanamony, M., Gondi, C. 2017. Chemoresistance in pancreatic cancer: emerging concepts (Review). *Oncology Letters*, 13(4), 2507–2513. doi:10.3892/ol.2017.5777
- Grando, S. A. 2014. Connections of nicotine to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(6), 419–429. doi:10.1038/nrc3725
- Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L., Sotelo-Mundo, R. 2013. Current perspectives on the use of recombinant proteins and their importance in scientific and industrial research. *Biotecnia*, XV(3), 8–17.
- Halai, R., Craik, D. J. 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Natural Product Reports*, 26(4), 526. doi:10.1039/b819311h
- He, Y., Zhu, Q., Chen, M., Huang, Q., Wang, W., Li, Q., Huang, Y., Di, W. 2016. The changing 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(43). doi:10.18632/oncotarget.12223
- Jin, C., Reed, J. C. 2002. Yeast and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(6), 453–459. doi:10.1038/nrm832
- Kang, T. S., Radić, Z., Talley, T. T., Jois, S. D., Taylor, P., Manjunatha, K. R. 2007. Protein Folding Determinants: Structural Features Determining Alternative Disulfide Pairing in α - and γ/λ -Conotoxins. *Biochemistry*, 46(11), 3338–3355. doi:10.1021/bi061969o

- Karlin, A. 2002. Emerging structure of the Nicotinic Acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 102–114. doi:10.1038/nrn731
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., ... Melino, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150
- Kumar, P. S., Kumar, D. S., Umamaheswari, S. 2015. A perspective on toxicology of Conus venom peptides. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(5), 337–351. doi:10.1016/S1995-7645(14)60342-4
- Leebe, E. 2016. Conus SP. Venom based drug discovery. The quest for novel peptide drugs. Doctoral Thesis in Pharmaceutical Sciences. Belgium. Universiteitshal KU Leuven.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the $2\Delta\Delta CT$ method. 408, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lopes, R. B., Gangeswaran, R., McNeish, I. A., Wang, Y., Lemoine, N. R. 2007. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *International Journal of Cancer*, 120(11), 2344–2352. doi:10.1002/ijc.22554
- Mansvelter, H. D., Mertz, M., Role, L. W. 2009. Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(4), 432–440. doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.007
- Maslennikov, I. V., Shenkarev, Z. O., Zhmak, M. N., Ivanov, V. T., Methfessel, C., Tsetlin, V. I., Arseniev, A. S. 1999. NMR spatial structure of α -conotoxin Iml reveals a common scaffold in snail and snake toxins recognizing neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Letters*, 444(2–3), 275–280. doi:10.1016/S0014-5793(99)00069-1
- Mezencev, R., Matyunina, L. V, Wagner, G. T., McDonald, J. F. 2016. Acquired resistance of pancreatic cancer cells to cisplatin is multifactorial with cell context-dependent involvement of resistance genes. *Cancer Gene Therapy*, 23(12), 446–453. doi:10.1038/cgt.2016.71
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Unwin, N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 423(6943), 949–955. doi:10.1038/nature01748
- MolluscaBase. Conidae. 2019. Consultado el 23 de julio de 2019, de World Register of Marine Species website: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=14107>
- National Cancer Institute. 2018. SEER cancer stat facts: pancreatic cancer. Surveillance, epidemiology, and end results program. Consultado el 13 de agosto de 2019 de: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>

- Nicotine. 2018. Consultado el 23 de julio de 2018, de DrugBank website: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00184>
- Noone, A., Howlader, N., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D., Chen, H., Feuer, E., Cronin, K. 2018. SEER cancer statistics review, 1975-2015, National Cancer Institute. Consultado el 4 de julio de 2018, de https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/
- O'Dwyer, P. J., Leyland-Jones, B., Alonso, M. T., Marsoni, S., Wittes, R. E. 1985. Etoposide (VP-16-213). *New England Journal of Medicine*, 312(11), 692-700. doi:10.1056/NEJM198503143121106
- Oroz-Parra, I. 2011. Aislamiento e identificación de agentes citotóxicos provenientes del caracol marino *Conus ximenes* con actividad contra una línea celular de cáncer de colon (LIM-1215). Tesis de maestría en Ciencias de la Vida. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/ha>
- Oroz-Parra, I. 2016. Caracterización biológica de conotoxinas capaces de modular la supervivencia celular en diferentes líneas celulares de cáncer. Tesis de doctorado en Ciencias de la Vida. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/663>
- Oroz-Parra, I., Navarro, M., Cervantes-Luevano, K. E., Álvarez-Delgado, C., Salvesen, G., Sanchez-Campos, L. N., Licea-Navarro, A. F. 2016. Apoptosis activation in human lung cancer cell lines by a novel synthetic peptide derived from *Conus californicus* venom. *Toxins*, 8(2). doi:10.3390/toxins8020038
- Papke, R. L., Thinschmidt, J. S. 1998. The correction of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor concentration-response relationships in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience Letters*, 256(3), 163-166.
- Pohanka, M. 2012. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2219-2238. doi:10.3390/ijms13022219
- Prashanth, J. R., Dutertre, S., Jin, A. H., Lavergne, V., Hamilton, B., Cardoso, F. C., Griffin, J., Venter, D. J., Alewood, P. F., Lewis, R. J. 2016. The role of defensive ecological interactions in the evolution of conotoxins. *Molecular Ecology*, 25(2), 598-615. doi:10.1111/mec.13504
- Prommer, E. 2006. Ziconotide: A new option for refractory pain. *Drugs of Today*, 42(6), 369. doi:10.1358/dot.2006.42.6.973534
- Puillandre, N., Duda, T. F., Meyer, C., Olivera, B. M., Bouchet, P. 2015. One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Journal of Molluscan Studies*, 81(1), 1-23. doi:10.1093/mollus/eyu055
- Puillandre, N., Koua, D., Favreau, P., Olivera, B. M., Stöcklin, R. 2012. Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides. *Journal of Molecular Evolution*, 74(5-6), 297-309. doi:10.1007/s00239-012-9507-2

- Ribas, A., Wolchok, J. D. 2018. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359(6382), 1350–1355. doi:10.1126/science.aar4060
- Robinson, S. D., Norton, R. S. 2014. Conotoxin gene superfamilies. *Marine Drugs*, 12(12), 6058–6101. doi:10.3390/md12126058
- Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
- Rossi, M. L., Rehman, A. A., Gondi, C. S. 2014. Therapeutic options for the management of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(32), 11142–11159. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11142
- Ruiz Liard, A., Latarjet, M. 2008. Anatomía humana (4a ed.). Médica Panamericana: Buenos Aires, Argentina.
- Sakai, W., Swisher, E. M., Karlan, B. Y., Agarwal, M. K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D. J., Couch, F. J., Urban, N., Taniguchi, T. 2008. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182), 1116–1120. doi:10.1038/nature06633
- Schaal, C., Padmanabhan, J., Chellappan, S. 2015. The role of nAChR and calcium signaling in pancreatic cancer initiation and progression. *Cancers*, 7(3), 1447–1471. doi:10.3390/cancers7030845
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3(6), 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671. de <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schunke, M., Faller, A. 2006. Estructura y función del cuerpo humano (1a ed.). Editorial Paidotribo: España.
- Skov, M. J., Beck, J. C., de Kater, A. W., Shopp, G. M. 2007. Nonclinical Safety of Ziconotide: An Intrathecal Analgesic of a New Pharmaceutical Class. *International Journal of Toxicology*, 26(5), 411–421. doi:10.1080/10915810701582970
- Spindel, E. R. 2016. Cholinergic Targets in Lung Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 22(14), 2152–2159. doi:10.2174/1381612822666160127114237
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. 1983. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre (Versión es; A. Núñez Cachaza, Ed.). Editorial Reverté, S.A.: Barcelona, España.
- Tu, C.-C., Huang, C.-Y., Cheng, W.-L., Hung, C.-S., Chang, Y.-J. 2016. Silencing A7-nAChR levels increases the sensitivity of gastric cancer cells to ixabepilone treatment. *Tumor Biology*, 37(7), 9493–9501. doi:<https://doi.org/10.1007/s13277-015-4751-x>

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1–12. doi:10.1093/nar/gks596
- WIPO - Search International and National Patent Collections. s/f. Consultado el 2 de septiembre de 2019, de https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf?_vid=P20-K02VAR-55538
- Wu, C.-H., Lee, C.-H., Ho, Y.-S. 2011. Nicotinic Acetylcholine Receptor-Based Blockade: Applications of Molecular Targets for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 17(11), 3533–3541. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2434
- Yadav, D., Lowenfels, A. B. 2013. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144(6), 1252–1261. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.068
- Yadav, N., Kumar, S., Marlowe, T., Chaudhary, A. K., Kumar, R., Wang, J., O'Malley, J., Boland, P. M., Jayanthi, S., Kumar, T. K. S., Yadava, N., Chandra, D. 2015. Oxidative phosphorylation-dependent regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. *Cell Death & Disease*, 6(11), e1969–e1969. doi:10.1038/cddis.2015.305
- Yadav, S. S., Prasad, C. B., Prasad, S. B., Pandey, L. K., Singh, S., Pradhan, S., Narayan, G. 2015. Anti-tumor activity of staurosporine in the tumor microenvironment of cervical cancer: An in vitro study. *Life Sciences*, 133, 21–28. doi:10.1016/j.lfs.2015.04.019

Anexo 1

Cultivo celular

Tabla 11. Referencias para cultivo celular.

	P96	P24	P06	D60	D100	D150
Superficie	0.32 cm ²	1.9 cm ²	9.5 cm ²	21 cm ²	55 cm ²	152 cm ²
PBS 1X	100 µl	500 µl	1 ml	2 ml	6 ml	12 ml
Tripsina	25 µl	50 µl	150 µl	400 µl	1 ml	3 ml
Medio completo (para detener tripsina)	75 µl	150 µl	850 µl	1.6 ml	4 ml	7 ml
Medio completo (para cultivo)	100 µl	500 µl	2 ml	3 ml	8 ml	20 ml

Las cajas con pocillos están representadas como P“n”, indicando la placa con “n” cantidad de pocillos, mientras que D“n”, son cajas con ese número de diámetro. Las cajas utilizadas son especiales para tratamiento con tejidos, es decir, el fondo de placa esta tratada.

Tabla 12. Preparación de PBS 1X (Solución amortiguadora de fosfatos).

Compuesto	Cantidad	Concentración final
NaCl	40 g	137 mM
KCl	1 g	2.7 mM
Na₂HPO₄	8.5 g	12 mM
KH₂PO₄	0.815 g	1.2 mM
Agua destilada	Aforar a 500 ml	-

En 400 ml de agua destilada adicionar cada una de las sales y agitar hasta disolver. Medir y ajustar el pH a 7.4 (utilizando HCl o NaOH 1M, en caso necesario), aforar a 500 ml con agua destilada y esterilizar.

Anexo 2

Soluciones para la extracción de ARN

Tabla 13. Preparación de RNase away.

Compuesto	Cantidad	Concentración final
SDS	3 g	3 %
Cloro/Blanqueador comercial	10 ml	10 %
Agua destilada	Aforar a 100 ml	-

En 70 ml de agua destilada agregar el SDS, agitar hasta disolver (la mezcla debe ser incolora), adicionar el cloro y aforar para un volumen final de 100 ml.

Tabla 14. Preparación de agua con DEPC al 0.1%.

Compuesto	Cantidad	Concentración final
Policarbonato de dietilo (DEPC)	0.5 ml	0.1 %
Agua destilada	499.5 ml	-

Incubar a 37°C por 1 h o 12 h a temperatura ambiente. Esterilizar en autoclave a 120°C por 15min.

Tabla 15. Preparación de buffer de electroforesis TAE 50X.

Compuesto	Cantidad	Concentración final
Sal disódica EDTA	18.61 g	50 mM
Tris base	242 g	2 M
Ácido acético glacial	57.1 ml	1 M
Agua destilada	Aforar a 1 litro	-

Añadir el Tris y EDTA a 700 ml de agua destilada, agitar hasta disolver. Agregar el ácido acético glacial y aforar a 1 litro con agua destilada. El stock de trabajo de TAE 1X tendrá una concentración de 40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético glacial y 1 mM de EDTA.

Tabla 16. Preparación de gel de agarosa.

Compuesto	Cantidad
Agar	1 g
TAE 1X	50 ml
Cloro/Blanqueador comercial	500 µl
Bromuro de etidio	7 µl

Diluir el agar en el buffer TAE, adicionar el cloro y calentar durante 30 s en el microondas. Esperar a que se atempere y adicionar el bromuro.