

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



**Identificación de agentes citotóxicos, provenientes del
caracol marino *Conus ximenes* en la línea celular
MDA-MB-231**

**TESIS
DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Joliann Marie Alers Rivera

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO
2014**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA CON
ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**Identificación de agentes citotóxicos, provenientes del
caracol marino *Conus ximenes* en la línea celular
MDA-MB-231**

Tesis

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

Presenta:

Joliann Marie Alers Rivera

Ensenada, Baja California, México

2014

Tesis defendida por

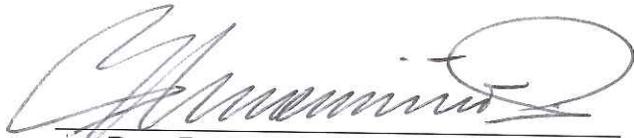
Joliann Marie Alers Rivera

y aprobada por el siguiente Comité



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Director del Comité



Dra. Reyna Rosa Mouriño Pérez
Miembro del Comité



Dr. Ernesto García Mendoza
Miembro del Comité



Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas
Miembro del Comité



Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Posgrado en
Ciencias de la Vida



Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Noviembre, 2014

BIBLIOTECA
CICERO

i

Resumen de la tesis de **Joliann Marie Alers Rivera**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Identificación de agentes citotóxicos, provenientes del caracol marino *Conus ximenes* en la línea celular MDA-MB-231

Resumen aprobado por:


Joliann Marie Alers Rivera

El cáncer es una de las principales causas de muertes en el mundo, se estima que las muertes por cáncer alcancen la cifra de 13.1 millones para el 2030, según la OMS. Aunque en la actualidad se cuenta con una gran variedad de fármacos quimioterapéuticos, estos se caracterizan por tener altos costos y efectos secundarios no deseados. En la búsqueda de nuevas moléculas de origen natural para el tratamiento en contra del cáncer, esta investigación se ha dirigido hacia los gasterópodos marinos pertenecientes al género *Conus*. Este género se comprende de 700 especies aproximadamente, que se caracterizan por ser depredadores venenosos. Cada especie contiene en su veneno un repertorio distintivo de 100-200 conotoxinas y en conjunto más de 50,000 componentes activos farmacológicamente en una variedad de receptores de membrana y canales iónicos, siendo esenciales en el crecimiento incontrolado, disminución de la apoptosis, angiogénesis desorganizada, y en la migración, invasión y metástasis, teniendo un rol fundamental en el desarrollo de cáncer. En este trabajo se analizó el veneno crudo del caracol marino *Conus ximenes* mediante RP-HPLC, obteniéndose dos subfracciones nombradas FII.6 y FIII.2, con actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Estas presentaron una disminución de la viabilidad celular en un 31% y 37%, respectivamente. Además de cambios morfológicos y activación de las caspasas-3/7, eventos representativos de la muerte celular por apoptosis. Por último, estas subfracciones se estudiaron mediante CCF, presentado resultados negativos para peptidos acorde a un revelador específico para aminoácidos llamado ninhidrina. Asimismo estas subfracciones se estudiaron por HPLC-RP-DAD y ESI/MS, que de acuerdo a las longitudes de onda UV absorbidas y a la falta de ionización, esto nos indica que la naturaleza del compuesto o compuestos de interés con actividad antitumoral no son de naturaleza peptídica, siendo un resultado innovador en el campo de estudio de los *Conus*.

Palabras clave: ***Conus ximenes*, cáncer, citotoxicidad, apoptosis, MDA-MB-231**

BIBLIOTECA
CIBICITA

Abstract of the thesis presented by **Joliann Marie Alers Rivera** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science of Life with orientation in Marine Biotechnology.

Identification of cytotoxic agents, from the marines snail *Conus ximenes* in the cell line MDA-MB-231

Abstract approved by:


Joliann Marie Alers Rivera

Cancer, a major cause of deaths worldwide, has been estimated to account for 13.1 million human deaths by 2030, according to WHO. Currently there are a variety of chemotherapeutic drugs available, although most are characterized by high costs and unwanted side effects. In the search for new molecules from natural sources for the treatment against cancer, this investigation has been directed towards marine gastropods of the genus *Conus*. This genus comprises about 700 species, which are characterized as venomous predators. Each species contains venom with a distinctive repertoire 100-200 conotoxins and altogether more 50,000 pharmacologically active components in a variety of membrane receptors and ion channels, remain essentials in the uncontrolled growth, decreased apoptosis, disorganized angiogenesis and migration, invasion and metastasis, having a fundamental role in the development of cancer. In this work the crude venom of the marine snail *Conus ximenes* was analyzed by RP-HPLC to afford two subfractions named FII.6 and FIII.2 with cytotoxic activity in the cell line of breast cancer MDA-MB-231. These showed a decrease in cell viability by 31% and 37% respectively. In addition to morphological changes and activation of caspases-3/7, representative events of cell death by apoptosis. Finally, these subfractions were studied by TLC, showing negative results for peptides according to a specific reveler for amino acids called ninhydrin. Also these subfractions were studied by RP-HPLC-DAD and ESI/MS, that according to the UV wavelengths absorbed and lack of ionization, this indicates that the nature of the compound or compounds of interest with antiumoral activity are not peptide nature, being an innovative result in the field of study of *Conus*.

Keywords: ***Conus ximenes*, cancer, cytotoxicity, apoptosis, MDA-MB-231**

Dedicatorias

*Quiero dedicarle este trabajo
A Dios que me ha dado la salud y fortaleza
para terminar este proyecto de investigación.*

*A mi Madre, por su apoyo incondicional, sacrificio y amor sin límites.
Es un privilegio ser tu hija... Te amo*

*A mi hermana Yolanda, por tu ayuda, cooperación y amor.
Gracias por siempre estar para mí, cuando te he necesitado.
Eres más que una hermana...*

*A cada una de las personas que han colaborado en toda mi formación profesional.
Su ayuda y sabiduría influyeron en mí, la madurez para lograr todos los objetivos en la vida.*

Esta tesis es para ustedes en agradecimiento por todo su amor

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos otorgados en mis estudios de posgrado.

Al Dr. Alexei F. Licea (Doc), gracias por aceptarme en su grupo de trabajo y por su apoyo en la realización de esta tesis, además de ser el jefe más genial que existe. Es un orgullo haber sido tu estudiante.

A los miembros del comité de tesis: Dra. Reyna Rosa Mouriño, Dra. Tanya A. Camacho y Dr. Ernesto García, gracias por sus correcciones y por brindarme su apoyo en la culminación de esta tesis.

Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California, CICESE, por la formación académica y por darme la oportunidad de realizar este posgrado.

A Félix y a Pavel, gracias por guiarme y rescatarme cuando más lo necesité. Les debo mucho chicos... Gracias

A todos los compañeros y técnicos de la Unidad de Desarrollo Biomédico, gracias por su apoyo.

A Tenoch, gracias por escuchar mis contínuas quejas y siempre recibirlas con una sonrisa. Gracias por tu apoyo y por soportarme en mis momentos de estrés, sin ti este trabajo hubiera sido mucho más difícil. Te amo mi amor!

A mis amigas, Paola, Melinda, Adriana, Daniela y Yesenia, gracias por aceptarme como su amiga tan pronto llegue a CICESE y por el apoyo durante estos años. Son parte fundamental en este trabajo y de mi vida. Las quiero chicas...

A mis amigas Vivi, Vanessa y Andrea, gracias por escucharme en las comiditas y en los cafés, gracias por siempre tener una palabra de aliento y hacer que las horas pasaran rápido. Las quiero chicas UDB!

Gracias al Dr. Pimienta, Dr. Fournier, Dra. Juárez y la M.C. Carla Uranga, por ser parte esencial en las últimas etapas de mi tesis.

En fin, gracias a México por haberme presentado tanta gente linda, por recibirme con tanta calidez y por enseñarme a comer chile. Gracias a TODOS!

BIBLIOTECA
CICESE

Tabla de Contenido

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	2
2.1 Características generales del género <i>Conus</i>	2
2.2 Componentes del veneno del género <i>Conus</i>	3
2.3 Producción del veneno del género <i>Conus</i>	4
2.4 Espécimen de interés.....	6
2.5 Cáncer.....	7
2.5.1 Aspectos generales.....	7
2.6 Cáncer de mama.....	8
2.7 Línea celular MDA-MB-231.....	8
2.8 Apoptosis y necrosis.....	9
2.9 Conotoxinas y sus dianas.....	10
2.9.1 Canales iónicos.....	10
2.9.2 Receptores celulares.....	12
Capítulo 3. Justificación.....	14
Capítulo 4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo General.....	15
4.2 Objetivos Particulares.....	15
Capítulo 5. Hipótesis.....	16
Capítulo 6. Metodología.....	17
6.1 Organismos y extracción del veneno.....	17
6.2 Separación del veneno crudo por cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC).....	17
6.2.1 Purificación de fracciones individuales.....	18
6.3 Cultivo de la línea celular MDA-MB-231.....	19
6.3.1 Preparación del material y equipo.....	19
6.3.2 Descongelamiento de la línea celular MDA-MB-231.....	19

Tabla de Contenido (Continuación)

	Página
6.3.3 Desprendimiento de la línea celular MDA-MB-231.....	20
6.3.4 Subcultivo de las células MDA-MB-231.....	20
6.3.5 Conteo celular.....	20
6.3.6 Criopreservación de la línea celular MDA-MB-231.....	21
6.3.7 Incubación de células de prueba.....	21
6.6 Cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa con detector UV de arreglo de diodos (RP-HPLC-DAD)	24
Capítulo 7. Resultados.....	26
7.1 Extracción de veneno crudo.....	26
7.2 Separación por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC)	27
7.3 Ensayos citotóxicos.....	27
7.3.1 Ensayo citotóxico de las 13 fracciones de veneno total de <i>Conus ximenes</i>	27
7.4 Purificación por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC) de la fracción II y fracción III, individualmente.....	28
7.4.1 Purificación de la fracción II.....	28
7.4.2 Purificación de la fracción III.....	28
7.5 Ensayos citotóxicos con las subfracciones de las fracciones II y III.....	29
7.5.1 Ensayo citotóxico en las células MDA-MB-231 con las subfracciones FII.6 y FIII.2, individualmente.....	29
7.5.2 Efectos de las subfracciones FII.6 y FIII.2, sobre la morfología de las células MDA-MB-231.....	30
7.5.3 Detección de apoptosis con la subfracción FII.6 y FIII.2, mediante la activación de las caspasas-3 y caspasas-7.....	31
7.6 Citometría de flujo para la detección de necrosis en las células MDA-MB-231, expuestas a las subfracción FII.6 y FIII.2.....	34
7.7 Cromatografía de alto desempeño de fase reversa con detector de arreglo de diodos (RP-HPLC-DAD).....	35
Capítulo 8. Discusión.....	37
Capítulo 9. Conclusiones.....	42
Capítulo 10. Perspectivas.....	43
Referencias bibliográficas.....	44

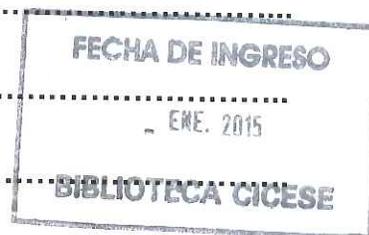


Tabla de Contenido (Continuación)

	Página
Anexos	49
Anexo 1. Soluciones utilizadas para la cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC)	49
Anexo 2. Solucion utilizada en la extracción del veneno crudo de <i>Conus ximenes</i>	50
Anexo 3. Soluciones utilizadas para los bioensayos y cultivo celular	50
Anexo 4. Soluciones utilizadas para el cultivo celular y análisis por citometría de flujo para la detección de necrosis.....	50

Lista de Figuras

Figura	Página
1 Diagrama del aparato venenoso de los moluscos marinos del género <i>Conus</i> (Norton y Olivera, 2006).....	4
2 Esquema de la organización del precursor peptídico de las conotoxinas.....	5
3 Maduración y clasificación de los conopeptidos (Kaas et al., 2010).....	6
4 Organismo <i>Conus ximenes</i> diseccionado junto a su aparato venenoso.....	7
5 Características distintivas del cáncer como enfermedad neoplásica (Hanahan y Weinberg, 2011).....	8
6 Imágenes de las células de adenocarcinoma de mama, MDA-MB-231. Fotografía A fue tomada con un objetivo 10X, mientras que la fotografía B fue tomada con un objetivo 40X.....	9
7 Tipos de canales iónicos (Alberts et al., 2006).....	11
8 Pasos en la extracción de veneno crudo proveniente del caracol marino <i>Conus ximenes</i>	17
9 Pasos a realizar en la separación del veneno crudo por cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC).....	18
10 Cromatograma obtenido del extracto de los aparatos venenosos (veneno crudo) de <i>Conus ximenes</i> . Las fracciones colectadas se especifican en números romanos.....	26
11 Efecto de las 13 fracciones obtenidas en la purificación por HPLC-RP del veneno total de <i>C. ximenes</i> . Donde el Ctrl + significa control positivo (DMSO al 10%) y Ctrl - significa control negativo (H ₂ O dd estéril). Cada fracción fue agregada a una concentración de 50 µl/ml.....	27
12 Cromatograma de la fracción II, correspondiente a los minutos 5-10 de la purificación de veneno crudo de <i>Conus ximenes</i>	28
13 Cromatograma de purificación de la fracción III individual correspondiente a los minutos 10-15 de la corrida de veneno crudo de <i>C. ximenes</i>	29
14 Efecto de la subfracción FII.6 y FIII.2 en las células MDA-MB-231. Donde el Ctrl + significa control positivo (DMSO al 10%) y Ctrl - significa control negativo (10% de H ₂ O dd estéril). Panel A, efecto citotóxico obtenido de la subfracción FII.6 y panel B, efecto citotóxico de la subfracción FIII.2.....	30

BIBLIOTECA

Lista de Figuras (Continuación)

Figura		Página
15	Cambios morfológicos de las células tumorales MDA-MB-231 expuestas a las subfracciones FII.6 y FIII.2, individualmente. Células MDA-MB-231 tratadas con 4.1 µg/µl de la subfracción FII.6. Células MDA-MB-231 tratadas con 1 µg/µl de la subfracción FIII.2. Control positivo para necrosis H ₂ O ₂ 100 µM. Control positivo para apoptosis PMA 40 µM. Control negativo, células MDA-MB-231 sin ningún tratamiento.....	31
16	Células MDA-MB-231 apoptóticas a las 24 y 12 horas de exposición con la subfracción FII.6, control positivo (PMA 40 µM con 24 horas de exposición) y control negativo (Células sin agente apoptótico, incubadas durante 24 horas). Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia EVOS®FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies, USA) en una longitud de onda de 530nm, con un objetivo de 20X.....	33
17	Células MDA-MB-231 apoptóticas a las 24 horas de exposición con la subfracción FIII.2, control positivo (PMA 40 µM con 24 horas de exposición) y control negativo (Células sin agente apoptótico, incubadas durante 24 horas). Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia EVOS®FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies, USA) en una longitud de onda de 530nm, con un objetivo de 20X.....	34
18	Células MDA-MB-231, tenidas con yoduro de propidio. (A) Células tratadas con la subfracción FII.6. (B) Células tratadas con la subfracción FIII.2. (C) Control positivo para necrosis (H ₂ O ₂ , 100 µM). (D) Control negativo. (R7: células necróticas).....	35
19	Cromatograma obtenido de la purificación de la subfracción FII.6 por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC), junto a su respectivo espectro generado con detector de arreglo de diodos (DAD). (A) Cromatograma de la subfracción FII.6. (B) Espectro generado por DAD de la subfracción FII.6 con absorbancia mayoritaria detectada a 250 nm.....	36
20	Cromatograma obtenido de la purificación de la subfracción FIII.2 por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (HPLC-RP), junto a su respectivo espectro generado con detector de arreglo de diodos (DAD) (A) Cromatograma de la subfracción FIII.2. (B) Espectro generado por DAD de la subfracción FIII.2 con absorbancia mayoritaria detectada a 250 nm.....	36

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Condiciones cromatográficas utilizadas en las purificaciones de las fracciones II y III, colectadas en la separación del veneno crudo de <i>Conus ximenes</i>	19
2	Condiciones cromatográficas utilizadas en la separación de las subfracciones FII.4.2 y FIII.9, respectivamente, mediante RP-HPLC-DAD.	25

BIBLIOTECA
CICLON

Capítulo 1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muertes en el mundo, predominando los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. Se estima que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo, pudiendo alcanzar la cifra de 11.5 millones de defunciones y 15.5 millones de casos nuevos para el 2030, según la OMS. En la actualidad se cuenta con una gran variedad de fármacos quimioterapéuticos, que han sido ampliamente utilizados. Sin embargo, estos se caracterizan por tener altos costos y efectos secundarios no deseados, por lo que existe la necesidad de buscar nuevas opciones para el tratamiento del cáncer, especialmente en productos de origen natural. En la exhaustiva búsqueda de nuevas moléculas existe investigación con los gasterópodos marinos pertenecientes al género *Conus*. Estos caracoles se caracterizan por ser depredadores venenosos y su género comprende 700 especies aproximadamente. Cada especie puede tener un repertorio distintivo de entre 100 a 200 conotoxinas (Essack *et al.*, 2012). Se estima que en el veneno de los caracoles *Conus* existe un conjunto de más de 50,000 componentes activos farmacológicamente, cada uno con actividades fisiológicas específicas, dirigiéndose a una variedad de receptores de membrana y canales iónicos con alta afinidad, selectividad y potencia (Buczek *et al.*, 2005; Norton y Olivera, 2006). Se ha demostrado que la mayoría de las conotoxinas se dirigen específicamente hacia los canales iónicos activados por ligando y dependientes de voltaje, en el sistema nervioso de la presa. Asimismo, actúan en canales iónicos homólogos en mamíferos, los cuales son esenciales en el crecimiento incontrolado, disminución de la apoptosis, angiogénesis desorganizada, y en la migración, invasión y metástasis, teniendo un rol fundamental en el desarrollo de cáncer (Essack *et al.*, 2012; Kunzelmann, 2005). En este trabajo se pretende encontrar y caracterizar una(s) molécula(s) en el veneno del caracol *Conus ximenes*, con actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, teniendo como finalidad, innovar y ampliar el panorama de búsqueda molecular dentro del veneno de *C. ximenes*.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Características generales del Género *Conus*

Los moluscos marinos pertenecientes al género *Conus*, se caracterizan por ser depredadores, que utilizan su complejo veneno para capturar su presa, defenderse de otros y disuadir competidores (Olivera, 2002). Este género se comprende de 700 especies aproximadamente (Essack *et al.*, 2012). El veneno de cada especie contiene un repertorio distintivo de más de 200 componentes activos farmacológicamente, teniendo como diana principalmente diferentes canales iónicos dependientes de voltaje y activados por ligando (Becker y Terlau, 2008).

Los *Conus* o Cónidos, se clasifican dentro de la familia Conidae, la cual junto a las familias Terebridae y Turridae, pertenecen a la Superfamilia Conoidea (Olivera, 2002). El género *Conus*, tienen como particularidad la presencia de un aparato venenoso altamente especializado, en el cual se sintetiza el veneno para luego ser expulsado hacia la probóscide, con la finalidad de ser inyectado en la presa (Norton y Olivera, 2006). Con respecto a la acción del veneno en la víctima, diferentes conopéptidos se pueden agrupar de acuerdo a su rol biológico en la inmovilización de la presa. Por ejemplo algunos han demostrado ser importantes para la inmovilización rápida de la presa llamados "*lightning strike caba*", mientras que otros ejercen su acción durante las fases tardías del envenenamiento, lo que resulta en un irreversible bloqueo de la transmisión neuromuscular llamándoles "*motor caba*" (Becker y Terlau, 2008).

La mayoría de los *Conus* son nocturnos, cuando los peces están relativamente inactivos (Olivera, 2002). Estos organismos cuentan con dos ojos, sin embargo su visión es pobre, por ello requieren de una destreza quimiosensora para atacar a su presa (Terlau y Olivera, 2004). Casi todos los *Conus* prosperan en hábitats tropicales, particularmente alrededor de los arrecifes de coral. Aun cuando algunas pocas especies se han adaptado a vivir en aguas frías, existe una diversidad menor en especies de este género fuera del trópico (Olivera, 2002). Las interacciones biológicas de los caracoles cónicos con otros animales en sus respectivos hábitats, proporciona una base general de por qué cada

especie de *Conus* ha evolucionado hasta tener su propio repertorio molecular en sus venenos (Olivera, 2002). No obstante, la mayoría de las interacciones bióticas entre los *Conus* y otros animales, son desconocidas (Terlau y Olivera, 2004).

Los caracoles *Conus* generalmente se dividen en tres grupos de acuerdo a la presa envenenada. Existe el grupo de los vermívoros, que es el más grande y se alimentan de poliquetos y gusanos como los *hemicordados* y *equiuroideos*. El segundo grupo son los moluscívoros, ya que cazan otros moluscos gasterópodos. Por último, está el grupo de los piscívoros, que inmovilizan peces, siendo el más notable ya que cuenta con venenos de mayor potencia que inmovilizan rápidamente la presa (Terlau y Olivera, 2004).

2.2 Componentes del veneno del género *Conus*

Típicamente el veneno de los *Conus*, consiste de un fluido lechoso que contiene pequeños gránulos insolubles, proteínas insolubles, péptidos y componentes de bajo peso molecular (Tucker, 1985). Una variedad de pequeñas moléculas han sido detectadas en el veneno de los *Conus*, sin embargo sólo dos de éstas han sido identificadas. Estas moléculas son la serotonina y el ácido araquidónico, las cuales están presentes en el veneno de *Conus imperialis* y *Conus textile*, respectivamente (Terlau y Olivera, 2004). Los péptidos han sido el componente más característico y predominante dentro del veneno de los *Conus*, conocidos como conotoxinas o conopéptidos (Mcintosh *et al.*, 1999). Estos son péptidos de 12 a 46 aminoácidos de longitud que contienen un gran número de residuos de cisteína (Fedosov *et al.*, 2012). Las conotoxinas o conopéptidos tienen modificaciones postraduccionales, lo que genera una alta diversidad química que puede explicar su especificidad para objetivos macromoleculares (Kaas *et al.*, 2010). Dichas modificaciones postraduccionales incluyen la hidroxilación de prolinas y la O-glucosilación de serinas o treoninas, así como otras modificaciones inusuales como la carboxilación en glutaminas, bromación en triptófanos y sulfatación en tirosinas (Terlau y Olivera, 2004). De acuerdo a Lewis en 2009, existen dos divisiones de los componentes del veneno de los *Conus*, clasificándose de acuerdo a su letalidad y enlaces disulfuros. Las conotoxinas, están compuestas de múltiples enlaces disulfuros y provocan efectos

letales en sus presas. Mientras que los conopéptidos, están compuestos de un enlace disulfuro o sin enlace disulfuro y su efecto no llega a ser letal (Terlau y Olivera, 2004).

2.3 Producción del veneno y elementos del aparato venenoso

El sistema de administración del veneno de los moluscos marinos del género *Conus*, consiste en un sofisticado aparato venenoso formado por un conducto venenoso, bulbo venenoso y dientes radulares, principalmente (Figura 1) (Olivera, 2002).

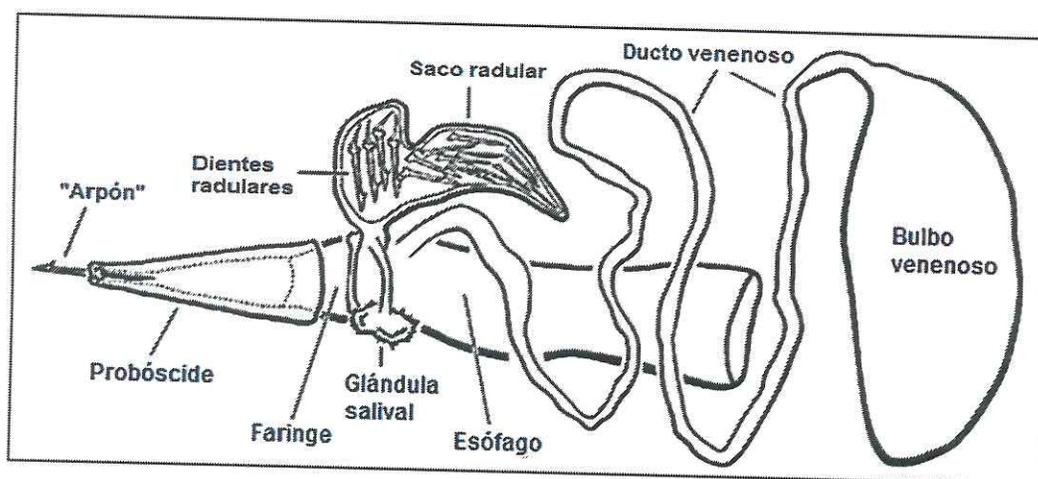


Figura 1: Diagrama del aparato venenoso de los moluscos marinos del género *Conus* (Norton y Olivera, 2006).

Los componentes activos biológicamente del veneno de los *Conus*, son sintetizados en las células epiteliales que revisten el conducto tubular venenoso. El veneno es expulsado hacia la probóscide con la fuerza muscular proporcionada por el bulbo venenoso y a la vez el diente radular se mueve de forma individual en la probóscide, sirviendo como arpón y aguja hipodérmica para la inyección del veneno en la presa (Norton y Olivera, 2006). Las conotoxinas son codificadas genéticamente como pequeñas proteínas que inicialmente se traducen como un precursor prepropéptido o precursor peptídico, el cual consiste de una secuencia señal llamada región "pre" (~25 aminoácidos), seguido de una región espaciadora nombrada región "pro" (~20-40 aminoácidos) y en la parte C-terminal representa la región de la toxina madura (~10-40 aminoácidos) (Figura 2) (Becker y Terlau, 2008; Olivera, 2006).

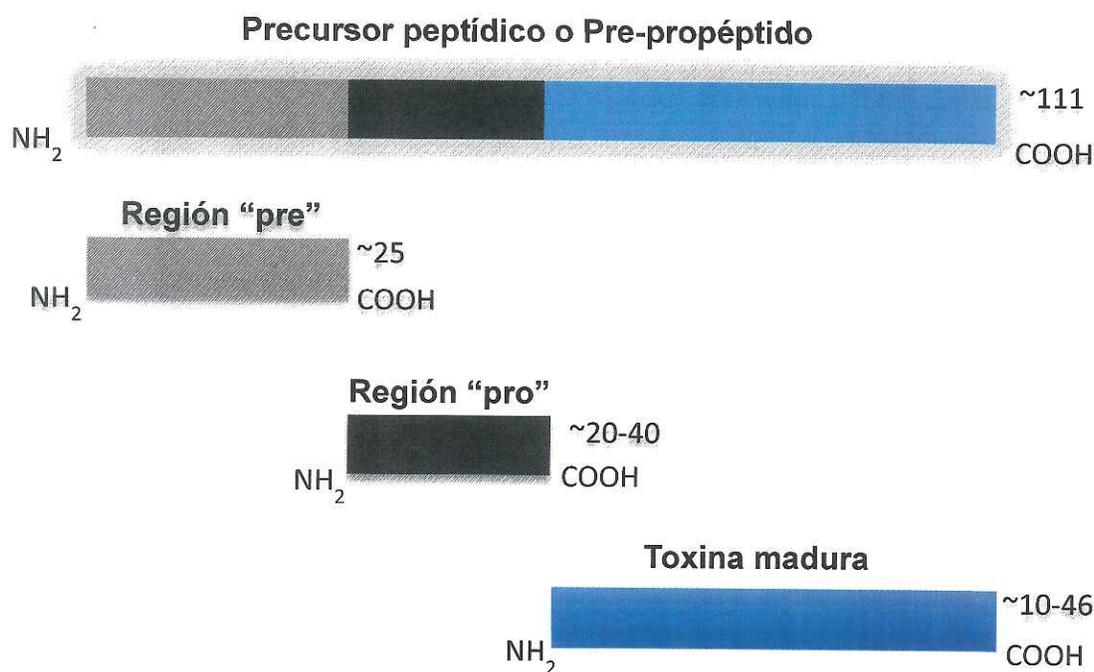


Figura 2. Esquema de la organización del precursor peptídico de las conotoxinas.

El precursor peptídico se expresa en las células epiteliales que recubren el ducto venenoso. Estos precursores se clasifican en "superfamilias de genes", basados en las similitudes de secuencia de sus secuencias señal o región "pre" (Kaas *et al.*, 2010) como se puede observar en la Figura 3. El precursor peptídico se somete a varios pasos de maduración probablemente en el retículo endoplásmico y/o el aparato de Golgi, con la sucesiva escisión enzimática de su secuencia de señal o región "pre" y la región "pro" (Kaas *et al.*, 2010). Luego de estos pasos de maduración se producen las modificaciones postraduccionales que sirven como característica para otras clasificaciones (Fedosov *et al.*, 2012; Kaas *et al.*, 2010).

Por último, dentro de las superfamilias de genes, los conopeptidos pueden tener distintas dianas; clasificándose de acuerdo a sus propiedades farmacológicas (Becker y Terlau, 2008). Las diferencias en los enlaces disulfuros y cisteínas, forman conformaciones variables, contribuyendo a la selectividad de los conopeptidos para ciertos receptores y canales iónicos (Shen *et al.*, 2000). La clase del receptor diana y el efecto (agonistas, antagonistas, retraso en la inactivación) definen las "familias farmacológicas" (Kaas *et al.*, 2010). Otras clasificaciones utilizadas por diferentes autores son el número de

conotoxinas maduras, el número de especies, los subtipos de especies, tipo de dieta de la especie y ubicación geográfica de las especies (Kaas *et al.*, 2010).

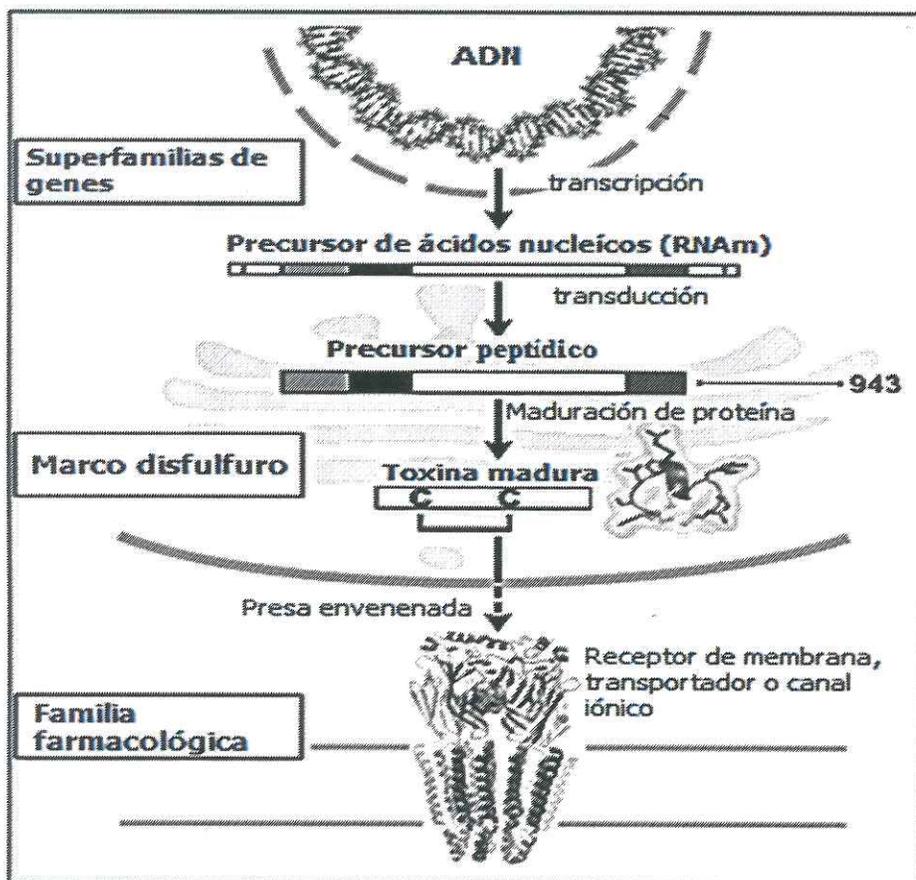


Figura 3. Maduración y clasificación de los conopeptidos (Kaas *et al.*, 2010)

2.4 Espécimen de interés

Los especímenes pertenecientes a la especie *Conus ximenes*, tienen una concha que contiene filas de puntos sobre ella, tanto en el ángulo del hombro como en la sutura con el espiral adyacente. Inclusive se encuentran con frecuencia manchas color marrón que atraviesan todo el ancho de la concha y su abertura es de color púrpura o lavanda (Figura 4). Los caracoles miden aproximadamente 16.5 mm de longitud y se encuentran en Baja California, México principalmente en Bahía de los Ángeles (Tucker, 1987). Asimismo se han reportado en Panamá, Islas Galápagos, Ecuador y Perú. Habitan en el infralitoral areno-fangoso, llegando hasta una profundidad de 91.4 metros (Paredes *et al.*, 2010).

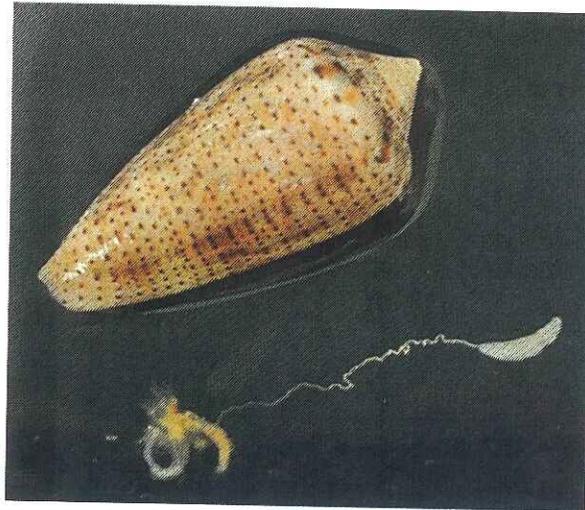


Figura 4: Organismo diseccionado *Conus ximenes*, junto a su aparato venenoso.

2.5 Cáncer

2.5.1 Aspectos generales

El cáncer se refiere a un grupo de condiciones que han manifestado un desarrollo maligno, es decir una división celular sin regulación ni verificación, dirigiendo la metástasis (Pelengaris y Khan, 2013). Las células se vuelven cancerígenas cuando no son capaces de responder normalmente a las señales químicas de otras células y en lugar de detenerse, continúan creciendo y dividiéndose (Silverstein *et al.*, 2006). Esta patogénesis implica cambios dinámicos en el genoma que en última instancia perjudican la homeostasis normal del tejido, teniendo seis características distintivas como enfermedad neoplásica (Figura 5) (Prevarskaya *et al.*, 2010). Las alteraciones genéticas las responsables de la tumorigénesis son tres: los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de estabilidad (Vogelstein y Kinzler, 2004). Los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama, son los tipos de cánceres con una mayor tasa de mortalidad en el mundo. De acuerdo a la OMS, se estima que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 11.5 millones de defunciones y 15.5 millones de casos nuevos para el 2030 (<http://www.who.int/features/qa/15/es/>).

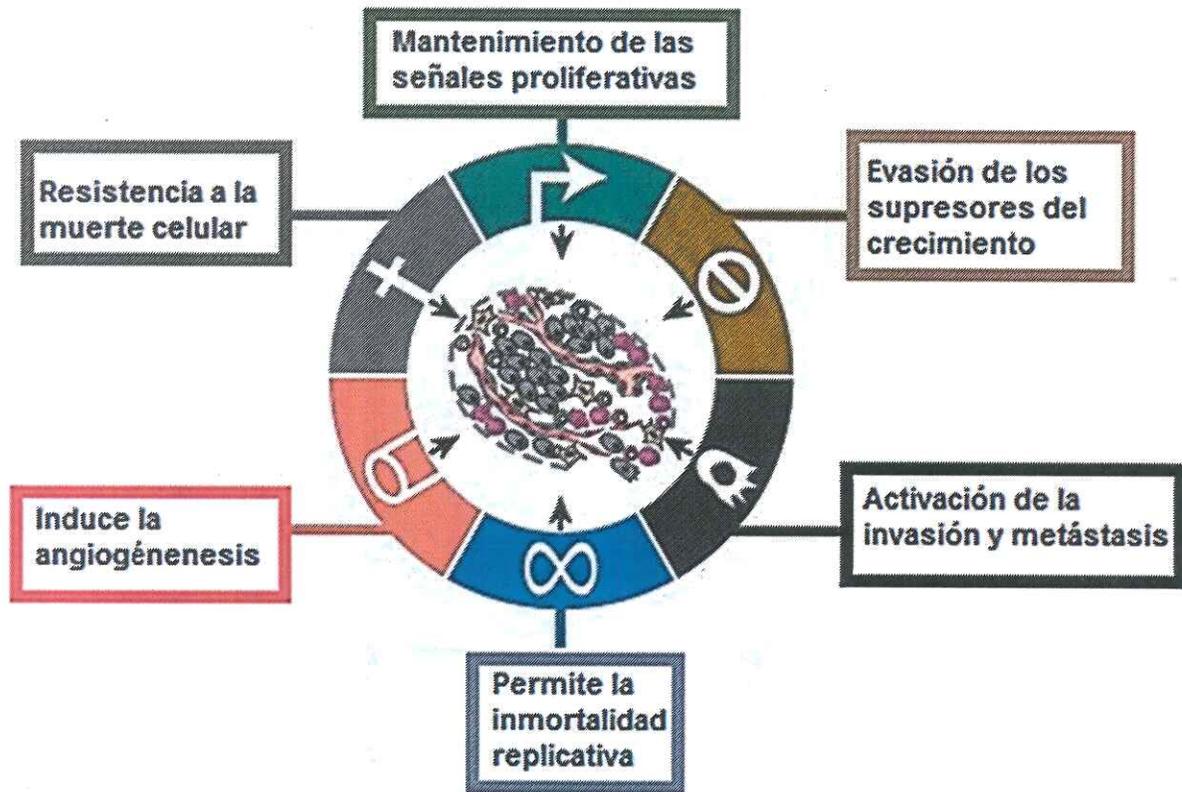


Figura 5: Características distintivas del cáncer como enfermedad neoplásica (Hanahan y Weinberg, 2011).

2.6 Cáncer de mama

Desde hace varias décadas, el cáncer de mama es una grave amenaza para la salud a nivel mundial. Esta afección es la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años de edad y se estima un incremento notable cercano a 16,500 nuevos casos anuales para 2020 en México (Knaul *et al.*, 2009). Esta afección tiene como factores de riesgo la menarquia temprana, menopausia tardía, obesidad, anticonceptivos orales, terapia hormonal para la menopausia, vida sedentaria y adicciones como el alcohol y la nicotina (Key *et al.*, 2001).

2.7 Línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231

La línea celular de adenocarcinoma MDA-MB-231 es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama hormono-independiente (negativa al

receptor de estradiol, RE-) (Figura 6). Estas células fueron aisladas en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con cáncer de mama que falleció de esta enfermedad en el *M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute* en Houston, Estados Unidos (Cailleau *et al.*, 1978).

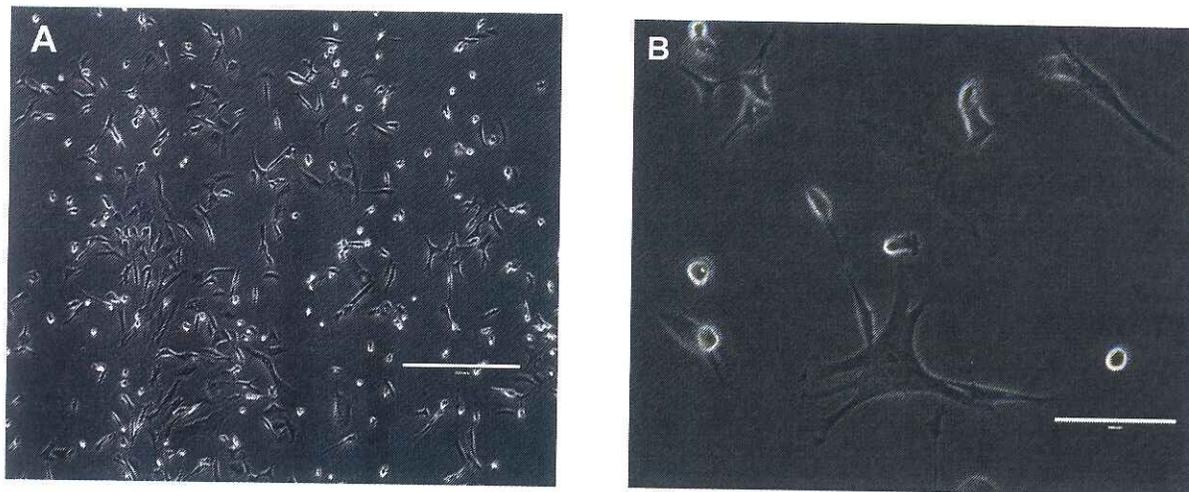


Figura 6: Imágenes de células de adenocarcinoma de mama, MDA-MB-231. La fotografía (A) fue tomada con un objetivo 10X, mientras que la fotografía (B) fue tomada con un objetivo 40X.

MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama ER-negativo que se deriva de un adenocarcinoma mamario metastásico, el cual es altamente agresivo, invasivo y pobremente diferenciado (Hong *et al.*, 2010). Las células MDA-MB-231, también se relacionan con la señalización extrínseca derivada de factores de crecimiento y adhesión celular. Esta línea celular presenta mutaciones en el gen p53, CDKN2A (*Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*), gen *neurofibromatosis 2* (NF2), BRAF y KRAS, de acuerdo a *American Type Culture Collection* (ATCC, USA).

2.8 Apoptosis y necrosis

Las células mamíferas al ser expuestas a agentes citotóxicos, padecen ciertos patrones de muerte celular. Los patrones principales son la apoptosis y la necrosis (Bezabeh *et al.*, 2001). Estos parámetros biológicos determinan el estado del cultivo celular, ya que revelan condiciones específicas de la célula a nivel fisiológico, morfológico, bioquímico y genético.

El término apoptosis se describe como la muerte celular programada, caracterizada por cambios morfológicos definidos como; encogimiento celular, condensación de la cromatina, globulación de la membrana y finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos (Saraste y Pulkki, 2000). La apoptosis viene acompañada de procesos bioquímicos como; la activación de las capas iniciadoras y efectoras, la liberación del complejo citocromo C desde la mitocondria, la externalización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática, la escisión de la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP) y la fragmentación del ADN internucleosomal (Sundquist *et al.*, 2006). Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por los macrófagos o células adyacentes, siendo la apoptosis activada en muchos fármacos quimioterapéuticos en contra del cáncer (Bezabeh *et al.*, 2001).

Por otra parte el término necrosis, usualmente se refiere a la muerte celular no programada (Amaravadi y Thompson, 2007). La necrosis resulta de una abrumadora lesión celular física y se distingue por la inflamación de los organelos celulares, fragmentación del núcleo y cromatina y ruptura de la membrana plasmática, permitiendo la salida de proteínas intracelulares que provocan daños en el sistema inmunitario del hospedero, resultando a menudo en daños a tejidos normales (Amaravadi y Thompson, 2007; Bezabeh *et al.*, 2001).

2.9 Conotoxinas y sus dianas

2.9.1 Canales iónicos

Los canales iónicos son estructuras que atraviesan la membrana plasmática formando poros y que permiten el flujo selectivo y rápido de determinados iones a favor de un gradiente químico y eléctrico (Moro *et al.*, 2009). El transporte de iones es un componente clave en diversos procesos biológicos como en la transducción de señales, expresión génica, secreción de hormonas, contracción muscular, respuesta inmune, regulación del volumen celular, proliferación celular y en la generación y conducción de impulsos eléctricos a lo largo de los nervios (Ko *et al.*, 2013). Además los parámetros homeostáticos como la concentración de iones intracelular, el pH citosólico y el volumen celular, son gobernados por la actividad de los canales iónicos.

Los canales iónicos suelen denominarse en función a su permeabilidad y selectividad de iones (Figura 7). Se clasifican en respuesta a cambios en el potencial de membrana (canales dependientes de voltaje), a ligandos extracelulares (canales dependientes de ligandos extracelulares) y en respuesta a elementos intracelulares generados por ligandos sobre los receptores, como segundos mensajeros, subunidades de proteínas G y ATP (Armijo *et al.*, 2000). También están los canales mecánico-dependientes, que son estimulados por algún estrés mecánico que tensiona o distiende las moléculas que conforman el canal (Taleisnik, 2006).

Un número creciente de estudios han implicado a los canales iónicos en muchos aspectos del cáncer, como en el crecimiento incontrolado, disminución de la apoptosis, angiogénesis desorganizada, migración agresiva, invasión y metástasis (Cuddapah y Sontheimer, 2011). Además durante el cambio de las células epiteliales normales a células cancerígenas ocurren una serie de alteraciones genéticas, que pueden afectar la expresión de los canales iónicos ó cambiar la actividad de los mismos, induciendo la proliferación de tumores (Kunzelmann, 2005).

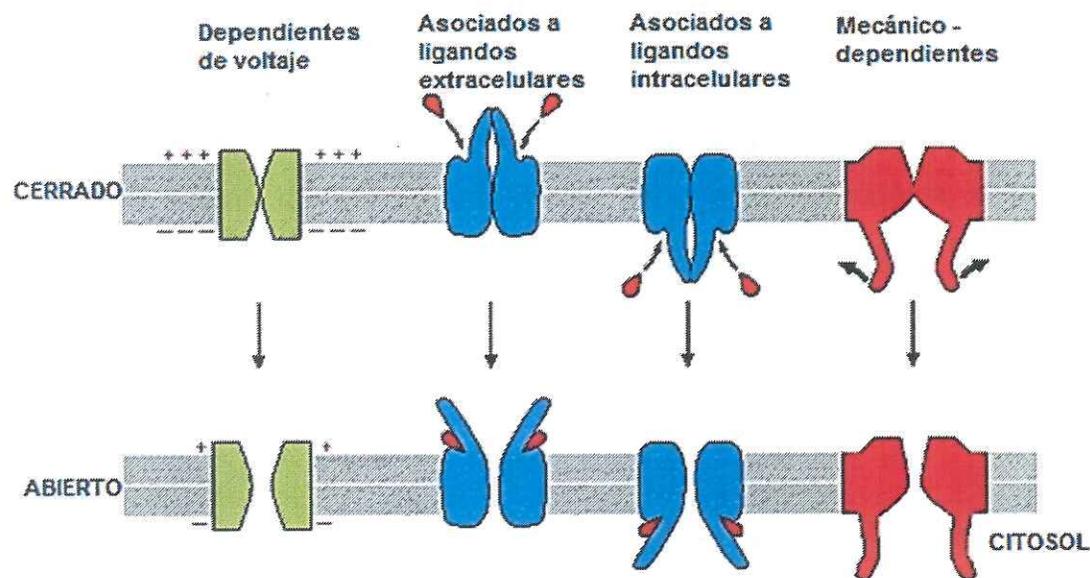


Figura 7. Tipos de canales iónicos (Alberts *et al.*, 2006).

Las conotoxinas tienen como blancos moleculares los canales iónicos y son capaces de discriminar entre isoformas moleculares estrechamente relacionados de los miembros de una familia de canales iónicos en particular, por lo que son una herramienta cada vez más importante para la investigación de los diferentes estados, transiciones y función de

los canales iónicos. Se han identificado tres familias distintas de conopéptidos conocidas por atacar los canales de sodio dependientes de voltaje (NaV). Las familias δ -conotoxinas, μ -conotoxinas y μ O-conotoxinas, actúan sobre los canales de sodio, retrasando o inhibiendo la activación rápida de estos canales (Lewis, 2009). La expresión de canales NaV promueve una alta movilidad e invasividad celular, incrementando el potencial metastásico de las células cancerígenas (Lewis *et al.*, 2007). Específicamente los canales NaVI.5 y NaVI.7, que se expresan en cánceres epiteliales como de pulmón, próstata, cérvico-uterino y mama (Pedersen y Stock, 2013).

También se conoce la familia μ O-conotoxinas y ω -conotoxinas (Ejemplos; ω -GVIA y ω -MVIIA) que inhiben la conductancia de los canales de calcio, interviniendo con ciertas vías de señalización que desempeñan un papel importante en la iniciación del cáncer, formación y progresión de tumores, metástasis, invasión y angiogénesis (Lewis, 2009; Parkash y Asotra, 2010)

Por otro lado, ciertos conopéptidos tienen como diana los canales de potasio, se han caracterizado como κ -conotoxinas y existe suficiente evidencia que señala que los canales de potasio (K^+), juegan un rol importante en la regulación de la proliferación tumoral, progresión del ciclo celular y apoptosis, en el cáncer de mama (Strolb *et al.*, 1995). Específicamente durante el ciclo celular, en la progresión desde la fase G1 a la fase S, los canales de K^+ abiertos permiten la salida de iones de potasio, hiperpolarizando el potencial de membrana, siendo esto la transducción de señal en el cáncer de mama.

2.9.2 Receptores celulares

Los receptores celulares se pueden clasificar de acuerdo a su ubicación y ligando. Se dividen en ligandos con receptores citoplasmáticos y ligandos con receptores en la membrana plasmática (Sadava *et al.*, 2009). En los mamíferos, existen tres tipos de receptores de membrana plasmática bien estudiados, siendo los receptores de membrana relacionados a canales iónicos, receptores de membrana asociados a enzimas y los receptores acoplados a proteínas G (Curtis *et al.*, 2008). Siendo estos receptores, posibles dianas ya que los componentes activos farmacológicamente del

veneno de los *Conus*, se dirigen a receptores celulares y transportadores, al igual que a canales iónicos (Buczek *et al.*, 2005; Norton y Olivera, 2006).

De acuerdo a Shen y colaboradores en 2000, los conopéptidos han evolucionado con el fin de actuar en dianas comunes. Por ejemplo, las α -conotoxinas inhiben los receptores neuromusculares nicotínicos (nACH), mediante la inhibición de los sitios de unión de acetilcolina. Estas conotoxinas tienen aplicaciones potenciales como tratamientos para la ansiedad, enfermedad de Parkinson, dolor, como relajantes musculares y agente antihipertensivo (Shen *et al.*, 2000). Además pueden ser usadas como tratamiento para cáncer pulmonar de células pequeñas, este tipo de cáncer es altamente agresivo, está compuesto de células neuroendócrinas secretoras que expresan los receptores nACH. Sin embargo las ψ -conotoxinas, inhiben el mismo receptor nACH a través de un mecanismo no competitivo (Shen *et al.*, 2000).

Por otro lado, están las familias de conotoxinas y conopéptidos, que actúan en el transportador de norepinefrina (χ -conopéptidos), en los receptores α 1-adrenérgicos (ρ -conopéptidos), los receptores NMDA (conantoquinas), el receptor de la vasopresina (conopresinas) y el receptor de neurotensina (contulakinas) (Lewis, 2009).

BIBLIOTECA
CICERO

Capítulo 3. Justificación

El cáncer es una de las enfermedades de mayor aumento en los últimos años, atribuyéndole 7.6 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2008 (OMS, 2014). En la actualidad existen una gran cantidad de fármacos en contra de la enfermedad del cáncer. Sin embargo estos se caracterizan por sus altos costos económicos y efectos secundarios que inducen severos daños a tejidos y a células normales (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Es por esto que se ha intensificado la búsqueda de nuevas terapias de origen natural en contra del cáncer, con el fin de disminuir los efectos secundarios y los altos costos financieros que esta enfermedad provoca.

La expresión de algunos canales iónicos, se han relacionado en muchos aspectos del cáncer, como en el crecimiento incontrolado, disminución de la apoptosis, angiogénesis desorganizada, migración agresiva, invasión y metástasis. Mientras que el análisis bioquímico de los componentes del veneno del género *Conus*, ha revelado un gran número de péptidos y moléculas, que se dirigen con muy alta afinidad y selectividad a una variedad de receptores membranales y canales iónicos, que los hace candidatos ideales para el desarrollo de potenciales terapias anticancerígenas (Terlau y Olivera, 2004). Es por esto que se pretende identificar una(s) molécula(s) en el veneno del caracol marino *Conus ximenes*, con actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con la finalidad de ampliar el panorama de búsqueda de novedosos fármacos antitumorales.

Capítulo 4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar el potencial del veneno del caracol *Conus ximenes* como fuente de moléculas bioactivas para el aislamiento de compuestos contra la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

4.2 Objetivos Particulares

- Aislar molécula(s) del veneno de caracol marino *Conus ximenes* con actividad citotóxica o moduladora de la división celular sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
- Determinar la vía de acción de la(s) molécula(s) purificada(s) del veneno crudo del caracol marino *Conus ximenes* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
- Determinar la naturaleza de la(s) molécula(s) que presenten actividad biológica sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

Capítulo 5. Hipótesis

En el veneno del caracol marino *Conus ximenes*, existe por lo menos una molécula con actividad citotóxica sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

2018
11
10
09
08
07
06
05
04
03
02
01

Capítulo 6. Metodología

6.1 Organismos y extracción del veneno

Los especímenes de *C. ximenes* se recolectaron en Bahía de los Ángeles, Baja California, México, durante el mes de Febrero del 2013. El veneno se obtuvo mediante la disección de los organismos, extrayendo el aparato venenoso. Se procedió a separar el veneno colocando el conducto venenoso en un homogenizador de vidrio junto a 1 ml de solución C (Anexo 2) por cada 20 caracoles aproximadamente. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Luego se recuperó el sobrenadante, el cual se liofilizó para su almacenamiento a -80°C, hasta su utilización (Figura 8).

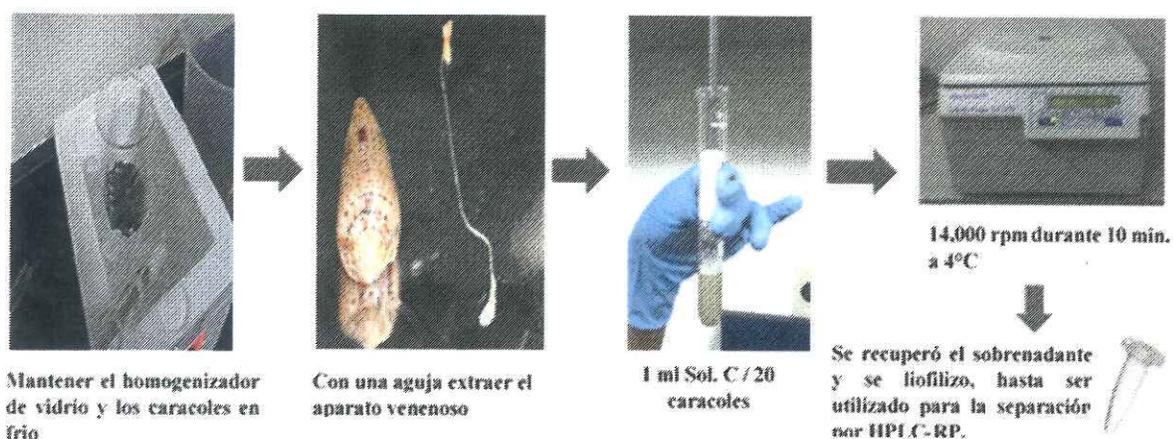


Figura 8. Pasos en la extracción de veneno crudo proveniente del caracol marino *Conus ximenes*.

6.2 Separación del veneno crudo por cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC)

El extracto de los aparatos venenosos se resuspendió en solución A (Anexo 1) y se inyectó en un cromatógrafo Agilent 1220 (Agilent Technologies, USA), utilizando una precolumna Zorbax C18 (StableBond Analytical, 4.6 x 12.5 mm, 5µm, Agilent Technologies, USA) y una columna Zorbax 300SB-C18 (5 µm, 4.6 x 250 mm, 300 Å), la cual se equilibró con solución B (Anexo 1). La muestra se corrió en un flujo constante de

1 ml/min, con un gradiente lineal de 0% a 60% de solución B (Anexo 1), durante 60 minutos. La detección de los componentes se realizó por absorción de luz UV a una longitud de onda de 230 nm y se colectaron fracciones cada 5 minutos obteniéndose 13 fracciones en total. Estas fracciones se liofilizaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización en ensayos citotóxicos (Figura 9).

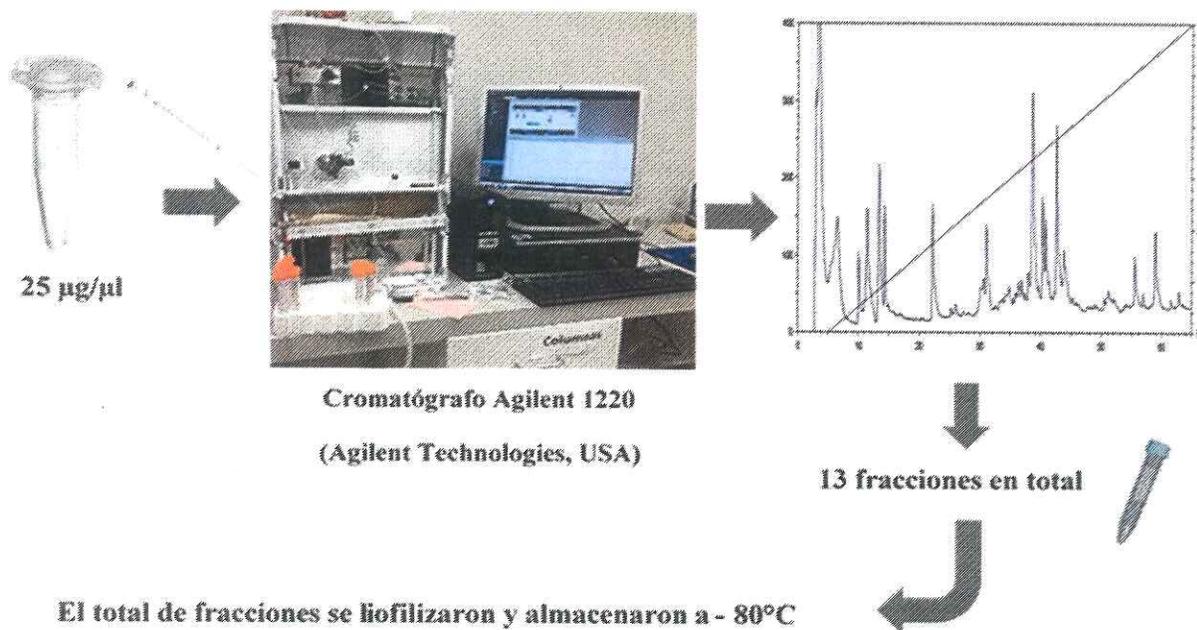


Figura 9. Pasos a realizar en la separación del veneno crudo por cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC)

6.2.1 Purificación de fracciones individuales

Las fracciones anteriormente separadas y liofilizadas se resuspendieron en solución A (Anexo 1) y para obtener subfracciones, se utilizó un cromatógrafo Agilent 110 (Agilent Technologies, USA), precolumna Zorbax C18 (StableBond Analytical, 4.6 x 12.5 mm, 5 µm, Agilent Technologies, USA) y una columna Zorbax 300SB-C18 (5 µm, 4.6 x 250 mm, 300 Å). La detección de los componentes fue monitoreada mediante absorción en UV a una longitud de onda 230 nm, siguiendo las condiciones de corrida presentadas en la Tabla 1. Los picos que eluyeron fueron colectados, liofilizados y almacenados para posteriormente probar estas muestras en ensayos de actividad biológica.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas utilizadas en las purificaciones de las fracciones II y III, colectadas en la separación del veneno crudo de *Conus ximenes*.

Fracción Individual	Gradiente (Solución B)	Duración (minutos)	Flujo
FII	0%-5%	15	1 ml/min.
FIII	0%-7.5%	20	1 ml/min.

6.3 Cultivo de la línea celular de cáncer

6.3.1 Preparación del material y equipo

El material y equipo, utilizado para trabajar con líneas celulares fue esterilizado y se trabajó todo el tiempo dentro de la campana de flujo laminar, con el propósito de mantener condiciones de trabajo asépticas. El medio utilizado para el cultivo celular (Leibovit'z L-15) fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico antimicótico (Penicilina 10,000 U ml⁻¹, Estreptomocina 10 µg ml⁻¹ y Anfotericina B 5 µg ml⁻¹GIBCO) al 1%.

6.3.2 Descongelamiento y cultivo de la línea celular

La línea celular MDA-MB-231 criopreservada previamente, se descongeló a temperatura ambiente, dentro de la campana de flujo laminar. Luego de ser descongeladas se tomó 1 ml de suspensión celular y se transfirió a un tubo cónicos de 15 ml añadiendo 9 ml de medio Leibovit'z L-15. Se centrifugó el tubo (125 x g durante 5 minutos a 4°C) y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el paquete celular en 1 ml de medio de cultivo Leibovit'z L-15, para finalmente pasarlo a una caja de cultivo celular, junto a 9 ml de Leibovit'z L-15. La caja de cultivo se colocó en una incubadora a temperatura de 37 °C, en una atmósfera libre de CO₂ durante 24 horas. Diariamente se observaron las células en un microscopio invertido (Olympus CKX41), con contraste de fases.

6.3.3 Desprendimiento de la línea celular MDA-MB-231

Al tener aproximadamente 70% de monocapa celular en cultivo sobre el área de la superficie, se procedió a separar las células de la caja de cultivo. Inicialmente, con la ayuda de una pipeta se retiró y descartó el medio de cultivo Leibovitz L-15, se le hizo un lavado breve con 2 ml de PBS con la finalidad de remover trazas de SFB el cual contiene un inhibidor de Tripsina-EDTA. Se removió el PBS de la caja de cultivo y se le adicionaron 2 ml de Tripsina-EDTA. Se observó bajo microscopio invertido durante 10 minutos aproximadamente, hasta que la capa celular se dispersara del fondo de la caja de cultivo.

6.3.4 Subcultivo de las células MDA-MB-231

Para expandir la línea celular MDA-MB-231, se procedió a tomar la capa celular desprendida de la caja de cultivo, adicionándole 8 ml de medio Leibovitz L-15 y homogenizándola por pipeteo. Luego se procedió a pasar 5 ml de la solución homogenizada a una caja de cultivo nueva. Dando como resultado dos cajas de cultivo con 5 ml de solución homogenizada, a las cuales se les sumo 5 ml de medio de cultivo Leibovitz L-15 nuevo. Por último, ambas cajas de cultivo se incubaron a temperatura de 37°C en un atmósfera libre de CO₂ durante 24 horas.

6.3.5 Conteo celular

Para el conteo celular de la línea MDA-MB-231, se preparó una solución que contiene 10 µl de solución homogenizada (resultante del apartado 9.3.4) y 10 µl del colorante azul de tripano. Se colocaron 10 µl de esta mezcla en una cámara de Neubauer, utilizando el método de exclusión de colorante de azul de tripano, las células se contabilizaron por cuadrante y luego se sumó el resultado de cada cuadrante. El total se dividió por el número de cuadrantes que es cuatro, luego se multiplicó por el factor de dilución que es dos, después se multiplicó por 10000 y por último se multiplicó por 10, que es el volumen total de la solución homogenizada. Por último, se obtuvo la concentración celular en un volumen de 10 ml.

6.3.6 Criopreservación de la línea celular MDA-MB-231

La solución homogenizada (resultante del apartado 9.3.4) se transfirió a un tubo cónico de 15 ml. Posteriormente, se centrifugó el tubo a 125 x g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con 1 ml de solución Leibovitz L-15 / DMSO (5%). Por último, se colocó inmediatamente en viales de criopreservación para almacenarlos a -80 °C.

6.3.7 Incubación de células de prueba

Las células MDA-MB-231, que fueron utilizadas en bioensayos se cultivaron en una placa de cultivo de 96 pozos y se adicionaron aproximadamente 5,000 células por pozo. Las células se preincubaron a 37 °C en una atmósfera libre de CO₂ para esperar la adherencia de las células a la placa de cultivo y a tener un 70% de confluencia celular. Posteriormente, estas se incubaron durante 12 horas en medio de cultivo sin suero fetal bovino en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al finalizar estos períodos de incubación, las células son expuestas a las subfracciones a ensayar.

6.4 Bioensayos

6.4.1 Ensayos citotóxicos

Para los ensayos citotóxicos se utilizó una placa de cultivo de 96 pozos. Se adicionaron aproximadamente 5,000 células por pozo, además se agregaron cada una de las fracciones o subfracciones obtenidas por RP-HPLC. El ensayo se realizó por triplicado. Previamente, se calculó la cantidad de células necesarias en total y se realizó una dilución para un volumen de 190 µl por pozo. Las concentraciones de las fracciones o subfracciones usadas se adicionaron por separado en un volumen de 10 µl, para así obtener 200 µl por pozo como volumen final.

Se adicionó como control positivo DMSO al 10%, control negativo 10% de H₂O dd y como blanco, medio de cultivo Leibovitz L-15. La placa de cultivo se incubó a 37 °C en un ambiente libre de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, se realizó la evaluación de la

viabilidad celular utilizando el ensayo de MTS/PMS (*CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, Promega, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. El MTS ((3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5(3-carboximetilfenil))-2(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es un compuesto de tetrazolio y el PMS (metosulfato de fenazina) es un reactivo de acoplamiento de electrones (ATCC, USA). El ensayo MTS/PMS es un método colorimétrico, en el que se mide la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), situada en las mitocondrias celulares de las células metabólicamente activas. Esta enzima reduce el MTS a un producto de formazán, mientras que la cantidad de formazán se mide de acuerdo a las absorbancias en una longitud de onda de 490 nm luego de 1 hora de incubación con la solución MTS/PMS. La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células vivas posterior al tratamiento con las fracciones/subfracciones.

En el análisis estadístico realizado se hizo con la prueba *t* de *student* sobre los datos crudos de las absorbancias entre los tratamientos, suponiendo que los datos son normales. Se consideró que el tratamiento fue significativamente diferente al control negativo cuando el valor de $p < 0.05$.

6.4.2 Efectos de las subfracciones del extracto proveniente de *Conus ximenes* sobre la morfología de las células MDA-MB-231

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo, los dos tipos principales de muerte celular son la apoptosis y la necrosis. Ambos procesos se caracterizan por cambios morfológicos y bioquímicos como se describe en el apartado 2.8. Se caracterizaron los cambios morfológicos producidos por las subfracciones FII.6 y FIII.2 en las células MDA-MB-231. Estas células fueron incubadas como se describe en el apartado 6.3.7. Posteriormente, se probaron las subfracciones que presentaron actividad citotóxica, de forma individual durante 24 horas. Se realizó por triplicado cada tratamiento (subfracciones y controles). Se incluyeron dos controles positivos, PMA 40 μ M como control para determinar apoptosis (Anexo 3) y H₂O₂ 100 μ M para determinar la necrosis. El control negativo fue incubar las células MDA-MB-231 sin adición de un agente externo. Al culminar las 24 horas de exposición las células fueron observadas y

fotografiadas mediante un microscopio invertido (Olympus CKX41), utilizando la técnica de contraste de fases.

6.4.3 Ensayos para la detección de apoptosis, mediante la activación de las caspasas-3 y caspasas-7

La activación de las caspasas es uno de los procesos enzimáticos relacionados directamente con la muerte celular programada. Con la finalidad de evaluar si la disminución de la viabilidad celular por las subfracciones probadas del ceneno de *Conus ximenes* se debe a un evento apoptótico, se usó el reactivo de detección de apoptosis *CellEvent Caspase-3/7 Green* (LifeTechnologies, USA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este reactivo consiste en un péptido de 4 aminoácidos (DEVD) conjugado a un ácido nucleico de fijación de colorante. Después de la activación de la caspasa-3 o caspasa-7 en células apoptóticas, el péptido DEVD se escinde, lo que permite que el fluoróforo se una al ADN y produzca una emisión a una longitud de onda de 530 nm.

Para este bioensayo, células fueron incubadas como se describe en el apartado 6.3.7. Posteriormente, se adicionaron los tratamientos (subfracciones individuales que presentaron actividad citotóxica) por triplicado. El tiempo de exposición de las células MDA-MB-231 junto a las subfracciones fue de 24 horas, 12 horas, 8 horas y 4 horas. Se agregó como control positivo PMA 40 μ M (Anexo 3) y control negativo 10% H₂O dd.

6.5 Citometría de flujo para la detección de necrosis

El yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich, USA), es un compuesto fluorogénico de intercalación nuclear en células necróticas. Este se diluyó en H₂O dd a una concentración de 100 μ g/ml (Vermes, Haanen y Reutelingsperger, 2000). Esta tinción se llevó a cabo para la detección y cuantificación de células MDA-MB-231 en necrosis, luego de ser expuestas a las subfracciones con actividad citotóxica.

Las células que se utilizaron para este bioensayo fueron incubadas de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.3.7. Posteriormente, estas células se expusieron a las subfracciones de interés por triplicado, durante 24 horas. Se agregó como control positivo H_2O_2 100 μM y como control negativo se consideró a las células MDA-MB-231 incubadas sólo en medio de cultivo Leibovitz L-15. Al concluir el tiempo de incubación predeterminado, se pasó el medio de cultivo a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se hizo un lavado con 100 μl de PBS, añadiéndose al mismo tubo y se adicionó 100 μl de tripsina-EDTA. Se observó bajo microscopio invertido durante 10 minutos aproximadamente, hasta que la monocapa celular haya quedado desprendida de la placa de cultivo. Las células se resuspendieron en 200 μl de medio de cultivo y se homogenizaron por pipeteo, las células se pasaron al tubo eppendorf 1.5 ml junto al medio de cultivo y PBS. Esta suspensión celular, se centrifugó a 800 x g por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular con 500 μl de solución PBS-SFB (1%) para finalmente, adicionar 5 μl de yoduro de propidio. Las células se tiñeron durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Posterior a la incubación, las muestras se mantuvieron en hielo y se procesaron aproximadamente 25,000 células MDA-MB-231, en el citómetro de flujo Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies, USA). Emitiendo una fluorescencia con una longitud de onda de 574/26 nm.

6.6 Cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa con detector UV de arreglo de diodos (HPLC-RP-DAD)

Las fracciones previamente separadas y liofilizadas, se resuspendieron en solución A (Anexo 1), para luego ser analizadas en diferentes longitudes de onda mediante HPLC-RP con detector UV-DAD, siguiendo las condiciones de corrida presentadas en la Tabla 2. Se utilizó un cromatógrafo Agilent Infinity 1200 con detector de arreglo de diodos (DAD) (Agilent Technologies, USA) y una columna Zorbax 300SB-C18, 5 μm , 4.6 x 250 mm, 300 Å (Agilent Technologies, USA) para la separación cromatográfica.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas utilizadas en la separación de las subfracciones FII.6 y FIII.2 respectivamente, mediante RP-HPLC-DAD.

Fracción Individual	Gradiente (Solución B)	Duración (minutos)	Flujo
FII.6	0%-7.5%	20	1 ml/min.
FIII.2	0%-7.5%	20	1 ml/min.

Capítulo 7. Resultados

7.1 Extracción de veneno crudo

Para la extracción de veneno se trabajó con caracoles de la especie *C. ximenes* recolectados en Bahía de los Ángeles en 2013. Sin embargo al no variar los cromatogramas entre venenos colectados en diferentes épocas y/o años, se decidió comenzar con un veneno, previamente extraído y liofilizado en 2010. Dicho veneno se purificó en 13 fracciones por HPLC-RP.

7.2 Separación por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC)

Se recolectaron 13 fracciones de la separación cromatográfica del extracto de los ductos venenosos (veneno crudo) de *Conus ximenes*, que fueron nombradas en números romanos. El resultado de esta separación se muestra en la Figura 10

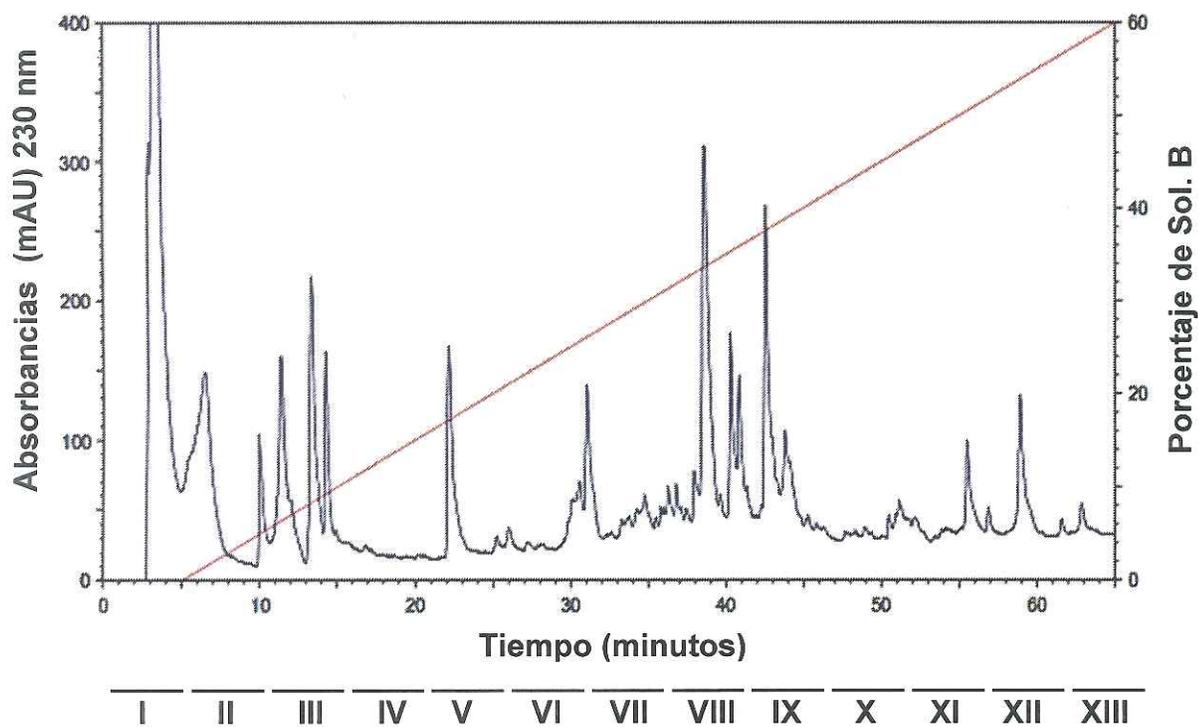


Figura 10. Cromatograma obtenido del extracto de los aparatos venenosos (veneno crudo) de *Conus ximenes*. Las fracciones colectadas se especifican en números romanos.

7. 3 Ensayos citotóxicos

7.3.1 Ensayo citotóxico de las 13 fracciones de veneno total de *Conus ximenes*

Las 13 fracciones obtenidas en la separación del veneno crudo, se llevaron a una concentración de 50 µg/ml para realizar ensayos de citotoxicidad con fracciones de veneno total. En la Figura 11, se observan que las fracciones I, II, III y IV disminuyeron la supervivencia celular a un 53%, 52%, 52% y 40% respectivamente, siendo las de mayor actividad citotóxica en las células MDA-MB-231. Sin embargo, se decidió continuar trabajando sólo con las fracciones II y III, ya que en la fracción I fue colectado el frente del solvente mayoritariamente. La fracción IV se descartó debido a la poca definición de los picos a una longitud de onda de 230 nm como se observa en la Figura 10.

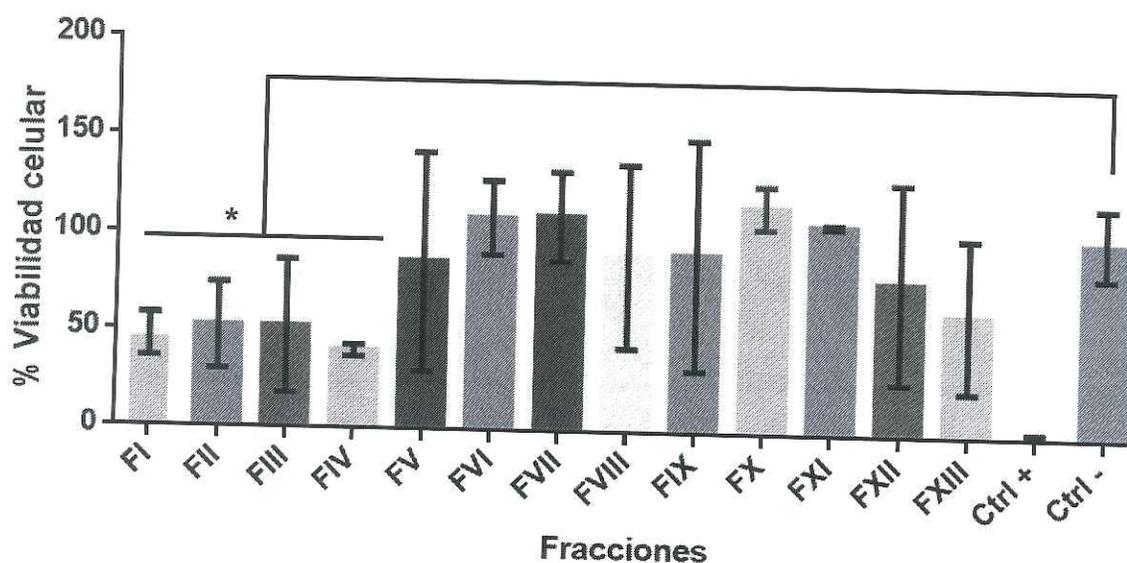


Figura 11. Efecto de las 13 fracciones obtenidas en la purificación por HPLC-RP del veneno total de *C. ximenes*. Donde el Ctrl + significa control positivo (DMSO al 10%) y Ctrl - significa control negativo (H_2O dd estéril). Cada fracción fue agregada a una concentración de 50 µg/ml.

Las barras representan los valores obtenidos para la viabilidad celular. Las fracciones marcadas con un asterisco, presentaron diferencias significativas, respecto a su control negativo ($p < 0.05$).

De acuerdo a estos resultados, se procedió a la purificación de la fracción II y III, individualmente por RP-HPLC, utilizando el método descrito en el apartado 6.2.1.

7.4 Purificación por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC) de la fracción II y III, individualmente

7.4.1 Purificación de la fracción II

Se purificó la fracción II obteniéndose 9 subfracciones. Estas se nombraron FII.N, donde FII significa que corresponden a la fracción II individual y N es el número de cada subfracción. En el cromatograma que se muestra en la Figura 12, se puede observar las 9 subfracciones obtenidas de la fracción II.

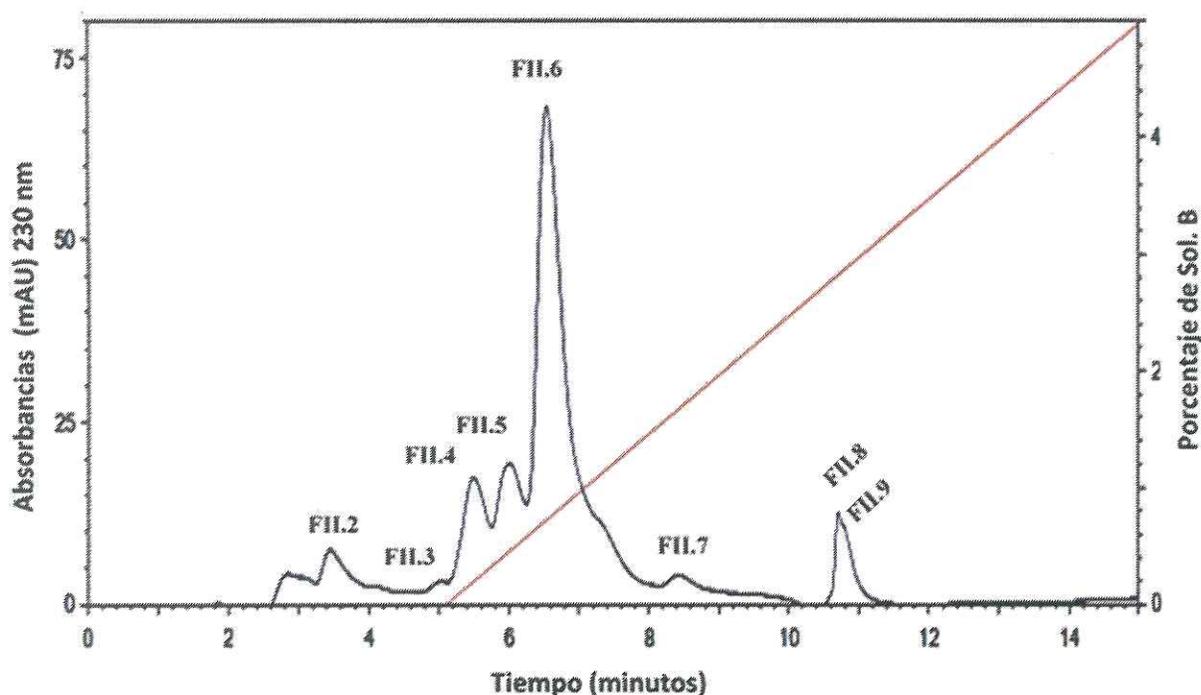


Figura 12. Cromatograma de la fracción II, correspondiente a los minutos 5-10 de la purificación de veneno total de *Conus ximenes*.

7.4.2 Purificación de la fracción III

En la Figura 13, se observan las 3 subfracciones obtenidas de la purificación de la fracción III. Estas se nombraron FIII.N, donde FIII significa que corresponden a la fracción III individual y N es el número de cada subfracción.

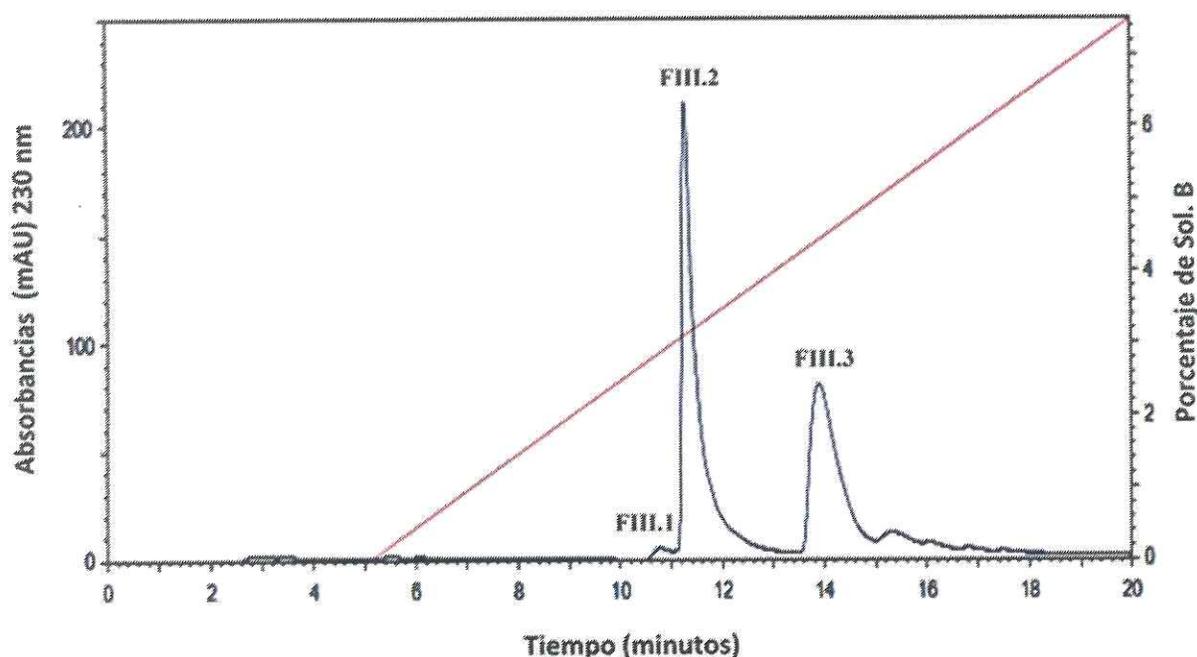


Figura 13. Cromatograma de purificación de la fracción III individual correspondiente a los minutos 10-15 de la corrida de veneno crudo de *Conus ximenes*.

7.5 Ensayos citotóxicos con las subfracciones de las fracción II y III

7.5.1 Ensayo citotóxico en las células MDA-MB-231 con las subfracciones FII.6 y FIII.2, individualmente

Se realizó un ensayo citotóxico con las subfracciones obtenidas y correspondientes a las fracciones II y III. En ensayos preliminares las subfracciones FII.6 y FIII.2 mostraron gran disminución de la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231, además de que representan los picos mayoritarios, de mejor definición y mayor cantidad colectada en las purificaciones. Se decidió continuar trabajando con las mencionadas subfracciones.

Para el ensayo citotóxico de la subfracción FII.6, ésta fue adicionada en una concentración de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo. En la Figura 14A, se muestra que la subfracción FII.6 disminuyó en un 31% la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231. La subfracción FIII.2, se probó a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo disminuyendo la viabilidad celular en un 37% de la línea celular MDA-MB-231 (Figura 14B). Ambas subfracciones mostraron diferencias significativas, respecto al control negativo ($p < 0.05$).

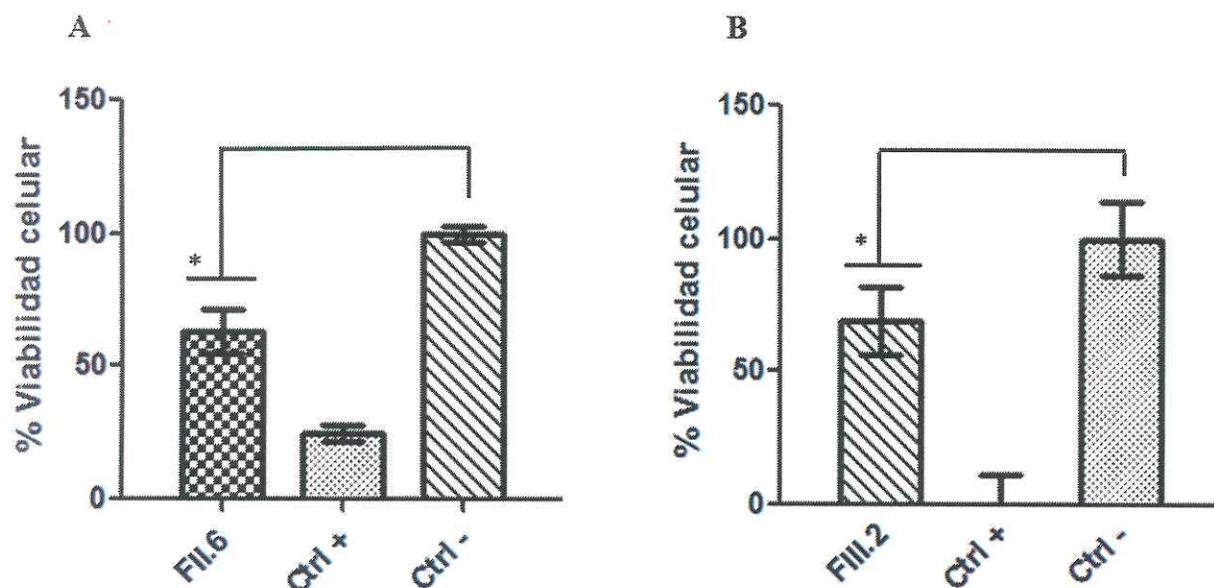


Figura 14. Efecto de las subfracciones FII.6 y FIII.2 en las células MDA-MB-231. Donde el Ctrl + significa control positivo (DMSO al 10%) y Ctrl - significa control negativo (10% de H₂O dd estéril). Panel A, efecto citotóxico obtenido de la subfracción FII.6 y panel B, efecto citotóxico de la subfracción FIII.2.

7.5.2 Efectos de las subfracciones FII.6 y FIII.2, sobre la morfología de las células MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231 se expusieron a un 4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo de la subfracción FII.6 y un 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo de la subfracción FIII.2, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.4.2. En la Figura 15E (control), se observan las células MDA-MB-231 con su morfología alargada, confluentes y formando parte de la monocapa celular, sin cambios morfológicos aparentes. Las células cancerígenas expuestas con las subfracciones FII.6 (Figura 15A) y FIII.2 (Figura 15B) presentaron cambios morfológicos significativos ya que no presentaron su forma alargada típica, con una reducción del tamaño celular presentando una forma esférica u ovalada y globulación de la membrana. Estos cambios morfológicos que sugieren la muerte celular asociada a apoptosis ya que la morfología es muy similar a las células tratadas PMA (control positivo) que ocasiona apoptosis (Figura 15D). Por último, morfológicamente se descarta necrosis, debido a que las células no presentaron una lesión celular física, fragmentación del núcleo y cromatina y ruptura

de la membrana plasmática. En la Figura 15C, se observan dichas características que en comparación con las células tratadas con las subfracciones, no son evidentes.

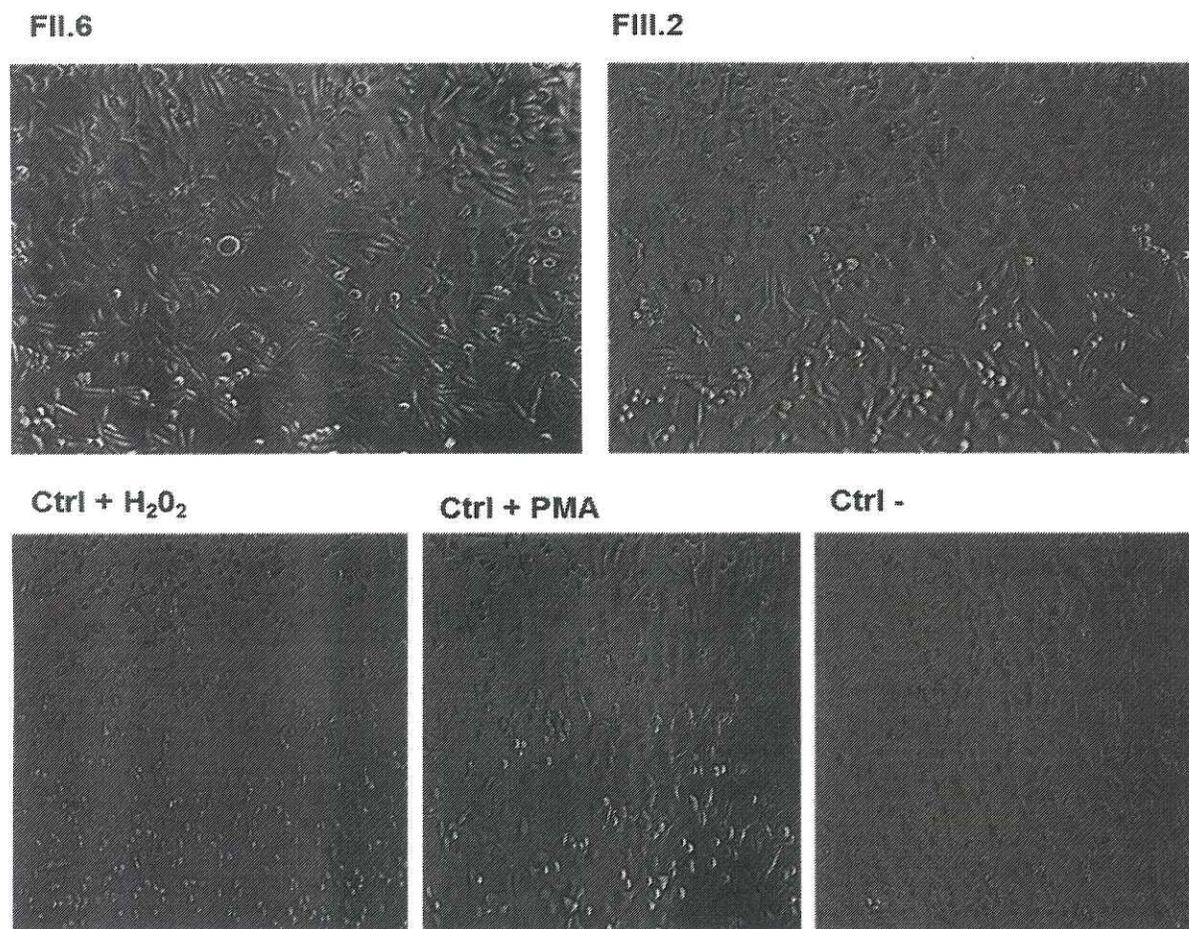


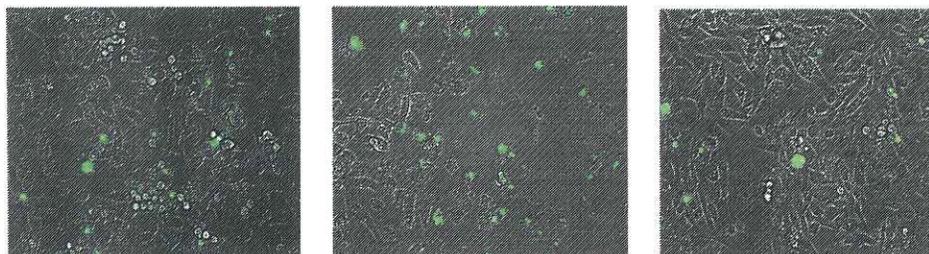
Figura 15. Cambios morfológicos de las células tumorales MDA-MB-231 expuestas a las subfracciones FII.6 y FIII.2, individualmente. Células MDA-MB-231 tratadas con 4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la subfracción FII.6. Células MDA-MB-231 tratadas con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la subfracción FIII.2. Control positivo para necrosis H_2O_2 100 μM . Control positivo para apoptosis PMA 40 μM . Control negativo, células MDA-MB-231 sin ningún tratamiento. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo 20X por un microscopio invertido (Olympus CKX41), con contraste de fases.

7.5.3 Detección de apoptosis con la subfracción FII.6 y FIII.2, mediante la activación de las caspasas-3 y caspasas-7

Debido a que la viabilidad de las células de la línea MDA-MB-231 fue afectada por las subfracciones FII.6 y FIII.2 de *Conus ximenes* y a que la morfología de éstas sugiere que las subfracciones inducen su muerte celular por apoptosis, se realizaron experimentos para evaluar este proceso. Se utilizó para la detección de apoptosis *CellEvent Caspase-3/7 Green* (LifeTechnologies, USA) con la finalidad de confirmar los hallazgos

anteriormente mencionados. Para esto, las células MDA-MB-231 se expusieron a una concentración de 4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo de la subfracción FII.6 y a un 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo de la subfracción FIII.2, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.4.3. Cada pozo se dividió en 5 campos microscópicos de los cuales se fotografiaron y contabilizaron las células que emitieron fluorescencia. Se promedió el número de células de los 5 campos analizados por tratamiento. Se observó una mayor cantidad de células marcadas respecto a su control negativo a las 24 horas de exposición para la subfracción FII.6. El promedio de células apoptóticas fue igual a las 24 y 12 horas de exposición (13 células apoptóticas/campo) como se observa en la Figura 16. Mientras que para la subfracción FIII.2, el número de células apoptóticas a las 24 horas fue de 30 células/campo (Figura 17). Como se esperaba para ambos experimentos, el control negativo mostró un promedio de sólo 4 células en apoptosis. Estos resultados confirman que las subfracciones FII.6 y FIII.2 del veneno de *Conus ximenes* contiene moléculas capaz de inducir una muerte celular por apoptosis en las células tumorales de la línea MDA-MB-231.

24 horas



12 horas

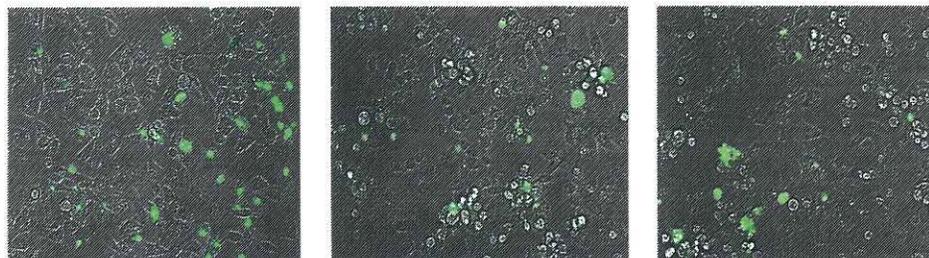
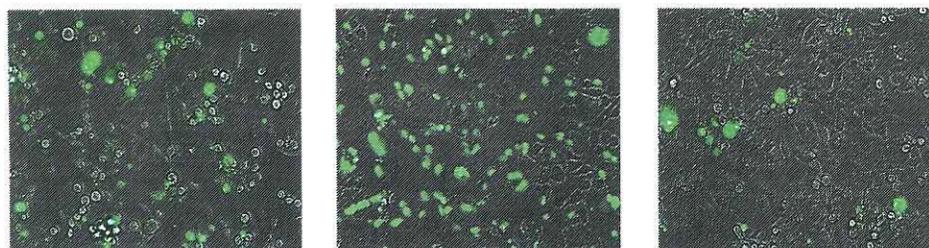
Control
positivoControl
negativo

Figura 16. Células MDA-MB-231 apoptóticas a las 24 y 12 horas de exposición con la subfracción Fil.6, control positivo (PMA 40 μ M con 24 horas de exposición) y control negativo (Células sin agente apoptótico, incubadas durante 24 horas). Imágenes tomadas con el microscopio de epifluorescencia EVOS®FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies, USA) en una longitud de onda de 530nm, con un objetivo de 20X.

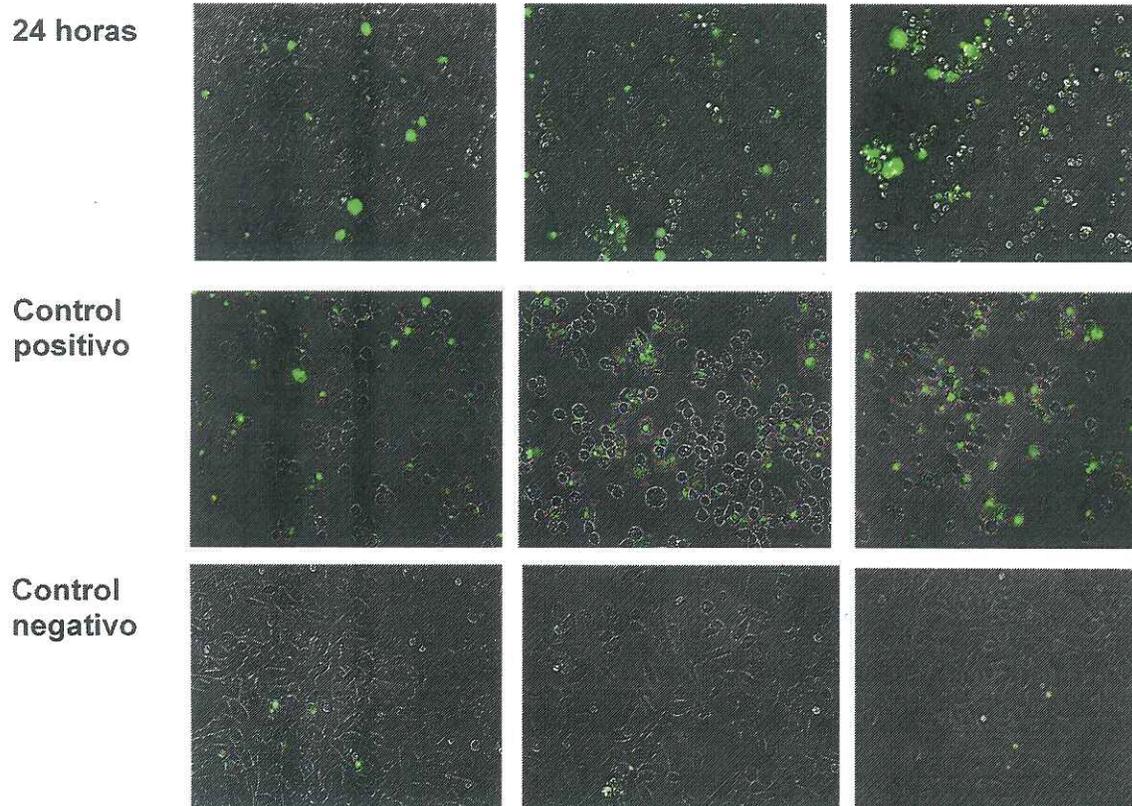


Figura 17. Células MDA-MB-231 apoptóticas a las 24 horas de exposición con la subfracción FIII.2, control positivo (PMA 40 μ M con 24 horas de exposición) y control negativo (Células sin agente apoptótico, incubadas durante 24 horas). Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia EVOS®FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies, USA) en una longitud de onda de 530nm, con un objetivo de 20X

7.6 Citometría de flujo para la detección de necrosis en las células MDA-MB-231, expuestas a las subfracciones FII.6 y FIII.2

Los resultados del análisis por citometría de flujo demuestran que las subfracciones FII.6 y FIII.2, presentaron porcentajes bajos de muerte celular por necrosis. Las células MDA-MB-231 tratadas con FII.6, mostraron un 8.02% de células necróticas (Figura 18A). Mientras que las células tratadas con la subfracción FIII.2, presentaron un 6.05% de muerte celular por necrosis (Figura 18B). El control positivo mostró un 92.97% y el control negativo un 12.16% (Figura 18C y 18D). Estos resultados demuestran que la muerte celular por necrosis acontecida en las células MDA-MB-231 tratadas con las subfracciones FII.6 y FIII.2 no se debe al tratamiento sino a la muerte celular que normalmente ocurre al trabajar con cultivo de células.

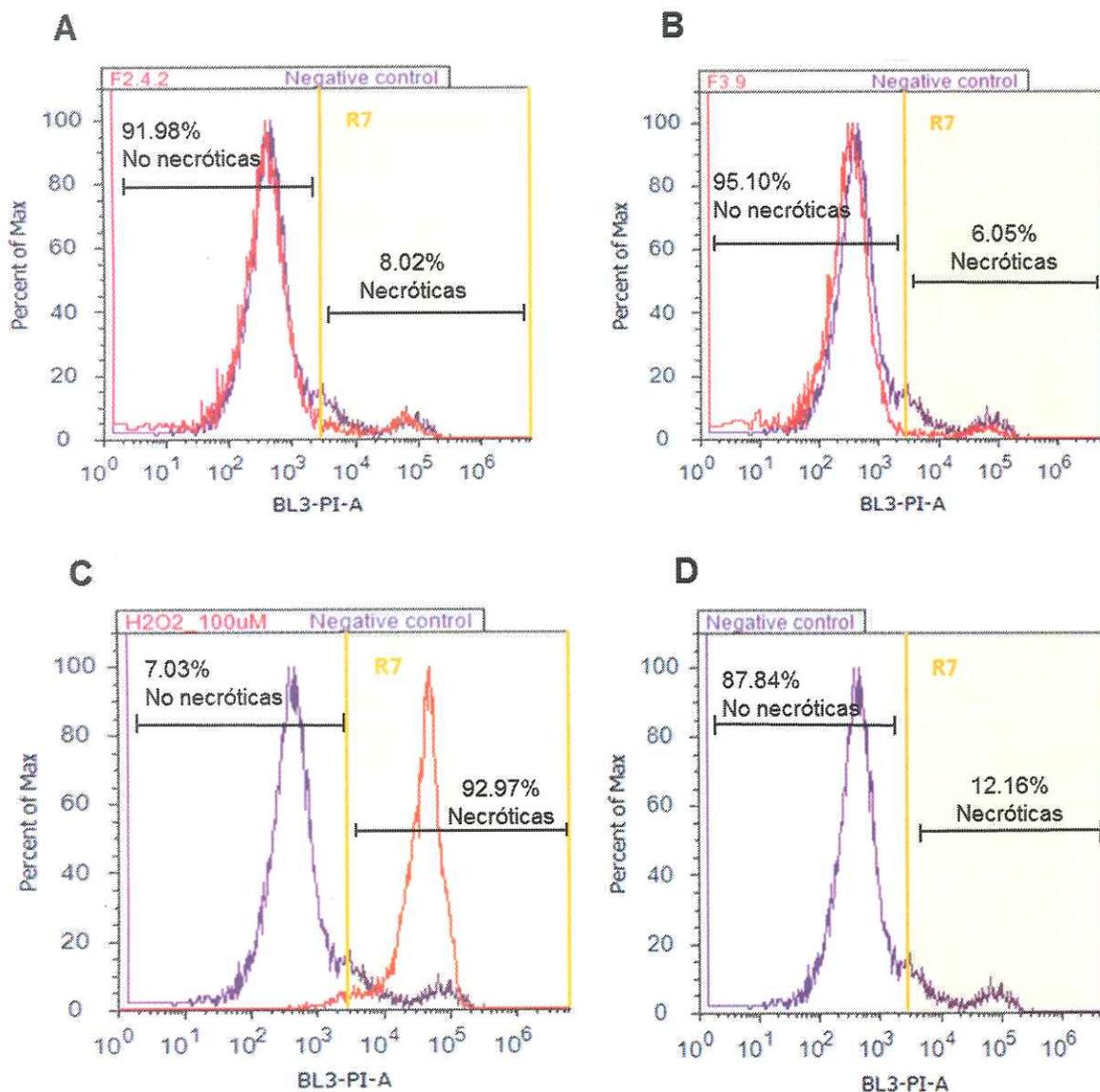


Figura 18. Células MDA-MB-231, teñidas con yoduro de propidio. (A) Células tratadas con la subfracción FII.6. (B) Células tratadas con la subfracción FIII.2. (C) Control positivo para necrosis (H_2O_2 , 100 μM). (D) Control negativo. (R7: células necróticas).

7.7 Cromatografía de alto desempeño de fase reversa con detector de arreglo de diodos (RP-HPLC-DAD)

En la figura 19 y 20, se presentan los cromatogramas de la purificación de las subfracciones FII.6 y FIII.2 a 220 nm y se presentan asimismo, los espectros de absorción de 200 a 350 nm del pico con más señal medidos con detector de UV arreglo de diodos (DAD). Los analitos que eluyeron a un tiempo de retención de 6.50 minutos (FII.6) y 12.80

minutos (FIII.2), presentaron máximo de absorción a los 250 nm de longitud de onda. Estos espectros indican que las subfracciones FII.6 y FIII.2, presentan una sola molécula la cual absorbe mayoritariamente a la longitud de onda de 250 nm.

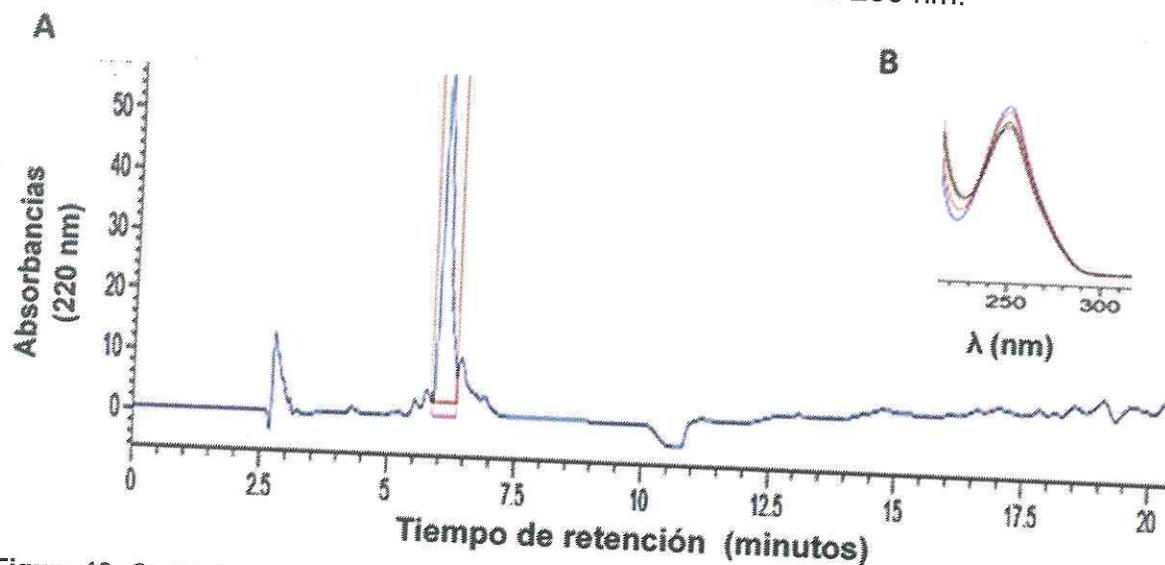


Figura 19. Cromatograma obtenido de la purificación de la subfracción FII.6 por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC), junto a su respectivo espectro generado con detector de arreglo de diodos (DAD). (A) Cromatograma de la subfracción FII.6. (B) Espectro generado por DAD de la subfracción FII.6 con absorbancia mayoritaria detectada a 250 nm.

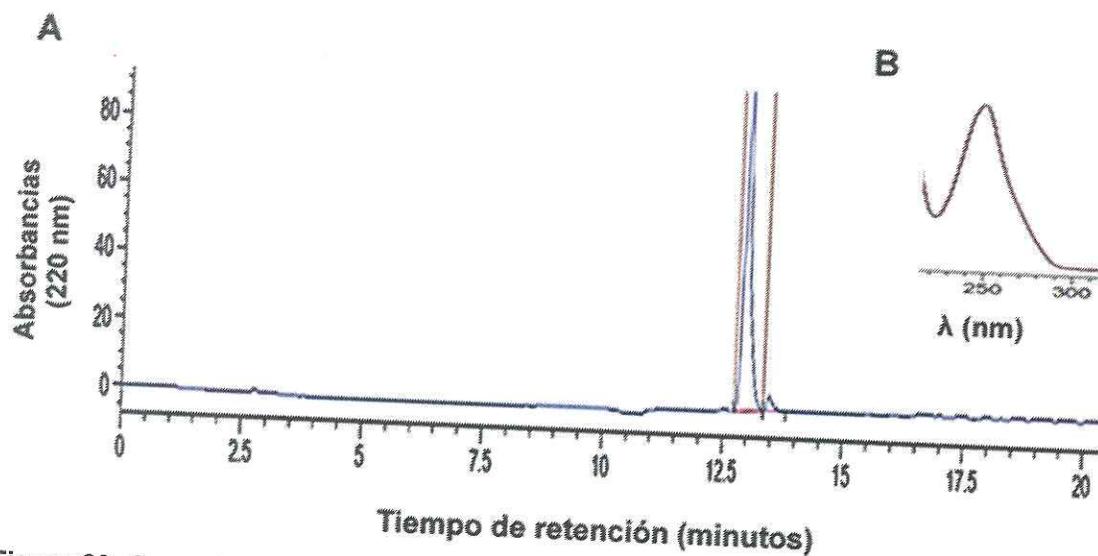


Figura 20. Cromatograma obtenido de la purificación de la subfracción FIII.2 por cromatografía de alto desempeño de fase reversa (RP-HPLC), junto a su respectivo espectro generado con detector de arreglo de diodos (DAD) (A) Cromatograma de la subfracción FIII.2. (B) Espectro generado por DAD de la subfracción FIII.2 con absorbancia mayoritaria detectada a 250 nm.

Capítulo 8. Discusión

El veneno crudo proveniente de los caracoles marinos *Conus ximenes*, fue separado en 13 fracciones mediante cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa (HPLC-RP). Se observó la separación y coelución de los analitos en la separación cromatográfica lo que indica un número alto de componentes que absorben a 230 nm. Esta cantidad de componentes separados dentro del veneno crudo de *Conus ximenes* concuerdan con lo reportado por Vianna y colaboradores en 2005, donde reporta que dentro del veneno de los *Conus* existen hasta 200 moléculas diferentes.

Se realizaron ensayos de citotoxicidad, probando las 13 fracciones de manera individual en las células de cáncer de mama MDA-MB-231. Las fracciones I, II, III y IV, mostraron disminución de la viabilidad celular significativa de un 53%, 52%, 52% y 40% respectivamente a la concentración probada de 50 µg/ml. La fracción I en su mayoría pertenece al frente del solvente, mientras que la fracción IV, represento una mezcla de analitos al no presentarse una resolución clara entre picos en el tiempo de colecta de esta fracción, por lo que se decidió no trabajar con estas fracciones.

Los resultados del bioensayo indican que en las fracciones II y III separadas del veneno crudo de *Conus ximenes*, existen al menos un componente con actividad citotóxica hacia la línea celular MDA-MB-231. No obstante, se debe tomar en consideración que fueron estudiadas fracciones del veneno crudo, que no son compuestos puros. Esto podría sugerir que los metabolitos que puedan estar induciendo la muerte celular podrían estar a concentraciones muy pequeñas, siendo así los compuestos en este estudio podrían tener un efecto citotóxico aun mayor.

Existen pocos informes que describen las acciones citotóxicas del veneno de los *Conus* en células eucariotas (Abdel-Rahman *et al.*, 2013), por lo que los resultados de este trabajo demuestran la relevancia potencial que tiene el veneno de los *Conus* en el tratamiento en contra del cáncer.

Al purificar mediante RP-HPLC las fracciones II y III, se aislaron 9 subfracciones y 3 subfracciones, respetivamente. Se continuó trabajando con las subfracciones nombradas FII.6 y FIII.2, debido a que en ensayos preliminares (Información no mostrada) estas subfracciones presentaron mayor efecto citotóxico sobre las células MDA-MB-231. Además estas subfracciones representan los picos mayoritarios y de mejor definición en las purificaciones realizadas por RP-HPLC. La subfracción FII.6 a una concentración de 4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo, presentó una disminución de la viabilidad celular en un 31%. Mientras que la subfracción FIII.2 disminuyó un 37% la viabilidad celular en las células MDA-MB-231 a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pozo. Por lo tanto, al purificar las fracciones se obtuvo mayor disminución de la viabilidad celular. Se debe tomar en consideración que se probaron cantidades menores pero más puras de metabolito de interés en comparación con las utilizadas en el ensayo de citotoxicidad anterior, lo cual podría evidenciar un potencial efecto antitumoral.

Se realizó un análisis morfológico de las células expuestas a las subfracciones FII.6 y FIII.2 de *Conus ximenes* en las condiciones y cantidades descritas en el apartado 9.4.2. Claramente se observaron cambios morfológicos, como la pérdida de la forma alargada típica, encogimiento de su tamaño celular y presentaron una forma esférica y globulación de la membrana, que sugieren el desarrollo de la muerte celular por apoptosis (Saraste y Pulkki, 2000).

Desde el descubrimiento de la inducción de la apoptosis como tratamiento potencial en contra del cáncer, muchas investigaciones se han dirigido al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la apoptosis (Kiaris y Schally, 1999). Al conocer que la subfracción FII.6 y FIII.2, presentaron efectos citotóxicos en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, se realizaron ensayos para conocer la especificidad del modo de acción de estas subfracciones. Para esto, se realizó el ensayo para la detección de apoptosis mediante fluorescencia, específicamente la activación de las caspasas-3 y caspasas-7. Como resultado, pudimos observar que la subfracción FII.6 presentó mayor número de células apoptóticas a las 24 y 12 horas de exposición con 13 células apoptóticas/campo, en comparación con las 4 células apoptóticas/campo en el control negativo. Mientras que para las células tratadas con la subfracción FIII.2, el mayor de

número de células en apoptosis fue a las 24 horas de exposición con 30 células apoptóticas/campo y el control negativo presentó 5 células apoptóticas/campo. La activación de las caspasas solo se observan en células en vías de apoptosis, por lo que estos resultados indican que las subfracciones FII.6 y FIII.2 inducen muerte celular mediante apoptosis en las células de cáncer de mama.

En contraste con la apoptosis, la necrosis no es un proceso celular activo y no requiere energía. La inducción de necrosis, podría proporcionar un enfoque eficaz en el tratamiento del cáncer, sin embargo, los fármacos inductores de necrosis presentan toxicidad superior versus fármacos inductores de apoptosis (Kiaris y Schally, 1999). De acuerdo a los ensayos preliminares la vía de acción de la subfracción FII.6 y FIII.2 es la muerte celular por apoptosis, no obstante es necesario examinar la muerte celular por necrosis. Por esto las células MDA-MB-231 tratadas con estas subfracciones se analizaron mediante citometría de flujo. Esto con el objetivo de detectar y cuantificar las células que hayan sufrido necrosis. De acuerdo a los resultados obtenidos, las células tratadas con las subfracciones FII.6 y FIII.2, individualmente, presentaron porcentajes bajos de muerte celular por necrosis en comparación con su grupo control. Las células tratadas con la subfracción FII.6, mostraron un 8.02% de células necróticas. Mientras que las células tratadas con la subfracción FIII.2, presentaron un 6.05% de muerte celular por necrosis. Estos resultados representan porcentajes bajos, incluso en comparación con el control negativo, el cual tuvo un 12.16% de células necróticas. Lo que demuestra que la muerte celular por necrosis no se debe al tratamiento con las subfracciones, sino a la muerte normal que ocurre en cultivo celular de células.

La disminución de la viabilidad celular en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 expuestas a las fracciones probadas en este trabajo se debe a la muerte celular por apoptosis. La administración de pequeñas dosis de las subfracciones FII.6 y FIII.2 de *Conus ximenes* y a través de la activación de las caspasa-3 y caspasa-7 indican este proceso. No obstante, estos resultados no proveen ninguna evidencia respecto al mecanismo en que ambas subfracciones inducen apoptosis.

La pregunta importante es: ¿Qué compuesto o compuestos están induciendo la muerte celular por apoptosis y de que naturaleza son? Se analizaron las subfracciones mediante cromatografía por capa fina. La cromatografía por capa fina (CCF) es una técnica de separación y de análisis cualitativo de gran eficacia y precisión (Sherma y Fried, 2003). Para este estudio se utilizó como revelador ninhidrina (0.75 g ninhidrina en 50 ml n-butanol y 1.5 ml ácido acético), que se utiliza como revelador de proteínas y compuestos peptídicos, al reaccionar con aminas primarias, secundarias y terciarias, amino azúcares y aminoácidos (Pirrung, 2007). Los resultados fueron negativos para ambas subfracciones, ya que no se presentaron marcas visibles (Información no mostrada). Por lo tanto existe la posibilidad de que los compuestos inductores de apoptosis no fueran péptidos. Las características de absorción de las fracciones utilizadas medida en línea durante la separación cromatográfica (RP-HPLC-DAD) es otra evidencia que indica que los compuestos activos no tiene un carácter peptídico. Se detectó un máximo de absorción a 250 nm de longitud de onda. Los enlaces peptídicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda entre los 220 nm a 230 nm (Cohen y Gilby, 2002). Asimismo, se descarta la presencia de aminoácidos aromáticos, ya que estos absorben mayormente a los 295 nm, 275 nm y 260 nm para triptófano, tirosina y fenilalanina, respectivamente (Randall *et al.*, 1990)

Otro resultado que indica que en las subfracciones FII.6 y FIII.2 no se presentan péptidos fue que al analizar las muestras por espectrometría de masas (MS) mediante ionización por electrospray (ESI), ambas subfracciones no pudieron ser ionizadas. Los compuestos que tienen grupos amino como los péptidos, son fácilmente ionizados bajo condiciones ácidas siendo estas condiciones adecuadas para análisis por ESI/MS (Santa, 2013). Se utilizó un espectrómetro de masas Agilent 6530 (Accurate-Mass Q-TOF LC/MS System, Agilent, USA) y las muestras fueron resuspendidas en una solución de 50% ACN / 50% H₂O dd + 0.1% ácido fórmico. Ya que no se pudo ionizar a las muestras por este método se propone que las moléculas de interés no tienen un carácter peptídico (Información no mostrada). El siguiente paso es dilucidar la naturaleza de estas moléculas y su identificación.

Por otro lado, la apoptosis es una forma de muerte celular que permite la eliminación de células no deseadas sin daños en el microambiente celular, la cual es un factor clave en el desarrollo y progresión del cáncer (Russo *et al.*, 2006). Actualmente, alteraciones en la apoptosis de células cancerígenas están siendo estudiadas a detalle, ya que la apoptosis es considerada una de las vías principales para fármacos terapéuticos en contra del cáncer (Hu y Kavanagh, 2003). Finalmente, tomando todos los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten defender la hipótesis que en el veneno del caracol marino *Conus ximenes* existe un compuesto o compuestos con actividad antitumoral y apoptótica en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

Capítulo 9. Conclusiones

- ❖ En las subfracciones FII.6 y FIII.2 obtenidas de *Conus ximenes*, existen componentes que ejercen un efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, disminuyendo la viabilidad celular en 31% y 37%, respectivamente
- ❖ Las subfracciones FII.6 y FIII.2 indujeron cambios morfológicos representativos de muerte celular por apoptosis y activación de las caspasas-3 y caspasas-7, demostrando que la actividad citotóxica de las subfracciones está asociada con la apoptosis en las células de cáncer de mama MDA-MB-231.
- ❖ Los resultados negativos de CCF, características de absorción y a la ausencia de ionización mediante ESI/MS, estos indican que la naturaleza del compuesto o compuestos de interés en las subfracciones FII.6 y FIII.2 no son de naturaleza peptídica.

Capítulo 10. Perspectivas

- ❖ Determinar la proporción de células vivas/muertas de la línea MDA-MB-231, por apoptosis mediante citometría de flujo.
- ❖ Emplear otros marcadores de muerte celular, para determinar en qué momento inicia la apoptosis y su ruta de activación.
- ❖ Evaluar el efecto de las subfracciones sobre células no inmortalizadas, así como en otras líneas celulares de cáncer de mama o en un modelo murino de cáncer de mama.
- ❖ Elucidación estructural del analito de interés dentro de las subfracciones FII.4.2 y FIII.9, individualmente, mediante por resonancia magnética nuclear.
- ❖ Realizar estudios preclínicos con el analito sintético.

Referencias bibliográficas

- Abdel-Rahman, M.A, Abdel-Nabi, I.M., El-Naggar, M.S., Abbas, O.A, and Strong, P. N. (2013). Conus vexillum venom induces oxidative stress in Ehrlich's ascites carcinoma cells: an insight into the mechanism of induction. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 19(10), 1–10. doi:10.1186/1678-9199-19-10
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W. and de Witte, P.M. (2002). Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(3), 221–41.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2006) *Introducción a la Biología Celular* (2ª ed.) Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.
- Amaravadi, R.K. and Thompson, C.B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), 7271–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1595
- Armijo, J.A., De las Cuevas, I. y Adín, J. (2000). Canales iónicos y epilepsia. *Revista de Neurología*, 30(Suplemento 1), 25–41.
- Becker, S. and Terlau, H. (2008). Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), 1–9. doi:10.1007/s00253-008-1385-6
- Bezabeh, T., Mowat, M.R., Jarolim, L., Greenberg, H. and Smith, I. C. (2001). Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using ¹H NMR spectroscopy. *Cell Death and Differentiation*, 8(3), 219–24. doi:10.1038/sj.cdd.4400802
- Buczek, O., Bulaj, G. and Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 62(24), 3067–79. doi:10.1007/s00018-005-5283-0
- Cailleau, R., Olive, M. and Cruciger, Q. V. J. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 14(11), 911–915.
- Cohen, S.A. and Gilby, A. (2002). Detection and analysis of protein by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. In: Gooding, K.M. and Regnier, F.E. (Eds.). *HPLC of biological macromolecules, second edition, revised and expanded* (pp. 712-714). Marcel Dekker, Inc.
- Cuddapah, V. A. and Sontheimer, H. (2011). Ion channels and transporters in cancer . 2 . Ion channels and the control of cancer cell migration. *American Journal Physiology: Cell Physiology*, 301, 541–549. doi:10.1152/ajpcell.00102.2011.

- Curtis, H., Schnek, A., Masarinni, A. y Barnes, S. (2008). *Curtis. Biologia* (Editorial., pp. 230–247).
- Essack, M., Bajic, V.B. and Archer, J.A. . (2012). Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine Drugs*, 10(6), 1244–65. doi:10.3390/md10061244
- Fedosov, A.E., Moshkovskii, S.A., Kuznetsova, K.G., and Olivera, B.M. (2012). Conotoxins: From the biodiversity of gastropods to new drugs. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 6(2), 107–122. doi:10.1134/S1990750812020059
- Fusetani, N. and Kem, W. (2009). *Marine toxins as research tools* (p. 259).
- Hanahan, D. and Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hong, T.B., Rahumatullah, A., Yogarajah, T., Ahmad, M. and Yin, K. B. (2010). Potential effects of chrysin on MDA-MB-231 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(3), 1057–69. doi:10.3390/ijms11031057
- Hu, W. and Kavanagh, J. J. (2003). Reviews Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The Lancet Oncology*, 4(12), 721–729.
- Kaas, Q., Westermann, J.C. and Craik, D.J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 55(8), 1491–509. doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.002
- Key, T.J., Verkasalo, P.K. and Banks, E. (2001). Reviews Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*, 2(3), 133–140.
- Kiaris, H. and Schally, A.V. (1999). Apoptosis Versus Necrosis: Which Should Be the Aim of Cancer Therapy? *Experimental Biology and Medicine*, 221(2), 87–88. doi:10.3181/00379727-221-44388
- Knaul, F.M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A. y Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*, 51(Suplemento 2), s335–s344. doi:10.1590/S0036-36342009000800026
- Ko, J.H., Ko, E.A, Gu, W., Lim, I., Bang, H. and Zhou, T. (2013). Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. *Molecular Cancer*, 12(1), 106. doi:10.1186/1476-4598-12-106
- Kunzelmann, K. (2005). Ion channels and cancer. *The Journal of Membrane Biology*, 205(3), 159–73. doi:10.1007/s00232-005-0781-4

- Lewis, R.J., Schroeder, C.I., Ekberg, J., Nielsen, K.J., Loughnan, M., Thomas, L., Adams, D.A., Drinkwater, R., Adams, D.J., and Alewood, P.F. (2007). Isolation and structure-activity of mu-conotoxin TIIIA, a potent inhibitor of tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium channels. *Molecular Pharmacology*, 71(3), 676–85. doi:10.1124/mol.106.028225
- McIntosh, J. M., Santos, A. D. and Olivera, B. M. (1999). Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 59–88. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.59
- Moro, M.A., Hurtado, O. y Pascual, D. (2009). Aspectos moleculares de la interacción de los fármacos con las dianas farmacológicas. En: Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A. y Portolés, A. *Velázquez, Farmacología básica y clínica*. (pp. 71-95). Editorial Médica Panamericana.
- Norton, R.S. and Olivera, B.M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 48(7), 780–98. doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.022
- Olivera, B.M. (2002). CONUS VENOM PEPTIDES: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 25–47. doi:10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150424
- Olivera, B.M. (2006). Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31173–31177. doi:10.1074/jbc.R600020200
- Organización Mundial de la Salud-OMS (2014). *¿Aumenta o disminuye el número de casos de cáncer en el mundo?* Recuperado el 9 de Julio de 2014, de <http://www.who.int/features/qa/15/es/>
- Oroz, 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. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 57 p.
- Paredes, C., Cardoso, F., Altamirano, K., Baltazar, P. y Romero, L. (2010). La familia Conidae en el mar peruano The family Conidae from Peruvian Sea, 17(1), 65–73. doi:10.1590/S0037-86822009000400016
- Parkash, J. and Asotra, K. (2010). Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sciences*, 87(19-22), 587–95. doi:10.1016/j.lfs.2010.09.013
- Pedersen, S.F. and Stock, C. (2013). Ion channels and transporters in cancer: pathophysiology, regulation, and clinical potential. *Cancer Research*, 73(6), 1658–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4188

- Pelengaris, S., and Khan, M. (2013). *The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside* (p. 597).
- Pirrung, M.C. (2007). *The Synthetic Organic Chemist's Companion* (John Wiley., pp. 171–172).
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), 107–21. doi:10.1016/j.molmed.2010.01.005
- Russo, A, Terrasi, M., Agnese, V., Santini, D. and Bazan, V. (2006). Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Annals of Oncology*, 17 Suppl 7(Supplement 7), vii115–23. doi:10.1093/annonc/mdl963
- Sadava, D., Purves, W.H., Heller, H.G. y Orians, G. . (2009). *VIDA. La Ciencia de la Biología* (Editorial ., pp. 336–340). Editorial Médica Panamericana
- Santa, T. (2013). Derivatization in LC-MS bioanalysis. In: Li, W., Zhang, J. and Tse, F.L.S. (Eds.) *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations* (pp. 239–248). John Wiley & Sons. Inc.
- Saraste, A and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–37.
- Shen, G.S., Layer, R.T. and McCabe, R.T. (2000). Conopeptides: From deadly venoms to novel therapeutics. *Drug Discovery Today*, 5(3), 98–106. doi:10.1016/S1359-6446(99)01454-3
- Sherma, J. and Fried, B. (2003). *The handbook of Thin-Layer Chromatography* (Marcel Dek., pp. 1–2).
- Silverstein, A., Silverstein, V.B. and Silverstein, L. (2006). *Cancer: Conquering a Deadly Disease* (pp. 7–12).
- Strolb, J.S., Wonderlin, W. and Flynn, D. (1995). Mitogenic Signal Transduction in Human Breast Cancer Cells. *General Pharmacology*, 26(8), 1643–1649.
- Sundquist, T., Moravec, R., Niles, A., O'Briend, M. and Riss, T. (2006). Timing your apoptosis assays. *Cell Notes*, (16), 18–21.
- Taleisnik, S. (2006). *Receptores celulares y la transducción de señales: temas de biología celular* (Encuentro ., pp. 159–162).
- Terlau, H. and Olivera, B. M. (2004). Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1), 41–68. doi:10.1152/physrev.00020.2003

- Tucker, J.K. (1985). *Conus ximenes* Gray, 1839, *Conus mahogany* Reeve, 1845 and friends. *Shell and Sea Life*, 17(8), 201–202.
- Vermes, I., Haanen, C. and Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 167–90.
- Vianna, M.C., Konno, K., Portaro, F.C.V., De Freitas, J.C., Yamane, T., Olivera, B.M. and Pimenta, D.C. (2005) Mass spectrometric and high performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusk *Conus regius*: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. *Toxicon*, 45(1), 113-122. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.09.018
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–99. doi:10.1038/nm1087

Anexos

Anexo 1. Soluciones utilizadas para la cromatografía de alto desempeño de fase reversa (HPLC-RP)

Soluciones	Compuestos	Porcentajes en solución
Solución A	Agua desionizada (H ₂ O dd)	99.88
	Ácido trifluoroacético	0.12
Solución B	Acetonitrilo	99.88
	Ácido trifluoroacético	0.12

Anexo 2. Solución utilizada en la extracción del veneno crudo de *Conus ximenes*

Solución	Compuestos	Porcentajes en solución
Solución C	Agua desionizada (H ₂ O dd)	59.88
	Acetonitrilo	40
	Ácido trifluoroacético	0.12

Anexo 3. Soluciones utilizadas para los bioensayos y cultivo celular

Soluciones	Compuestos
DMSO	Dimetil sulfóxido
PMA	Acetato de forbol miristato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno

Anexo 4. Solución utilizada para el cultivo celular y análisis por citometría de flujo para la detección de necrosis

Solución	Compuestos	Concentración (mM)	Cantidad (g)
PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)	NaCl	137	80
	KCl	2.7	2
	Na ₂ HPO ₄	12	17
	KH ₂ PO ₄	1.2	1.63

Ajustar a pH 7.4 (utilizando HCL o NaOH) en caso necesario, aforar a 1000 ml con agua destilada y esterilizar.

