

TESIS DEFENDIDA POR
IRASEMA OROZ PARRA
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias de la Vida*

Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales
Director de Estudios de Posgrado

10 de Marzo del 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



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

**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

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

IRASEMA OROZ PARRA

Ensenada, Baja California, México, Marzo del 2011.

RESUMEN de la tesis de **Irasema Oroz Parra**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Marzo 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)**

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director de Tesis

Los caracoles del género *Conus* se caracterizan por poseer un aparato venenoso. Actualmente se conocen aproximadamente 700 especies, las cuales contienen más de 50, 000 componentes activos con potencial farmacológico. Se ha encontrado que los componentes del veneno, tienen blancos moleculares específicos, por ejemplo, canales iónicos. Dichos canales tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular, en lo que respecta a la proliferación o a la apoptosis. El cáncer es la primer causa de muerte a nivel mundial, siendo el cáncer de pulmón, colón, hígado y mama, los causantes del mayor número de muertes cada año. Por lo tanto, se buscan nuevas terapias farmacológicas para combatirlo.

En este trabajo, se analizó el veneno del caracol marino *Conus ximenes*, el cual se purificó por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa (HPLC-RP), se obtuvieron 13 fracciones de veneno total, que fueron probadas en la línea celular LIM-1215 perteneciente a cáncer de colon.

Los resultados se analizaron por medio de ensayos de citotoxicidad, estos indicaron que dentro de la fracción 7, existen componentes que disminuyen la supervivencia celular hasta en un 42%, demostrando que dentro del veneno de *C.ximenes*, existen componentes capaces de disminuir la supervivencia de las células de cáncer de colon. Sin embargo, al repurificar la fracción 9, se encontraron componentes que aumentan la supervivencia celular hasta en un 108%, convirtiéndolos en potentes herramientas moleculares. Se comprobó que dentro del veneno del veneno de *C. ximenes*, existen varios componentes capaces de modificar la división celular de la línea LIM-1215.

Palabras clave: Canales iónicos, cáncer, *Conus ximenes*, LIM-1215, citotoxicidad.

ABSTRACT of the thesis presented by **Irasema Oroz Parra** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in SCIENCE OF LIFE with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, March 2011.

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CYTOTOXIC AGENTS FROM
THE MARINE SNAIL *Conus ximenes* WITH ACTIVITY AGAINST (LIM-1215)
CANCER CELL LINE**

Snails from the *Conus* genus are characterized for having a venom producing apparatus. Currently, about 700 species are known, which have more than 50,000 different active compounds, with a high potential for medical use. The components of the venom have specific molecular targets, such as ion channels. These ion channels are extremely important in the cell cycle regulation, especially in proliferation and apoptosis.

Cancer is the first cause of death worldwide, lung, colon, liver and breast cancer, are responsible for most of cancer related fatalities each year. For this reason, new pharmacological therapies are sought to decrease their incidence.

For the purpose of this study, the venom of the marine snail *Conus ximenes* was analyzed. The venom was purified with Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC-RP), 13 fractions of the total venom were obtained, and said fractions were tested in LIM-1215 colon cancer cell line.

The activity of the 13 venom fractions, were individually determined by cytotoxic assay, finding in fraction 7, components that decrease the cell survival up to 42% were present. This study also found that in *C. ximenes*, certain venom related components are capable to reduce the survival of colon cancer cells.

However, after re-purification of fraction 9, some molecular components increase the cell survival up to 108%, meaning they could be used as potent molecular tools. This study showed that there are several components in *C. ximenes* with the capacity to modify cell division of LIM-1215.

Keywords: Ion channels, cancer, *Cous ximenes*, LIM-1215, cytotoxic.

DEDICATORIAS

A mi MADRE:

Por darme tu apoyo incondicional, y ser siempre mi más grande ejemplo a seguir.

Éste trabajo es para ti, porque tú me has enseñado que querer es poder, que mediante lucha, dedicación y esfuerzo puedo lograr todas mis metas. Espero algún día poder regresarte todo lo que me has dado, hoy te entrego un escalón más, aún falta mucho por recorrer pero gracias a ti sé que puedo continuar.

Eres el pilar que me sostiene, mi inspiración, mi ánimo, mi todo.

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

Al **CONACYT**, por otorgarme la beca de Maestría en el periodo de Enero del 2009 a Diciembre del 2010, para la realización de este proyecto.

Al **CICESE**, por otorgarme una extensión de beca para la terminación del proyecto de tesis.

Al **Dr. Alexei F. Licea Navarro**, por permitirme entrar a su grupo de trabajo, y darme su apoyo incondicional durante la realización del mismo.

A los miembros del Comité de Tesis, **Dra. Rosa R. Mouriño Pérez** y **Dr. Carlos A. Brizuela Rodríguez**, por su apoyo, sus correcciones, y por sus valiosas aportaciones durante la realización de este trabajo.

A, **M.C Eduardo Morales**, por compartir sus conocimientos y su disponibilidad al realizar las purificaciones por HPLC.

A todos los trabajadores del área administrativa, por ayudarme con los trámites realizados durante mi estancia en el posgrado.

A todos los Investigadores Titulares, que ampliaron mis conocimientos por medio de clases y asesorías, que me permitieron utilizar sus materiales y equipos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi Madre, por ser mi soporte en todo momento.

A mi Hermano "Panrrito", por ser un ejemplo de dedicación y perseverancia, y recordarme que la familia es lo más importante.

A Fernando Téllez, por ayudarme durante mi formación tanto personal como académica y por acompañar a mi Mamá en cada momento.

A Paola Islas, por ser la mejor cuñada del mundo, por escucharme y siempre darme los mejores consejos.

A Orlando Buelna, por formar parte de mi vida en esta etapa tan importante, y por aguantarme en las buenas y en las malas.

Al Doc (Alexei), por ser más que mi jefe un amigo en quién confiar, por brindarme sus conocimientos, su ayuda y su apoyo incondicional.

A Edna Sánchez, por ayudarme durante estos años, con todas las dudas fuera y dentro del laboratorio.

A Eduardo Morales, por sus pláticas durante mis corridas, gracias por hacer más cortas y agradables las 8 horas de trabajo en el HPLC.

A mis compañeros de clases, Carmen, Oscar M., Mayra, Pily, Bere, Diego, Ramón, Mario, Pinky, Rosy, Abigail, Oscar G., Lisandro, Efra, Chio, Mata, Gloria, Karlita A., y Javi, por hacer todas las

clases más amenas, apoyarme con todas mis dudas, ayudarme a estudiar y sobre todo por brindarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Hanna, Karlita C., Pavel, Tania, Félix, David, Mimi y Ricardo, por hacer más corto el día en el laboratorio con su compañía, por ayudarme en todas mis dudas, por enseñarme a usar los aparatos y las técnicas que eran nuevas para mí, y por su amistad.

A Karlita Cota, por estar conmigo en cada momento y desde lejos demostrarme lo que significa una verdadera amistad.

A mis mejores amigos, Karen, Clarissa, Carmina, Cielo, Jessy, Sele, Faby, Mayra, Pau, Ana, Alba, Kyra, Vico, Ita, Clayton, Makuis, Chispita, David A, Cheve, Kato y Matoño, por compartir cada momento de mi vida y hacerme creer que si existen las amistades de TODA LA VIDA.

A Fernando Bátiz, por ayudarme a contestar todas mis dudas sobre medicina, con las traducciones, a buscar artículos, en fin, por escucharme y apoyarme siempre, GRACIAS.

A todas mis amistades Ensenadenses, por hacerme sentir como en casa.

Gracias a todos aquellos, que de una u otra manera formaron parte esta experiencia tan importante en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos Académicos.....	iv
Agradecimientos Personales.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Características generales del género <i>Conus</i>	2
2.2 Producción del veneno y elementos del aparato venenoso.....	4
2.3 Componentes del veneno del género <i>Conus</i>	6
2.3.1 Composición Bioquímica.....	6
2.3.2 Modificaciones postraduccionales.....	8
2.3.3 Genética molecular.....	9
2.4 Blancos moleculares de las conotoxinas.....	10
2.5 Organización de las conotoxinas.....	11
2.6 Especímenes de interés.....	12
2.6.1 <i>Conus ximenes</i>	12
2.7 Características generales de los canales iónicos.....	13
2.8 Cáncer.....	14
2.8.1 Modo de acción.....	14
2.8.2 Impacto del cáncer en la vida humana.....	15

ÍNDICE GENERAL (Continuación)

		Página
2.9	Canales iónicos en cáncer.....	15
III.	JUSTIFICACIÓN.....	18
IV.	OBJETIVOS.....	19
4.1	Objetivo general.....	19
4.2	Objetivos específicos.....	19
V.	HIPÓTESIS.....	20
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1	Organismos y extracción de veneno.....	21
6.2	Cuantificación de proteína del extracto.....	21
6.3	Purificación por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP).....	22
6.3.1	Repurificación de fracciones individuales.....	22
6.3.2	Repurificación de las subfracciones.....	23
6.4	Cultivo de líneas celulares de cáncer.....	23
6.4.1	Preparación de material y equipo.....	23
6.4.2	Descongelamiento de líneas celulares.....	24
6.5	Desprendimiento de líneas celulares.....	24
6.5.1	Mantenimiento y expansión del cultivo.....	24
6.5.2	Conteo celular.....	25
6.6	Criopreservación de líneas celulares.....	25
6.7	Ensayos citotóxicos.....	26
VII.	RESULTADOS.....	27
7.1	Organismos, extracción de veneno y cuantificación de proteína del extracto.	27

ÍNDICE GENERAL (Continuación)

	Página
7.2 Purificación por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP).....	27
7.3 Cultivo de líneas celulares de cáncer.....	28
7.4 Ensayos citotóxicos.....	30
7.4.1 Ensayo citotóxico con las 13 fracciones de veneno total de <i>C. ximenes</i>	30
7.5 Repurificación de la fracción 7 individual.....	31
7.5.1 Ensayo citotóxico con las subfracciones de la fracción 7 individual.....	33
7.5.2 Repurificación de la subfracción 7.8.....	35
7.5.3 Ensayo citotóxico con la subfracción 7.8.....	36
7.6 Repurificación de la fracción 9 individual.....	36
7.6.1 Ensayo citotóxico con las subfracciones de la fracción 9 individual.....	38
7.6.2 Repurificación de la subfracción 9.1.....	40
7.6.3 Ensayo citotóxico con la subfracción 9.1.....	41
7.6.4 Repurificación de la subfracción 9.7.....	42
7.6.5 Ensayo citotóxico de la subfracción 9.7.....	43
VIII. DISCUSIONES	46
IX. CONCLUSIONES	50
X. BIBLIOGRAFÍA	51
XI. ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diez conchas diferentes de caracoles marinos del Género <i>Conus</i> . Se muestra, en la fila superior de izquierda a derecha: <i>Conus textile</i> y <i>Conus magus</i> ; en la segunda fila, de izquierda a derecha: <i>Conus circumcissus</i> , <i>Conus geographus</i> (especie responsable de la mayoría de las fatalidades).	2
2	Diversidad morfológica de conchas de algunos caracoles del Género <i>Conus</i>	3
3	Representación esquemática de las principales partes que conforman el aparato venenos de los caracoles del género <i>Conus</i> , el cual está constituido por: Bulbo venenoso, conducto venenoso, esófago, una glándula salivaria, faringe, saco radular, dientes radulares, probóscide y arpón.	5
4	Diferentes vistas de los dientes radulares de <i>C. ximenes</i> (izquierda). Fotografía del bulbo y ducto venenoso disectados junto con la concha del caracol (derecha) (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE).	5
5	Diagrama organizado de conopéptidos, se observa que los conopéptidos se dividen principalmente en aquellos que presentan enlaces disulfuro y aquellos que no presentan enlaces disulfuro, solo se muestran los genes de la superfamilia de los conopéptidos con múltiples enlaces disulfuro, las características de los residuos de cisteínas en los péptidos de cada familia y los nombres de las familias de las conotoxinas.	7
6	Esquema de la organización característica del precursor peptídico de las conotoxinas.	10
7	Morfología de la concha del caracol marino <i>Conus ximenes</i> .	12
8	Modelo esquemático de un canal dependiente de voltaje.	14
9	Cromatograma obtenido de la purificación del veneno total de <i>C. ximenes</i> , en la parte inferior se puede observar el plan de estrategia utilizado para coleccionar fracciones cada 5 minutos, así como el nombre que se le dio a cada una de ellas.	28
10	Imágenes de las células de LIM-1215 a una confluencia del 80%. La fotografía A fue tomada con un objetivo de 10x, mientras que B con un objetivo de 40x.	29
11	Efecto de las 13 fracciones obtenidas en la purificación por HPLC-RP del veneno total de <i>C. ximenes</i> . Donde C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Cada fracción fue agregada a una concentración de 100 µg/ml. Las fracciones que presentaron diferencia significativa con respecto al control negativo se señalan con un asterisco color rojo.	30

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 12** A) Amplificación del cromatograma de la fracción 7 individual, que corresponde a los minutos 30-35 de la corrida de veneno total de *C. ximenes*. B) Cromatograma de repurificación de la fracción 7 individual, donde se pueden observar las 11 subfracciones obtenidas, cada una numeradas en la parte superior. **32**
- 13** Efecto de las 11 subfracciones obtenidas en la repurificación por HPLC-RP de la veneno fracción 7 individual. Donde C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Cada fracción fue agregada a una concentración de 50 µg/ml. Las fracciones que presentaron diferencia significativa con respecto al control negativo se señalan con un asterisco color rojo **34**
- 14** Derecha: Cromatograma de la fracción 7 individual con amplificación de la subfracción 7.8. Izquierda: Cromatograma de la subfracción 7.8, donde se muestra la línea punteada que pertenece al gradiente isocrático de 21.4% de solución B (Anexo 2). Cada pico individual obtenido esta numerado en la parte superior. **35**
- 15** Efecto de los 5 picos obtenidos en la repurificación de la subfracción 7.8, donde se observa que los picos que presentan mayor actividad son 7.8.2, 7.8.4 y 7.8.5 al disminuir la supervivencia celular de la línea de cáncer de colon LIM-1215 en un 34, 33 y 42% respectivamente. Los picos que presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control – se señalan con un asterisco color rojo. **36**
- 16** A) Cromatograma de la fracción 9 individual que corresponde a los minutos 40-45 de la corrida de veneno total de *C. ximenes*. B) Cromatograma de repurificación de la fracción 9 individual, donde se pueden observar las 7 subfracciones obtenidas, cada una numeradas en la parte superior. **37**
- 17** Efecto de las 7 subfracciones sobre LIM-1215, donde se muestra que las subfracciones 9.1, 9.2, 9.3, 9.4 y 9.7 son las que presentan mayor actividad disminuyendo la supervivencia celular en un 17, 40, 16, 17 y 16% respectivamente. C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Cada subfracción fue agregada a una concentración de 50 µg/ml. Las fracciones que presentaron diferencia significativa con respecto al control negativo se señalan con un asterisco color rojo. **39**
- 18** La imagen del lado derecho muestra el cromatograma de la repurificación de la fracción 9 así como la amplificación de la subfracción 9.1. La imagen de lado izquierdo muestra el cromatograma obtenido al purificar la subfracción 9.1, donde se pueden observar los 7 picos individuales, cada pico esta numerado en la parte superior. **40**

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 19** Efecto de los picos obtenidos en la repurificación de la subfracción 9.1, los picos que presentan mayor actividad aumentando la supervivencia celular de LIM-1215 9.1.1 en un 54% al igual que 9.1.2, 9.1.6 en un 97% y 9.1.7 en un 103%. C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Los picos con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo se señalan con un asterisco. **42**
- 20** Derecha: Cromatograma de la fracción 9 individual, en el tiempo de elución del pico 9.7 así como una amplificación del mismo. Izquierda: Repurificación de la subfracción 9.7, donde se observan los 4 picos obtenidos. **43**
- 21** Efecto de los 4 picos obtenidos en la repurificación de la subfracción 9.7, los picos que presentan mayor son 9.7.3 y 9.7.4 actividad aumentando la supervivencia celular de LIM-1215 en un 91% y 108%, respectivamente. Como control positivo se utilizó DMSO al 10% y como control negativo agua destilada. Los picos con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo se señalan con un asterisco. **44**

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Datos utilizados en la repurificación de la fracción 7 y 9 individuales.....	22
II	Condiciones utilizados en la repurificación de las subfracciones 7.8, 9.1 y 9.7...	24
III	Concentración de subfracciones en el ensayo de citotoxicidad.....	41
IV	Concentración de picos individuales en el ensayo de citotoxicidad.....	44

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades que más ha aumentado con el paso del tiempo (Liu *et al.*, 2008). Por lo tanto, se buscan nuevas terapias farmacológicas para combatirlo. Se ha presentado evidencia de que el cáncer está relacionado directamente con las proteínas de membrana, un ejemplo de estas son los canales iónicos, y en los últimos años, la investigación se ha dirigido hacia esos blancos moleculares. Los canales iónicos tienen un papel importante en la regulación del ciclo celular, en lo que respecta a la proliferación o a la apoptosis (Lang *et al.*, 2007).

Los problemas causados por desórdenes en la membrana de los canales iónicos, son nombrados canalopatías (Jongsma y Wilders, 2001). Conforme avanzan las investigaciones en este campo, se han encontrado agentes bloqueadores de canales iónicos específicos para cáncer o las canalopatías, como algunas toxinas de venenos de animales de diferentes especies (abejas, arañas, escorpiones, anémonas y serpientes). Se ha reportado que las toxinas aisladas de diferentes venenos se consideran herramientas importantes en las pruebas de función fisiológica y la estructura de los canales iónicos (Gurrola *et al.*, 1999).

Existen más de 100 componentes diferentes en el veneno de los caracoles del Género *Conus*, y se estiman más de 50, 000 componentes activos diferentes con potencial farmacológico en los venenos de todas las especies de *Conus* existentes (Teralu y Olivera, 2004).

En trabajos realizados por el equipo del Laboratorio de Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), se encontraron componentes con actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer, dentro del veneno del caracol marino *Conus californicus*. Por lo tanto en este trabajo se pretende encontrar componentes dentro del veneno del caracol marino *Conus ximenes*, con actividad citotóxica, o moduladores de la división celular en diferentes líneas celulares de cáncer.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características generales del Género *Conus*

Las familias *Conidae*, *Turridae* y *Terebridae* constituyen a la superfamilia *Conoidea*, cuyos miembros se caracterizan por poseer un aparato venenoso. Siendo *Conidae* la familia más mortal, la cual incluye las especies del Género *Conus* (McIntosh y Jones, 2001). Los caracoles marinos del Género *Conus*, son depredadores y actualmente se conocen de 500 a 700 especies, por lo que pueden considerarse el género más grande de animales marinos vivos hoy en día (Wang y Chi, 2004; Olivera, 2006). Estos caracoles son ampliamente conocidos debido a la belleza de sus conchas, mismas que son encontradas en tiendas comerciales por todo el mundo (Becker y Teralu, 2008).

En las figuras 1 y 2 se muestra la diversidad morfológica de conchas de diferentes especies de caracoles *Conus*.



Figura 1. Diez conchas diferentes de caracoles marinos del Género *Conus*. Se muestra, en la fila superior de izquierda a derecha: *Conus textile* y *Conus magus*; en la segunda fila, de izquierda a derecha: *Conus circumcisis*, *Conus geographus* (especie responsable de la mayoría de las fatalidades humanas) y *Conus dusaveli*. En la tercer fila, de izquierda a derecha: *Conus ammiralis*, *Conus bandanus vidua* y *Conus hirasei* (Olivera, 1997).



Figura 2. Diversidad morfológica de conchas de algunos caracoles del género *Conus* (Bulaj y Olivera, 2008).

La mayoría de los *Conus* crecen en hábitats tropicales, sin embargo, algunas especies se han adaptado a aguas frías y pueden ser encontrados a profundidades de más de 10 metros. Utilizan su veneno como arma para capturar a sus presas, como defensa contra depredadores, como competidores y posiblemente para otras interacciones biológicas. Generalmente se dividen en tres grandes grupos, dependiendo de la base de su alimentación, estos pueden ser: 1) Vermívoros (cazadores de gusanos), los cuales conforman la clase más grande, la mayoría se alimenta de gusanos poliquetos, pero algunos se alimentan a base de hemicordados y equiriudes, 2) Moluscívoros, son aquellos que cazan otros moluscos gasterópodos y 3) Piscívoros (cazadores de peces), son el grupo más notable, cuentan con venenos potentes que inmovilizan rápidamente a sus presas (Teralu y Olivera, 2004).

Casi todos los *Conus* son nocturnos, cuentan con dos ojos aunque su visión es pobre, utilizan su destreza quimiosensora para atrapar a sus presas. La diversidad de los *Conus* es la más grande de los hábitats marinos bajo las zonas tropicales (Teralu y Olivera, 2004).

2.2 Producción del veneno y elementos del aparato venenoso

Los caracoles *Conus*, utilizan su veneno como arma fundamental en la captura de sus presas, para esto contienen un sofisticado aparato venenoso con un sistema de inyección y liberación del veneno (Teralu y Olivera, 2004).

La producción y liberación del veneno involucra tres pasos generales (Marshall *et al.*, 2002):

1. Síntesis, procesamiento y empaquetamiento de toxinas.
2. Generación y almacenamiento de dientes radulares y transferencia de un diente hacia la probóscide.
3. La inserción final del diente sobre la presa y expulsión del veneno.

El veneno es producido y almacenado en el conducto venenoso, el cual está equipado con un bulbo, se cree que éste último proporciona la fuerza final para la expulsión del diente radular, aunque no hay evidencia que compruebe esta hipótesis. El conducto venenoso desemboca en la parte anterior de la faringe donde se une al saco radular, se cree que en este sitio es donde los dientes radulares son cargados con el veneno. El saco radular está conformado por dos protuberancias, una larga y una corta. En la protuberancia larga se generan los dientes radulares, y en la protuberancia corta se almacenan los dientes radulares maduros. Los dientes radulares tienen la forma de un arpón hueco parecido a una aguja hipodérmica y están constituidos por quitina. Una vez cargado el diente radular con el veneno, pasa de la faringe a la apertura de la probóscide en donde se almacena hasta su utilización (Kohn *et al.*, 1972; Halstead, 1988; Marshall *et al.*, 2002; Norton y Olivera, 2006).

En la figura 3, se muestra una representación esquemática del aparato venenoso de los caracoles del Género *Conus*, en la cual se indican todas las partes que lo conforman, mencionadas anteriormente.

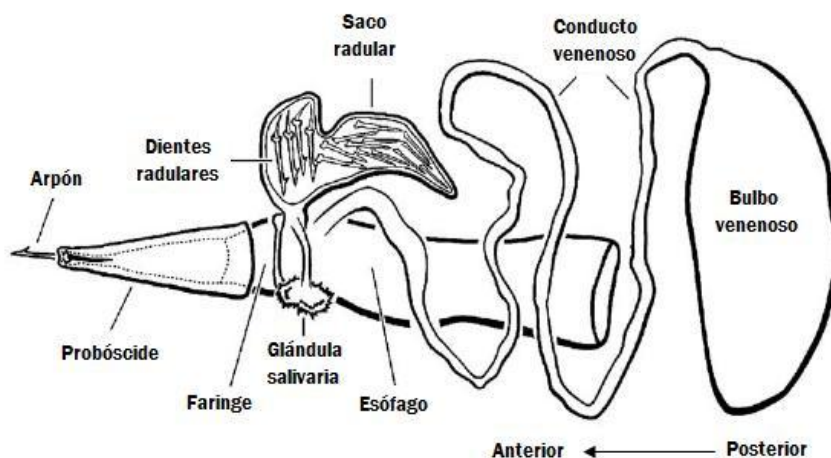


Figura 3. Representación esquemática de las principales partes que conforman el aparato venenoso de los caracoles del género *Conus*, el cual está constituido por: Bulbo venenoso, conducto venenoso, esófago, una glándula salivaria, faringe, saco radular, dientes radulares, probóscide y arpón (Modificación de Norton y Olivera, 2006).

En la figura 4 se muestran diferentes vistas de los dientes radulares de *Conus ximenes*, así como del bulbo y ducto venenoso una vez disectados.



Figura 4. Diferentes vistas de los dientes radulares de *C. ximenes* (izquierda). Fotografía del bulbo y ducto venenoso disectados junto con la concha del caracol (derecha) (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Biotoxinas del CICESE).

2.3 Componentes del veneno del Género *Conus*

2.3.1 Composición Bioquímica

Existen dos divisiones de los componentes del veneno de los *Conus* (Teralu y Olivera 2004):

1. Conotoxinas, que son conopéptidos compuestos por múltiples enlaces disulfuro (más de dos enlaces).
2. Conopéptidos, con la presencia de un enlace disulfuro (como por ejemplo, conopresina y contrifano), o sin enlace disulfuro (como contulacina, conantocina y conorfamida).

Además de los conopéptidos mencionados, el veneno de los *Conus* se encuentra constituido por proteínas como fosfolipasas del tipo A₂ y por componentes no peptídicos como serotonina y ácido araquidónico (McIntosh *et al.*, 1999). Sin embargo, los componentes peptídicos han sido los más estudiados.

En la composición de las conotoxinas, se pueden encontrar residuos de cisteínas con una alta frecuencia y son separados por un rango de 0 a 6 aminoácidos del siguiente residuo de cisteína. Los conopéptidos son de tamaño pequeño, la mayoría de las conotoxinas están compuestas por 12 a 30 aminoácidos, en comparación con las toxinas de venenos de otras especies, que típicamente están compuestas por 40 a 80 aminoácidos (Teralu y Olivera 2004).

En la figura 5, se muestra un diagrama de los conopéptidos, en el cual se indican los genes de las superfamilias, patrones de los enlaces disulfuro y los blancos farmacológicos conocidos.

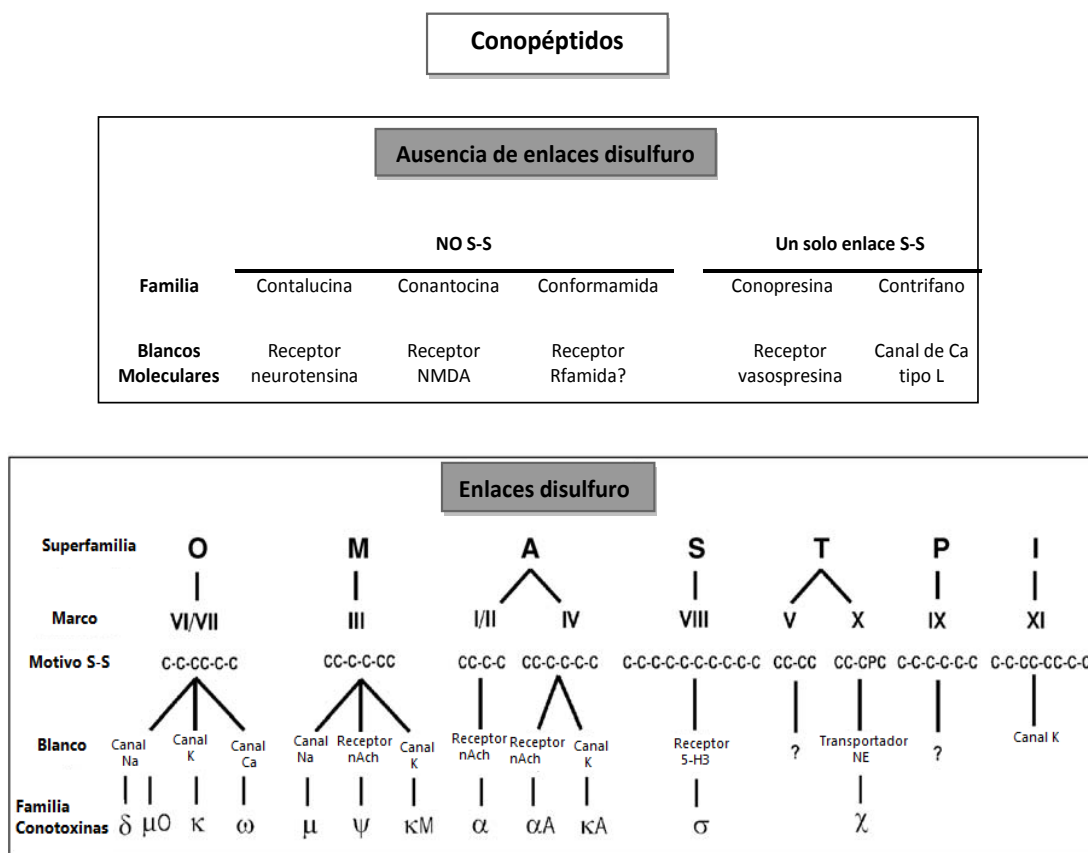


Figura 5. Diagrama organizado de conopéptidos, se observa que los conopéptidos se dividen principalmente en aquellos que presentan enlaces disulfuro y aquellos que no presentan enlaces disulfuro, solo se muestran los genes de la superfamilia de los conopéptidos con múltiples enlaces disulfuro, las características de los residuos de cisteínas en los péptidos de cada familia y los nombres de las familias de las conotoxinas (Modificación de Norton y Ollivera, 2006).

Los caracoles del Género *Conus* producen más de 50, 000 conotoxinas diferentes con una longitud que varía entre 10 a 50 residuos de aminoácidos, a menudo con varias modificaciones postraduccionales y generalmente contienen dos o más enlaces disulfuro. A pesar de su gran diversidad molecular. Las conotoxinas adoptan un número limitado de conformaciones, las cuales son estabilizadas por los enlaces disulfuro presentes. El mecanismo por el cual se forman enlaces disulfuro de forma nativa en las conotoxinas ha sido tema de investigación por más de dos décadas (Bulaj y Olivera, 2008).

2.3.2 Modificaciones postraduccionales

Otra característica llamativa de los conopéptidos, es la presencia de un inusual complemento de aminoácidos con modificaciones postraduccionales, que son encontradas con frecuencia en algunas familias de conopéptidos (Teralu y Olivera, 2004).

Algunas modificaciones postraduccionales encontradas en una amplia variedad de conotoxinas son: procesamiento proteolítico, amidación del carboxilo terminal, formación de enlaces disulfuro, otras encontradas con menos frecuencia son: hidroxilación de prolina y O-glucosilaciones, carboxilación en glutaminas, bromación en triptófanos, ciclización de los extremo amino y carboxilo terminal, sulfatación en tirosinas, y algunos de los casos extremos en las modificaciones se presentan en isomerización de los aminoácidos -L a -D. Estas modificaciones postraduccionales incrementan la potencia y efectividad de las toxinas del Género *Conus*, así como también se supone que mejoran la eficacia funcional y/o la especificidad de los conopéptidos en los cuales han sido encontrados (Buczek *et al.*, 2005).

Los caracoles *Conus* expresan la enzima encargada de realizar la modificación postraducciona en sus ductos venenosos, esta enzima contiene la señal de reconocimiento en la región pro del precursor. La presencia de esta señal en el precursor peptídico recluta la enzima postraducciona y la instruye para modificar residuos de aminoácidos específicos en la toxina madura, así la región pro del precursor proporciona el sitio de anclaje para la enzima de modificación postraducciona (Teralu y Olivera, 2004).

Sin embargo, la mayoría de las funciones de las modificaciones postraduccionales presentes en las conotoxinas, aún no han sido definidas, y se sabe poco sobre su mecanismo molecular. Un ejemplo de la importancia funcional de estas modificaciones es el péptido excitatorio r1, la perteneciente a la superfamilia de la I-conotoxina, el cual se conoce como D-Phe⁴⁴ y tiene un poder potente en axones de anfibios, pero un análogo conocido como L-Phe no lo es. Un péptido homólogo D-Leu presenta un alto potencial en los axones, al igual

que el análogo L-Leu, demostrando que las modificaciones afectan la actividad biológica (Buczek *et al.*, 2005).

2.3.3 Genética molecular

Cada conotoxina es codificada por un ARN mensajero, y es traducido a un precursor de la toxina, el cual tiene una longitud de 70 a 120 aminoácidos, éste precursor es llamado pre-propéptido y contiene un arreglo estructural distintivo: una secuencia señal altamente conservada en el extremo amino terminal (la “región pre”) con un tamaño aproximado de 20 aminoácidos, un espacio conservado de intervención llamado “región pro”, con un tamaño de aproximadamente 40 aminoácidos y un péptido maduro hipervariable en el extremo carboxilo terminal de aproximadamente 10 a 35 aminoácidos. (Wang y Chi, 2004; Teralu y Olivera, 2004). La hidrólisis proteolítica del precursor para generar la toxina funcional es un paso obligatorio en la maduración de todas las conotoxinas (Teralu y Olivera, 2004). Aunque las secuencias maduras de diferentes especies o incluso de la misma especie pueden variar gradualmente entre ellas, la secuencia señal de las conotoxinas dentro de todos los miembros de la misma superfamilia son extremadamente conservadas y sus regiones pro son relativamente conservadas (Wang y Chi, 2004).

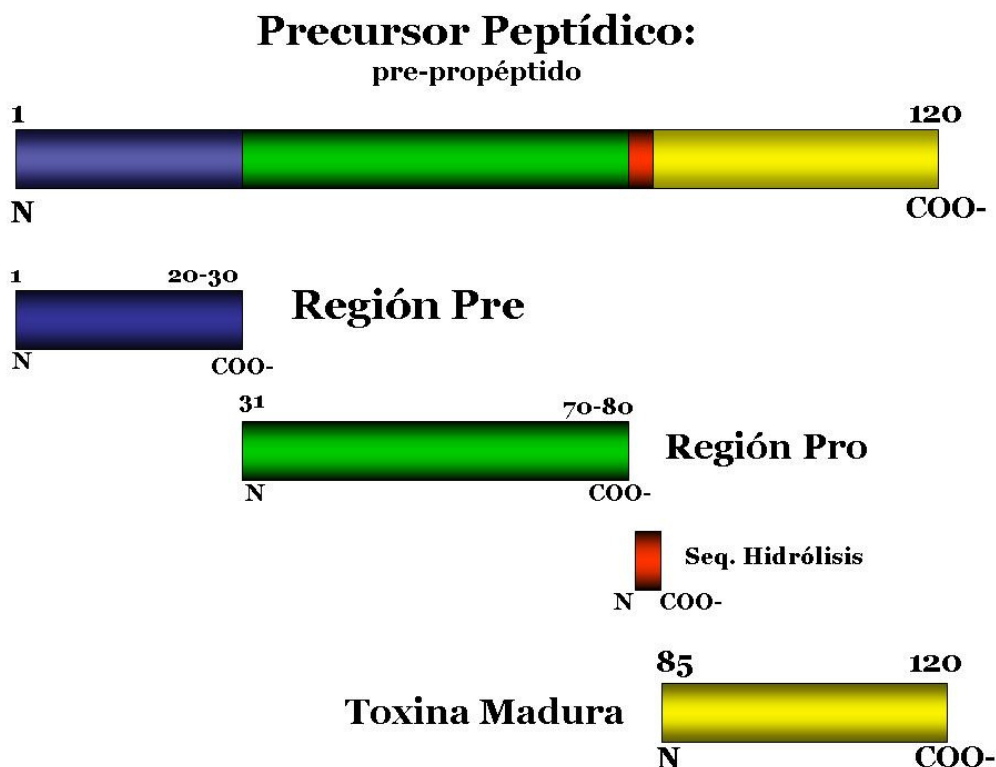


Figura 6. Esquema de la organización característica del precursor peptídico de las conotoxinas (Juárez, 2005.)

2.4 Blancos moleculares de las conotoxinas

Los blancos moleculares de los componentes del veneno de los *Conus*, son funcionalmente diferentes, estos incluyen proteínas G acopladas a receptores y a transportadores de neurotransmisores, incluso algunos componentes tienen actividad enzimática. Sin embargo, la mayor actividad biológica de los constituyentes del veneno de los *Conus* que ha sido caracterizada, es realizada por péptidos con pequeñas estructuras que tienen como blancos moleculares canales iónicos, los cuales pueden ser voltaje dependientes o ligando dependientes. Es muy probable que los conopéptidos tengan como blanco molecular un canal iónico específico (Teralu y Olivera, 2004).

El veneno de cada especie del Género *Conus*, contiene más de 200 componentes farmacológicamente activos, la mayoría de estos tienen como blancos moleculares diferentes canales iónicos dependientes de voltaje o dependientes de ligando (Becker y Teralu, 2008).

2.5 Organización de las conotoxinas

Una visión con respecto al modo de acción de las conotoxinas, es que los caracoles del género *Conus*, son profesionales sofisticados en la combinación de drogas terapéuticas. Para tener una mayor eficiencia en el efecto fisiológico en la presa, en el predador o competidor, múltiples conotoxinas actúan en sinergismo, para afectar a la presa de cierta manera beneficiándose el caracol. El término “cabal de toxinas”, ha sido aplicado al ensamblaje de conotoxinas que actúan coordinadamente para obtener el mismo efecto fisiológico final (Teralu y Olivera, 2004).

El análisis sistemático de los componentes del veneno de una especie piscívora *Conus purpurascens*, revela la existencia de dos “cabales” cuyos efectos son separables en tiempo y espacio. El primero fue denominado, “lightning-strike”, incluye conotoxinas que inhiben canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, el segundo “cabal” tiene el nombre de “motor cabal”, cuyo efecto es la inhibición total de la transmisión neuromuscular (Jones y Bulaj, 2000; Teralu y Olivera, 2004).

Se ha presentado evidencia que las especies de *Conus* cazadores de peces, tiene un espectro divergente de “cabales de toxinas”, como repertorio para cazar a sus presas. En parte, ésta divergencia puede relacionarse a diferentes estrategias para capturar peces. La combinación de los dos cabales mencionados en el párrafo anterior, es encontrada en los venenos de especies de *Conus*, que extienden sus probóscides para tener un enfoque inicial y posteriormente cazan a su presa con el arpón. En la especie *Conus geographus*, se ha descubierto un cabal denominado “nirvana”, encargado de producir un estado de relajación corporal extrema en su presa (Olivera y Cruz, 2000; Teralu y Olivera, 2004).

2.6 Especímenes de interés

2.6.1 *Conus ximenes*

Los especímenes pertenecientes a la especie *Conus ximenes*, tienen una concha que contiene dos filas de puntos sobre ella, una de las filas se encuentra en el ángulo del hombro y la otra se encuentra en la sutura con el espiral adyacente, también se encuentran con frecuencia manchas color marrón que atraviesan todo el ancho de la concha, la abertura es de color púrpura o lavanda. Los caracoles miden aproximadamente 16.5 mm de longitud y se encuentran distribuidos en Baja California, México, especialmente en Bahía de los Ángeles (Tucker, 1985).

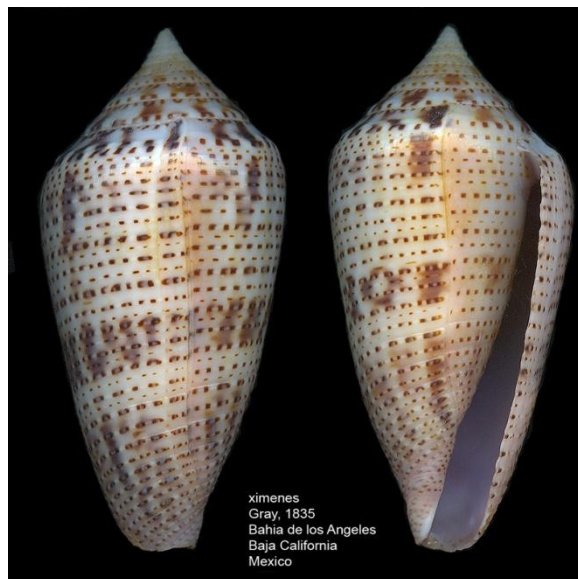


Figura 7. Morfología de la concha del caracol marino *Conus ximenes* (<http://biology.burke.washington.edu/conus/recordview/record.php?ID=2442II&tabs=51010111&frms=1&res=gallst&pglimit=R>).

2.7 Características generales de los canales iónicos

Los canales iónicos son las moléculas de mayor señalización, se expresan en un amplio rango de tejidos y tienen funciones celulares importantes: proliferación, transporte de solutos, control de volumen, actividad enzimática, secreción, invasión, expresión de genes, comunicación intercelular y acoplamiento de excitación-contracción (Fraser *et al.*, 2005). También son moléculas clave para la traducción de señales a través de la membrana celular (Neimeyer *et al.*, 2001).

Experimentos fisiológicos y de biología molecular, han descrito el término “canalopatías”, relacionándolo a enfermedades con defectos en los canales iónicos. Los fármacos que actúan sobre los canales iónicos han sido utilizados desde hace tiempo como agentes terapéuticos, pero es hasta ahora que se empieza a conocer su potencial para el tratamiento específico de las canalopatías (Neimeyer *et al.*, 2001).

Los canales iónicos de la membrana plasmática son fáciles de acceder y a menudo son expresados en concentraciones relativamente bajas en células y tejidos específicos, lo cual los hace un excelente blanco para el diseño de fármacos. En los últimos años una importante dimensión ha sido añadida a la investigación de estos canales, comprender su relevancia en procesos fisiopatológicos y enfermedades ligadas a canales iónicos como diabetes, cáncer y cardiopatías (Niemeyer *et al.*, 2001).

Los canales iónicos dependientes de voltaje son activados e inactivados por cambios en el potencial de membrana. Un canal típico contiene seis regiones transmembranales, S1-S6. Estas regiones son ensambladas formando un poro central. En la figura 8, se muestra una representación de un canal iónico, dependiente de voltaje en estado inactivado, por lo tanto no hay flujo de iones. (Lodish *et al.*, 2005).

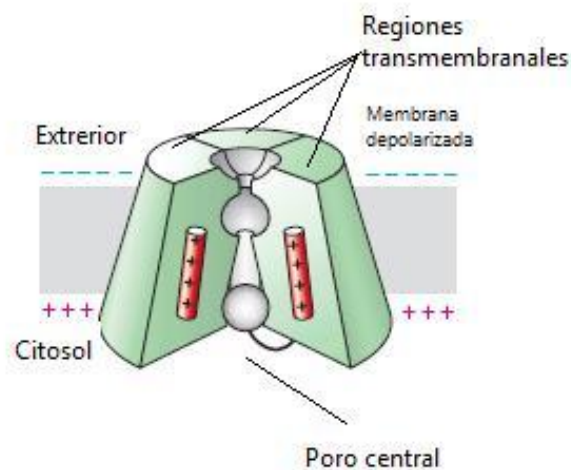


Figura 8. Modelo esquemático de un canal dependiente de voltaje. (Modificación de Lodish et al., 2005)

Los canales de potasio son expresados en la mayoría de las células, lo que indica que juegan un papel vital para la señalización celular. El papel mejor conocido es la regulación del potencial de la membrana celular, el cual es la llave para regular varios procesos celulares (Niemeyer *et al.*, 2001).

2.8 Cáncer

2.8.1 Modo de acción

El cáncer se debe a fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y la proliferación celular. Las pérdidas de regulación celular que dan origen a la mayoría o a todos los casos de cáncer se deben a daños genéticos. En la aparición del cáncer se han implicado mutaciones en dos amplias clases de genes: 1) los protooncogenes y 2) los genes supresores de tumores. Los primeros son activados para volverse oncogenes mediante mutaciones que lo hacen excesivamente activos en la promoción de la división celular (la expresión genética incrementada o la producción de un producto hiperactivo promueven ese crecimiento). Los segundos normalmente restringen el crecimiento, por lo que si se dañan se produce una división celular inapropiada (Lodish *et al.*, 2005).

2.8.2 Impacto del cáncer en la vida humana

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se estima que en el 2007, ocurrieron 7.9 millones de muertes a causa de esta enfermedad, lo cual abarca el 13% del total de muertes en ese año. Si no se tiene intervención alguna, 84 millones de personas morirán entre el 2005 y 2015. Las muertes ocasionadas por cáncer continuarán en crecimiento con un estimado de 15.5 millones de defunciones en el 2030. El cáncer de pulmón, colon, hígado y mama son los causantes del mayor número de muertes cada año (<http://www.who.com>).

El impacto del cáncer en México dejó aproximadamente 64, 000 muertes en el 2005, de las cuales 37, 000 eran personas menores de 70 años de edad. En el 2002 los casos más comunes de cáncer encontrados en nuestro país fueron, para los hombres, cáncer de próstata y para las mujeres cáncer de mama. En el 2005 el cáncer de próstata fue la primer causa de muerte en los hombres (<http://www.who.com>).

En el 2006, los tumores malignos fueron la tercer causa de muerte en México con un total de 63, 888 muertes, representando un porcentaje del 12.9 (INEGI, 2008).

2.9 Canales iónicos relacionados con la enfermedad de cáncer

Se tiene poco conocimiento sobre el papel que juegan los canales iónicos en la carcinogénesis y en la progresión de los tumores, y en particular de la relación que existe entre los canales iónicos y los procesos como regulación del crecimiento, apoptosis, invasión y metástasis (Gruber y Pauli, 1999).

Se ha demostrado que la expresión de algunos canales iónicos puede estar ligada al comportamiento biológico de líneas tumorales específicas. Por ejemplo, los canales de cloro dependientes de voltaje están relacionados con la migración e invasión de células de glioma

humano maligno, mientras que la expresión de canales de sodio dependientes de voltaje se relaciona con la invasión y metástasis de células de cáncer de próstata, en ambos casos, la aplicación de bloqueadores de canales iónicos inhiben la migración, invasión y metástasis (Gruber y Pauli, 1999).

La expresión de otros canales iónicos como Ca^{2+} activado por K^+ , K^+ activado por voltaje, Cl^- sensible al volumen, está asociada con la regulación del crecimiento de células de cáncer de mama, proliferación de células de melanoma y cáncer cervical, respectivamente (Gruber y Pauli, 1999).

Los canales de potasio Éther a-gó-gó (EAG), originalmente identificados en base al fenotipo de movimientos anormales en las patas de mutantes de *Drosophila*, son expresados normalmente en el sistema nervioso central (SNC) y tienen poca expresión o expresión nula del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o de proteínas detectadas en otros tejidos (Pardo *et al.*, 1999; Niemeyer *et al.*, 2001). Pardo y colaboradores (1999) presentaron la evidencia sobre la cuidadosa expresión de los canales EAG, ya que si son expresados de manera ectópica tienen potencial oncogénico. Las líneas celulares de origen cancerígeno, así como el tejido producido por pacientes afectados por cáncer, expresan altos niveles de EAG y la inyección de células transfectadas con EAG induce tumores sólidos en ratones inmunodeficientes (SCID) en las primeras dos semanas. Además, la inhibición de la expresión de los canales EAG con oligonucleótidos antisentido, impide la proliferación de las células tumorales, lo cual indica que los canales EAG tienen un efecto de génesis en el cáncer (Niemeyer *et al.*, 2001). Los canales EAG, han ganado interés como marcadores potenciales de diagnóstico y blancos terapéuticos contra cáncer (Camacho, 2005).

En los últimos años, la importancia de los canales de potasio dependientes de voltaje, ha aumentado con la identificación de canales iónicos como blancos potenciales para la terapia de tumores. Se ha demostrado que el canal de potasio dependiente de voltaje Eag1 aumenta la progresión de tumores en modelos animales, las proteínas que expresan estos canales se han encontrado en varias líneas celulares derivadas de tumores malignos humanos como

neuroblastomas, melanomas y carcinomas. En estas líneas celulares, Eag1 incrementa la proliferación de células y es requerido para su crecimiento y mantenimiento. La inhibición de la expresión del canal Eag1 en los tumores mencionados anteriormente reduce la proliferación celular (Hemmerlein *et al.*, 2006).

La caracterización de dos homólogos de los canales de Ca^{2+} , ECaC1 y ECaC2, también conocidos como CAT1, ha llevado a la identificación de varias funciones celulares como por ejemplo, transporte del Ca^{2+} transepitelial en el riñón y en el intestino delgado, así como su función para almacenar Ca^{2+} en la vía de entrada (Nilius *et al.*, 2001). Wissenbach y colaboradores (2001), caracterizaron un homólogo de CAT1, llamado CAT-like, el cual se expresa en cáncer de próstata avanzado, pero no se expresa en el tejido prostático sano, ni en hiperplasia prostática temprana. Por lo tanto, esta proteína puede ser utilizada como marcador potencial en la progresión de cáncer de próstata, así como blanco para la quimioterapia.

A pesar del conocimiento sobre algunos canales iónicos como EAG, CAT-like y algunos otros canales involucrados en cáncer, que están siendo caracterizados en este momento, se desconoce a la gran mayoría de los que se sobreexpresan en células tumorales y aquellos que sobrerregulan la proliferación celular.

Por estas razones, se han realizado una gran cantidad de investigaciones, con el fin de bloquear canales iónicos con sustancias antagonistas inespecíficas, e incluso se han probado venenos con el objetivo de suprimir la proliferación del cáncer, o causar apoptosis de las células cancerígenas sin afectar a las células sanas.

III. JUSTIFICACIÓN

Los fármacos utilizados para combatir la enfermedad del cáncer actúan de manera inespecífica sobre todas las células, no solamente sobre las células tumorales, generando terapias altamente tóxicas. La evolución de los tratamientos contra esta enfermedad ha sido estimulada por un deseo de desarrollar terapias nuevas, y sobre todo menos tóxicas para el tratamiento de cáncer.

La expresión de algunos canales iónicos en células de cáncer, causan un efecto en la migración o proliferación celular, se ha demostrado que las conotoxinas presentan gran afinidad por estos canales, por ello se pretende encontrar un componente con actividad farmacológica dentro del veneno del caracol marino *C. ximenes*, que actúe de manera específica sobre los canales iónicos presentes en las células cancerígenas, suprimiendo la proliferación celular o causando apoptosis de la célula sin dañar a las células sanas.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Aislar componentes del veneno del caracol marino *C. ximenes* con actividad citotóxica sobre la línea celular LIM-1215 perteneciente a cáncer de colon.

4.2 Objetivos particulares

- Identificar componentes del veneno *C. ximenes* que modulen la división celular o presenten actividad citotóxica sobre LIM-1215.
- Caracterizar bioquímicamente los compuestos que presenten actividad biológica.

V. HIPÓTESIS

Dentro del veneno del caracol marino *C. ximenes*, existe por lo menos un componente capaz de actuar sobre los canales iónicos, para detener o modificar la división celular en líneas celulares cancerígenas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Organismos y extracción de veneno

Los especímenes de *C. ximenes* se recolectaron en Bahía de los Ángeles, Baja California, México, durante el mes de septiembre del 2009. Esta bahía se encuentra ubicada a 480 km al sur de Ensenada, Baja California. La recolección se hizo en base a la predicción de mareas proporcionada por el calendario del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICSESE). El veneno se obtuvo mediante la disección de los organismos, para posteriormente extraer el aparato venenoso, del cual se separa el conducto venenoso, éste último se coloca en un homogenizador de vidrio con solución C (Anexo 3). Una vez homogenizados, se centrifuga durante 5 minutos a 10, 000 x g a 4°C, se repite dos veces y se recupera el sobrenadante. El sedimento se resuspende en solución C y nuevamente se recupera el sobrenadante, el cual se liofiliza para su almacenamiento a -70°C hasta su utilización.

6.2 Cuantificación de proteína del extracto

Para cuantificar el nivel de proteína en solución, el liofilizado se resuspende en 1 ml de solución A (Anexo 1), se determina la densidad óptica del extracto directamente a una longitud de onda de 230nm, en un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (Biorad), la concentración total de proteína se establece de la siguiente manera: 1 unidad de $DO_{230} = 1$ mg/ml de proteína.

También se cuantificó por peso seco, el procedimiento es el siguiente: se centrifuga la muestra resuspendida a 14, 000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se transfiere a un tubo de microcentrífuga previamente pesado, posteriormente el sobrenadante se liofiliza y se pesa nuevamente, por último se hace una diferencia de peso total dando como resultado el peso seco de la muestra.

6.3 Purificación por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP)

Este método es utilizado para separar los componentes del extracto crudo (apartado 7.1). Se emplea un cromatógrafo Agilent 110 (Agilent Technologies) y una columna Vydac C18 Protein & Peptides (Grace-Vydac 218TP54 x 250 mm, 300 Å), la cual se equilibra con solución B (Anexo 2). Posteriormente, se carga la muestra, al inyectar un volumen de 200 μ l. Se eluye a un flujo constante de 1ml/min, con un gradiente lineal de 0 a 60% de solución B (Anexo 2) durante 60 min. Con 7 min de lavado al 100% de solución B (Anexo 2), 5 min al inicio y 2 min al final, esto con el fin de equilibrar la columna. La detección de los componentes se realiza por absorbancia en la radiación de UV a una longitud de onda de 230 nm.

Se colectan las fracciones obtenidas de acuerdo a un plan estratégico en diferentes tiempos, cada 5 min, una vez obtenidas las fracciones se liofilizan y almacenan a -70°C hasta su utilización.

6.3.1 Repurificación de fracciones individuales

En la tabla I, se presentan la técnica utilizada en la repurificación de cada fracción

Tabla I. Datos utilizados en la repurificación de la fracción 7 y 9 individuales.

Fracción individual	Gradiente (Sol. B)	Duración (min)	Inyección (μg)	Volumen (μl)
7	13%-42%	60	145	20
9	23%-52%	60	145	20

6.3.2 Repurificación de las subfracciones

En la tabla II, se presentan las condiciones utilizadas en cada repurificación.

Tabla II. Condiciones utilizados en la repurificación de las subfracciones 7.8, 9.1 y 9.7.

Subfracción	Método isocrático (Sol. B)	Duración	Inyección (μg)	Volumen (μl)
7.8	21.4%	15	40	20
9.1	4.8%	10	35	20
9.7	32.5%	10	35	20

6.4 Cultivo de líneas celulares de cáncer

6.4.1 Preparación de material y equipo

Todo el material utilizado para trabajar con líneas celulares debe ser esterilizado y el equipo utilizado debe ser debidamente limpiado, para tenerlo bajo condiciones extremas de asepsia. El medio de cultivo utilizado es RPMI-1640, el cual está suplementado con antibiótico-antimicótico (Penicilina 10, 000 U ml⁻¹, Estreptomina 10 μg ml⁻¹ y anfotericina B 5 μg ml⁻¹ GIBCO) al 1% y suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies) al 10%.

Se trabajó con la línea celular de cáncer de colon LIM-1215, dentro de una campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, LABCONCO).

6.4.2 Descongelamiento de líneas celulares

En el interior de la campana de flujo laminar activada, se agregaron 4 ml de medio de cultivo suplementado y 1 ml de células de cáncer, las cuales previamente se descongelaron a temperatura ambiente, a un tubo de cultivo de 15 ml. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 2000 rpm durante 6 min. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio nuevo suplementado, posteriormente se agregó a una caja de cultivo celular con 9 ml de medio de cultivo suplementado. Se colocó el cultivo en una incubadora a 37°C con una atmósfera parcial de CO₂ del 5% durante 24 horas. Se observaron las células diariamente en un microscopio invertido, Axiovert 200, Zeiss, por contraste de fases con un objetivo de 10x y 40x. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo de la caja de acuerdo a la confluencia presente del cultivo, una vez alcanzado el 80% de monocapa celular en todo el cultivo se procedió a separar las células de la caja.

6.5 Desprendimiento de líneas celulares

La enzima tripsina se utilizó para separar las células del soporte al que están adheridas. Esto se realizó una vez que se observa el 80% de confluencia en la caja de cultivo celular, por medio del microscopio invertido por contraste de fases. Primeramente, se retiró el medio de cultivo de la caja con la ayuda de una pipeta, después se adicionó inmediatamente 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Anexo 4) para lavar. Posteriormente, se retiró el PBS con la ayuda de una pipeta y se agregó 1 ml de tripsina, una vez realizado se colocó la caja en la incubadora a 37°C a 5% de CO₂ y 95% de humedad durante un min. Se retiró la caja y se agregaron 9 ml de medio suplementado y se homogeniza la solución.

6.5.1 Mantenimiento y expansión del cultivo

Para el mantenimiento y la expansión de los cultivos se transfirieron 5 ml de la solución homogenizada (resultante en el apartado 7.5) a una caja nueva, lo que da lugar a dos cajas, a

cada una se les adicionó 5 ml de medio suplementado nuevo, ambas cajas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

6.5.2 Conteo celular

El conteo celular se realizó por medio de un hemocitómetro, en el cual se colocaron 10 µl de una solución previamente preparada que contiene: 75 µl de PBS (Anexo 4), 20 µl de la solución homogenizada (resultante en el apartado 7.5) y 5 µl del colorante azul de tripano filtrado. Las células se contabilizaron por cuadrante y se sumó el resultado. El resultado se dividió entre cuatro, y se multiplicó por el factor de dilución que es 5, después se multiplicó por 1000 y por último por 10 que es el volumen total (10 ml del homogenizado resultante en el apartado 7.5).

El resultado obtenido representa la concentración total de células contenidas en un volumen conocido (10 ml). Se cuantificó la cantidad total de células que se necesitaron para realizar el ensayo en base a los pozos utilizados, tomando en cuenta que se agregaron 5000 células/pozo.

Posteriormente se hizo una dilución para agregar 5,000 células/pozo en un volumen final de 190 µl en cada pozo. La concentración de las fracciones utilizadas en cada ensayo se agregaron por separado en un volumen final de 10 µl, para obtener un volumen final de 200 µl en cada pozo.

6.6 Criopreservación de líneas celulares

Este método fue utilizado para la conservación de las líneas celulares viables, y fue posterior al procedimiento de desprendimiento de células (apartado 7.5). Se retiró la caja de la incubadora con tripsina adicionada y se agregó 1 ml de una solución de suero fetal bovino

(SFB) al 5% de dimetil sulfóxido (DMSO). Se colocó inmediatamente en viales de criopreservación para almacenarlos a -70°C .

6.7 Ensayos citotóxicos

Se adicionaron 5,000 células por pozo de la placa de cultivo de 96 pozos, y se incubó a 37°C con 5% de CO_2 y 95% de humedad durante 24 h. Se agregaron las fracciones obtenidas en la purificación por HPLC-RP a la placa de cultivo incubada. Se agregaron controles y blancos al mismo tiempo que las fracciones. Como control positivo se utilizó DMSO al 10%, como control negativo agua destilada y como blanco medio RPMI-1640 suplementado. Posteriormente, se incubó la placa de cultivo a 37°C con 5% de CO_2 y 95% de humedad durante 24 h, se agregaron 30 μl del reactivo Cell Titer por pozo, y se incubó durante 3 horas bajo las mismas condiciones anteriores. Después de las 3 h se tomó lectura de la placa de cultivo en un microlector de placas (Biorad), a una longitud de onda de 495 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

VII. RESULTADOS

7.1 Organismos, extracción de veneno y cuantificación de proteína del extracto

Se trabajó con 583 organismos de la especie *Conus ximenes*, de los cuales se obtuvieron 166 mg de proteína total, utilizados para la realización de cada una de las purificaciones por HPLC-PR y los ensayos de citotoxicidad con LIM-1215.

7.2 Purificación por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP)

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3, se obtuvo un total de 13 fracciones de veneno total de *C. ximenes*, en el cromatograma de dicha purificación se puede observar la presencia de aproximadamente 43 componentes dentro del veneno total.

En la figura 9, se muestra el cromatograma obtenido al purificar la muestra de veneno total de *C. ximenes* fraccionando cada 5 minutos.

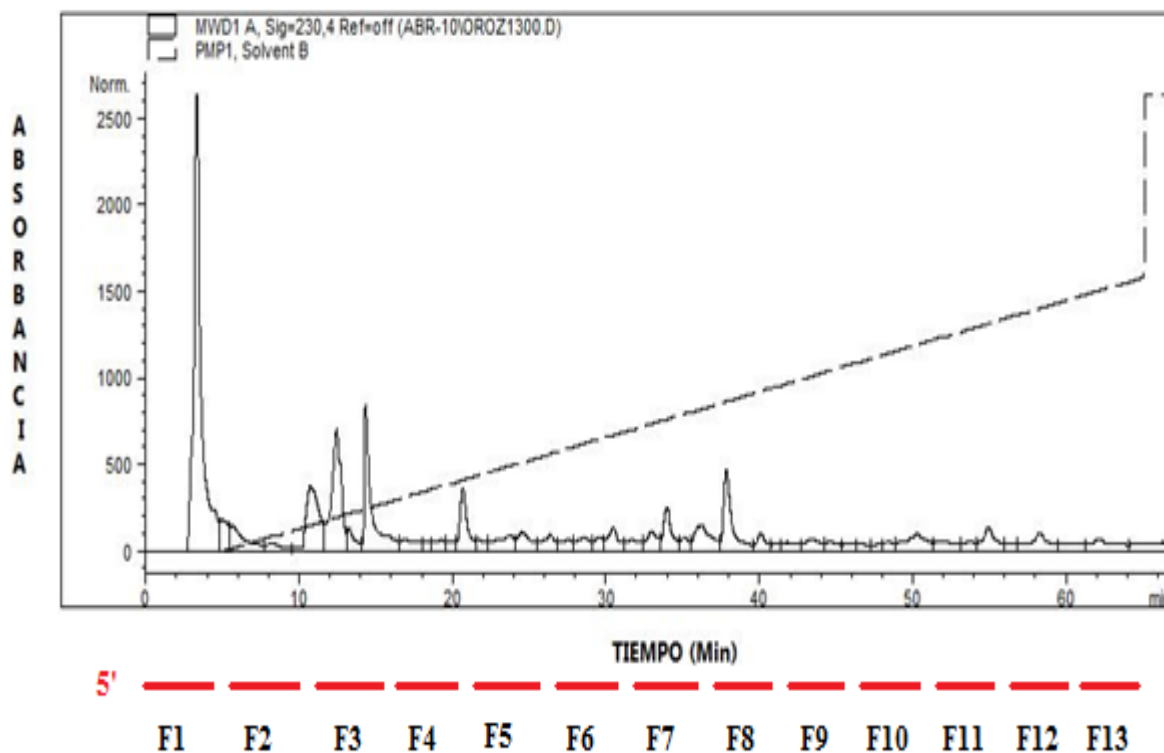


Figura 9. Cromatograma obtenido de la purificación del veneno total de *C. ximenes*, en la parte inferior se puede observar el plan de estrategia utilizado para colectar fracciones cada 5 minutos, así como el nombre que se le dio a cada una de ellas.

7.3 Cultivo de líneas celulares de cáncer

Se cultivó la línea celular LIM-1215 perteneciente a cáncer de colon, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.4.2. Los cultivos se mantuvieron hasta lograr la confluencia necesaria para realizar los ensayos citotóxicos, así como para criopreservar.

En la figura 10, se muestran imágenes de los cultivos de LIM-1215 una vez que se obtuvo una confluencia del 80%.

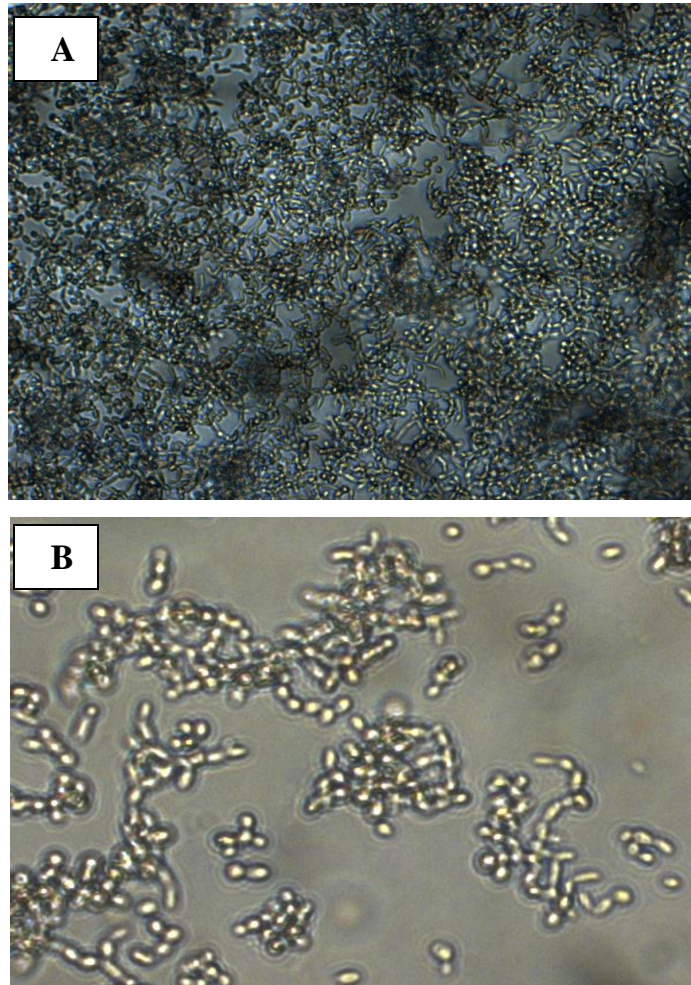


Figura 10. Imágenes de las células de LIM-1215 a una confluencia del 80%. La fotografía A fue tomada con un objetivo de 10X, mientras que B con un objetivo de 40X.

7.4 Ensayos citotóxicos

7.4.1 Ensayo citotóxico con las 13 fracciones de veneno total de *C. ximenes*

Las 13 fracciones obtenidas en la purificación del veneno total, se llevaron a una concentración de 100 µg/ml, esto basado en la recomendación para realizar ensayos de citotoxicidad con fracciones de veneno total.

El resultado obtenido en el ensayo citotóxico de las 13 fracciones de veneno total de *C. ximenes*, se muestra en la figura 11.

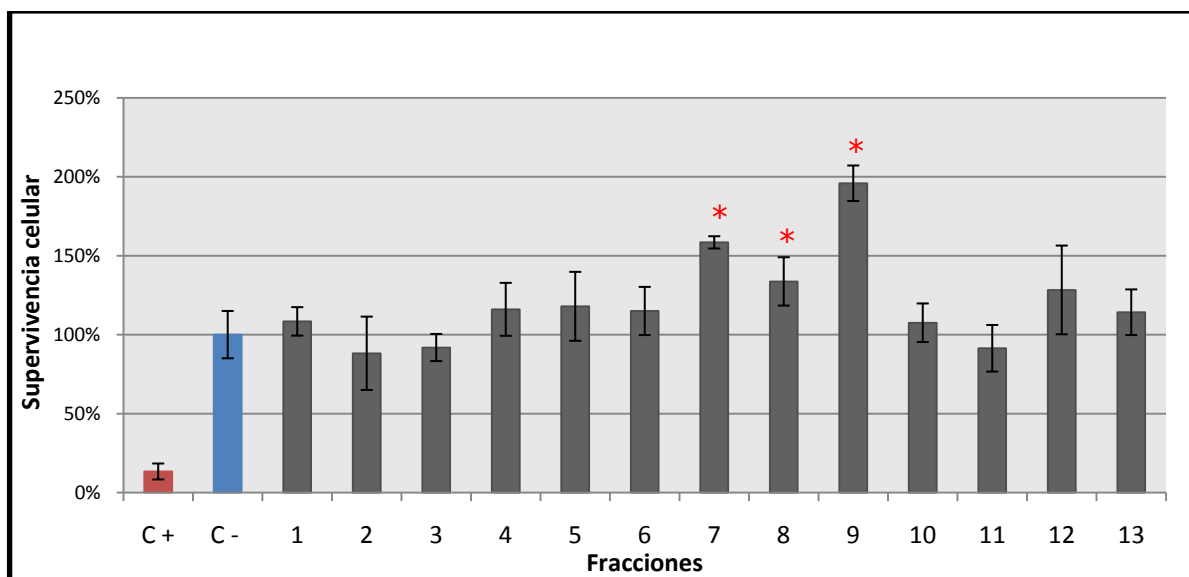


Figura 11. Efecto de las 13 fracciones obtenidas en la purificación por HPLC-RP del veneno total de *C. ximenes*. Donde C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Cada fracción fue agregada a una concentración de 100 µg/ml. Las fracciones que presentaron diferencia significativa con respecto al control negativo se señalan con un asterisco color rojo, las barras de error indican la desviación estándar.

Al observar que las fracciones 7 y 9, eran las que presentaban mayor efecto, se decidió seguir trabajando con ambas fracciones, a pesar de que el efecto fue el contrario al esperado, ya que aumentó la supervivencia en un 50 y 100% respectivamente.

Por lo tanto, se realizó una repurificación de las fracciones 7 y 9 individualmente por medio de HPLC-RP, para esto se utilizó un método estratégico con respecto al tiempo de elución de cada fracción individual.

7.5 Repurificación de la fracción 7 individual

Al repurificar la fracción 7 individual, se obtuvieron 11 subfracciones, las cuales fueron nombradas 7.N, donde 7 significa que corresponde a la fracción 7 individual y N significa el número de cada subfracción. En la figura 12 se muestra el cromatograma de la fracción 7 individual.

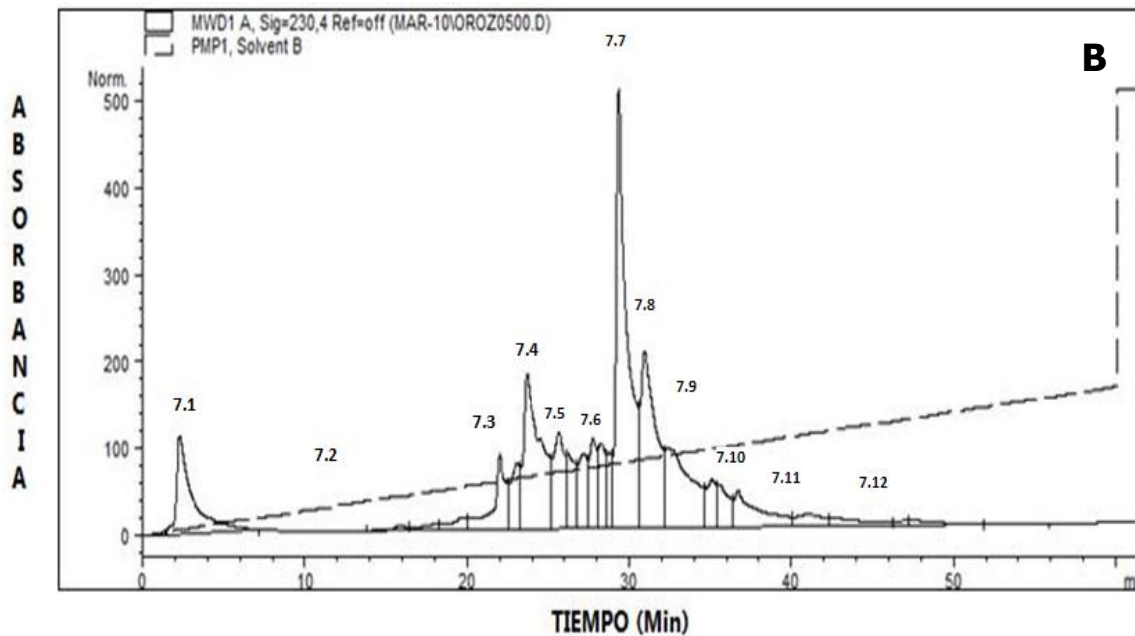
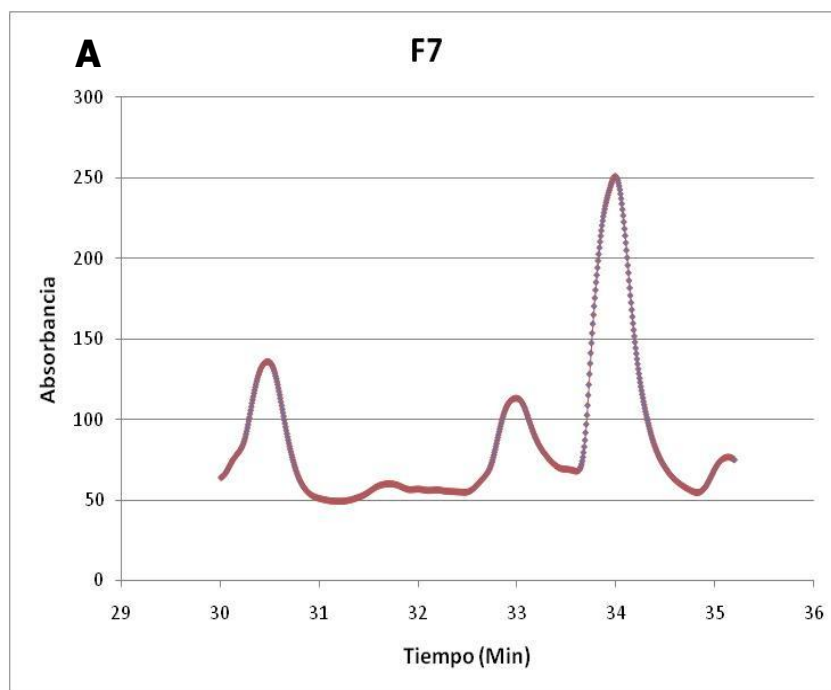


Figura 12. A) Amplificación del cromatograma de la fracción 7 individual, que corresponde a los minutos 30-35 de la corrida de veneno total de *C. ximenes*. B) Cromatograma de repurificación de la fracción 7 individual, donde se pueden observar las 11 subfracciones obtenidas, cada una numeradas en la parte superior.

En el cromatograma anterior se pueden observar las 11 subfracciones obtenidas, cada una de ellas representa un pico definido, pero como ya es conocido cada pico puede estar formado por más de un componente, por lo tanto fue necesario realizar un ensayo de citotoxicidad, para conocer aquellas subfracciones que tengan mayor efecto sobre las células de cáncer de colon, y proseguir a repurificar por medio de HPLC-RP y así conocer si las subfracciones con mayor efecto están formadas por uno o varios componentes.

7.5.1 Ensayo citotóxico con las subfracciones de la fracción 7 individual

Las 11 subfracciones resultantes de la repurificación de la fracción 7 individual, fueron agregadas en la placa de cultivo a una concentración de 50 µg/ml, esto debido a que las subfracciones ya fueron procesadas, es decir, se encuentran en un estado más puro y ya no es necesario que se agreguen en concentraciones altas. Por lo tanto se puede trabajar con la mitad de la concentración utilizada en el ensayo de citotoxicidad del veneno total.

El resultado obtenido en el ensayo de citotoxicidad se muestra en la figura 13.

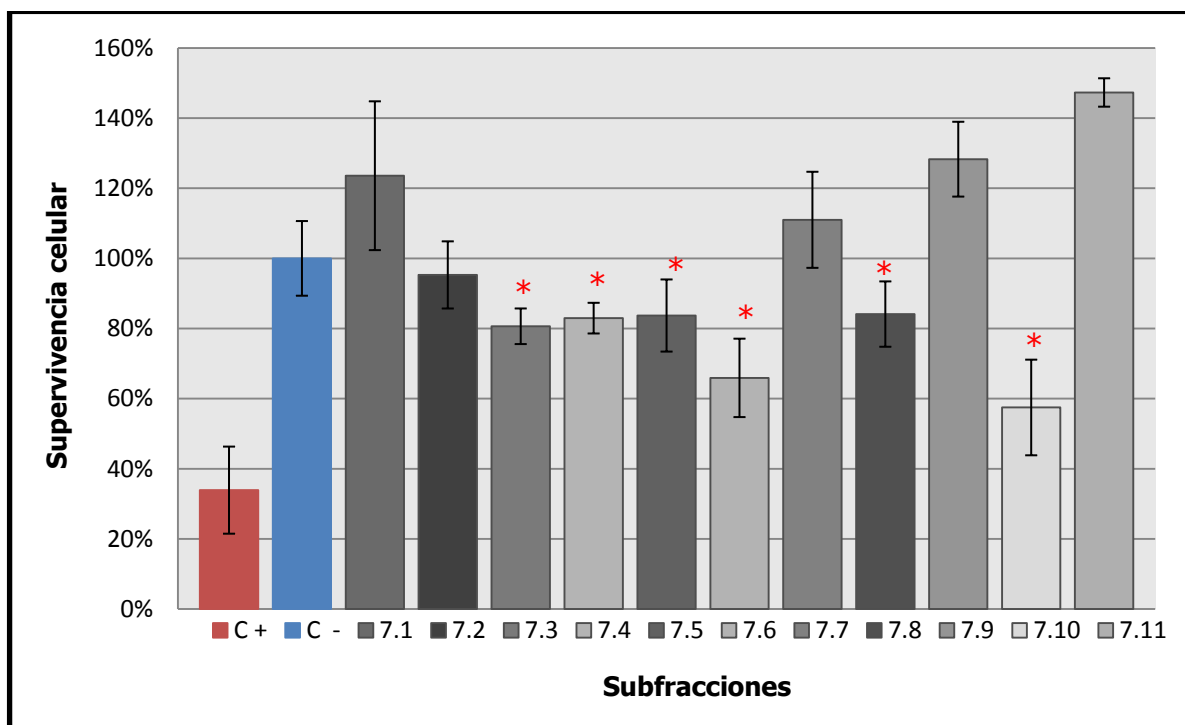


Figura 13. Efecto de las 11 subfracciones obtenidas en la repurificación por HPLC-RP de la veneno fracción 7 individual. Donde C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Cada fracción fue agregada a una concentración de 50 µg/ml. Las fracciones que presentaron diferencia significativa con respecto al control negativo se señalan con un asterisco color rojo, las barras de error indican la desviación estándar.

Tomando en cuenta los resultados del ensayo citotóxico de la fracción 7 individual, se prosiguió a realizar repurificaciones de cada subfracción que haya tenido un efecto disminuyendo desde un 16% la supervivencia celular de la línea LIM-1215. Las subfracciones 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.8 y 7.10 presentan una disminución del 19%, 17%, 16%, 34%, 16% y 43%, respectivamente, de la supervivencia celular. Sin embargo, se decidió seguir trabajando con la subfracción 7.8, debido a que las demás subfracciones se tenían en cantidades muy pequeñas, insuficientes para realizar la serie de repurificaciones necesarias para los siguientes ensayos citotóxicos.

7.5.2 Repurificación de la subfracción 7.8

El cromatograma de la subfracción 7.8, se muestra en la figura 14, donde se puede observar que se obtuvieron cinco subfracciones, las cuales se nombraron 7.8.N, donde 7.8 corresponde a la subfracción y N al número resultante de la repurificación.

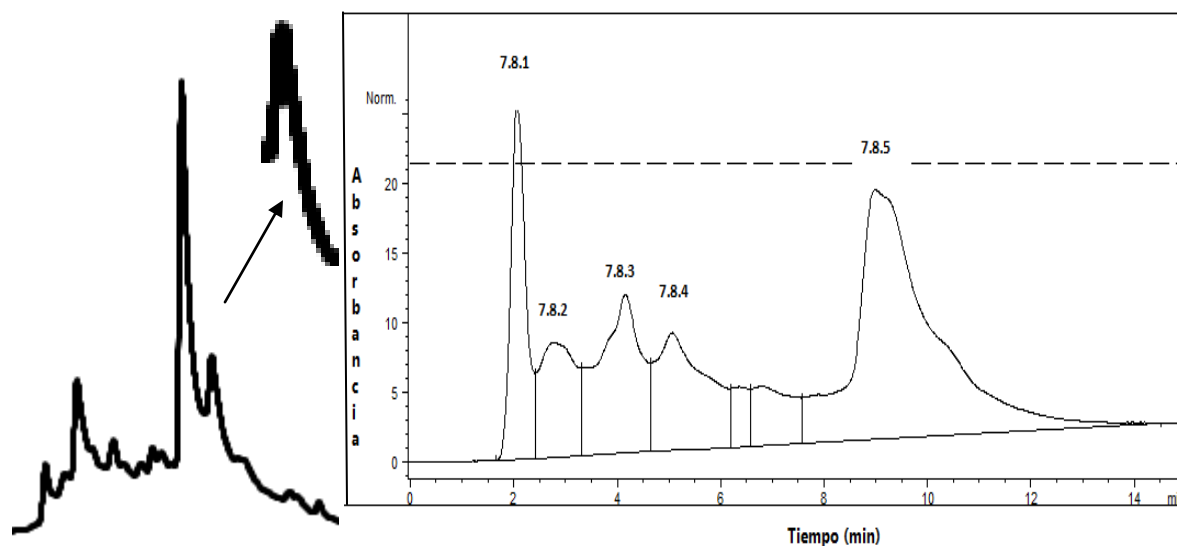


Figura 14. Derecha: Cromatograma de la fracción 7 individual con amplificación de la subfracción 7.8. Izquierda: Cromatograma de la subfracción 7.8, donde se muestra la línea punteada que pertenece al gradiente isocrático de 21.4% de solución B (Anexo 2). Cada pico individual obtenido está numerado en la parte superior.

Se procedió a realizar el ensayo citotóxico con las cinco subfracciones obtenidas en la repurificación, utilizando el mismo método descrito en el apartado 7.7. Cada ensayo de citotoxicidad realizado, tiene variaciones en la concentración de subfracciones, esto se basa dependiendo en la cantidad obtenida de cada una en las purificaciones o repurificaciones.

7.5.3 Ensayo citotóxico con la subfracción 7.8

Para realizar el ensayo de citotoxicidad de la subfracción 7.8 con LIM-1215, se tomaron los cinco subfracciones resultantes de la repurificación nombrados 7.8.1, 7.8.2, 7.8.3, 7.8.4 y 7.8.5, los cuales fueron agregados en una concentración de 13.5, 8.5, 24, 12, 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. En la figura 15, se muestran los resultados obtenidos.

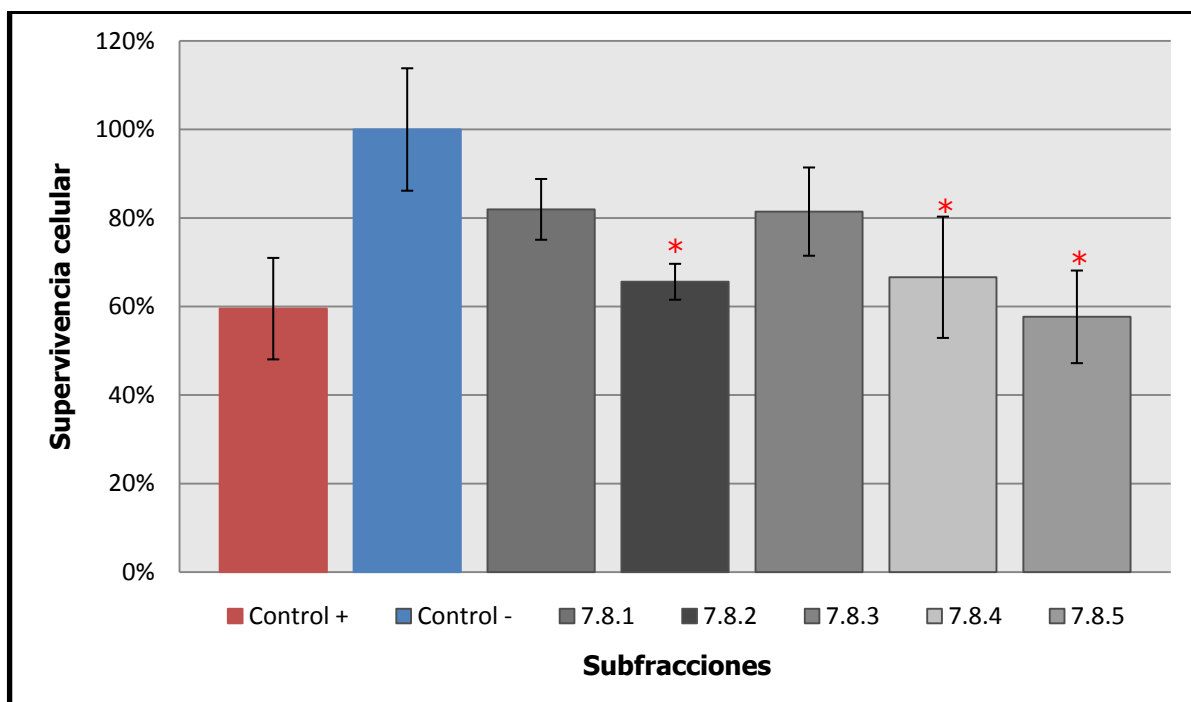


Figura 15. Efecto de las cinco subfracciones obtenidos en la repurificación de la subfracción 7.8, donde se observa que las subfracciones que presentan mayor actividad son 7.8.2, 7.8.4 y 7.8.5 al disminuir la supervivencia celular de la línea de cáncer de colon LIM-1215 en un 34%, 33% y 42% respectivamente. Las subfracciones que presentan diferencias estadísticamente significativas, con respecto al control negativo se señalan con un asterisco color rojo, las barras de error indican la desviación estándar.

7.6 Repurificación de la fracción 9 individual

Al repurificar la fracción 9 individual de la corrida de veneno total de *C. ximenes*, se obtuvieron siete subfracciones, las cuales fueron nombradas 9.N, donde N, es el número que corresponde a cada subfracción. En la figura 16, se muestra el cromatograma de la fracción

9 individual que corresponde a los minutos 40-45 de la corrida de veneno total así como la repurificación de dicha fracción.

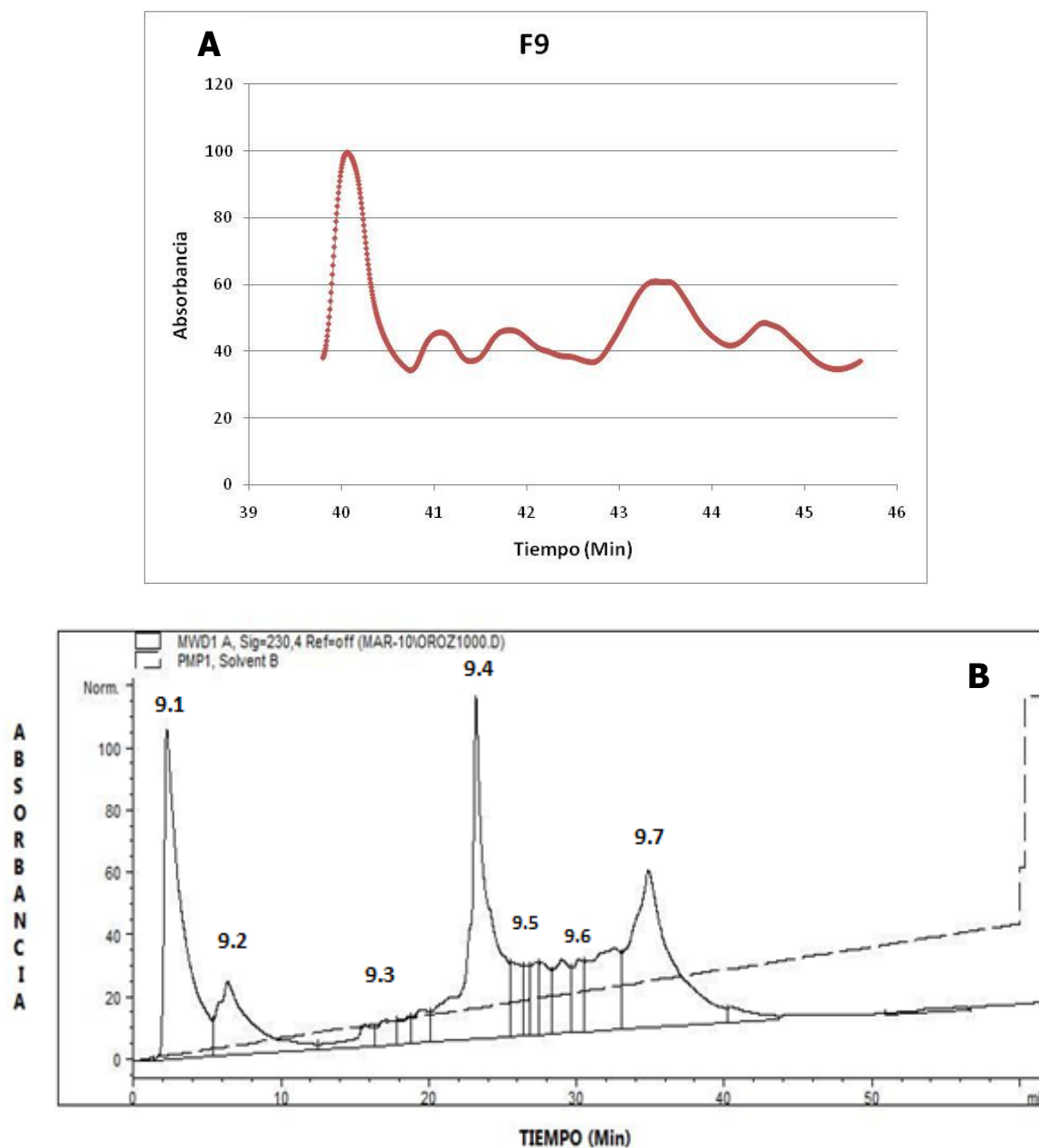


Figura 16. A) Cromatograma de la fracción 9 individual que corresponde a los minutos 40-45 de la corrida de veneno total de *C. ximenes*. B) Cromatograma de repurificación de la fracción 9 individual, donde se pueden observar las 7 subfracciones obtenidas, cada una numeradas en la parte superior.

Posterior a la repurificación se realizó el ensayo citotóxico con las 7 subfracciones obtenidas para conocer el efecto que tiene cada una de ellas sobre la línea de cáncer de colon LIM-1215. Las subfracciones fueron agregadas a concentraciones diferentes debido a la cantidad obtenida en la repurificación. En el ensayo de citotoxicidad se darán a conocer aquellas subfracciones que tengan mayor efecto las cuales serán repurificadas mediante de HPLC-RP para separar los componentes que al conforman si es que existe más de uno.

7.6.1 Ensayo citotóxico con las subfracciones de la fracción 9 individual

Las subfracciones obtenidas en la repurificación de la fracción 9 individual, fueron agregados a la placa de cultivo a una concentración de 50 µg/ml, al igual que en el ensayo citotóxico de la fracción 7 individual.

En la figura 17, se pueden observar los resultados obtenidos al realizar el ensayo de citotoxicidad de las siete subfracciones de la fracción 9 individual con LIM-1215 (cáncer de colon).

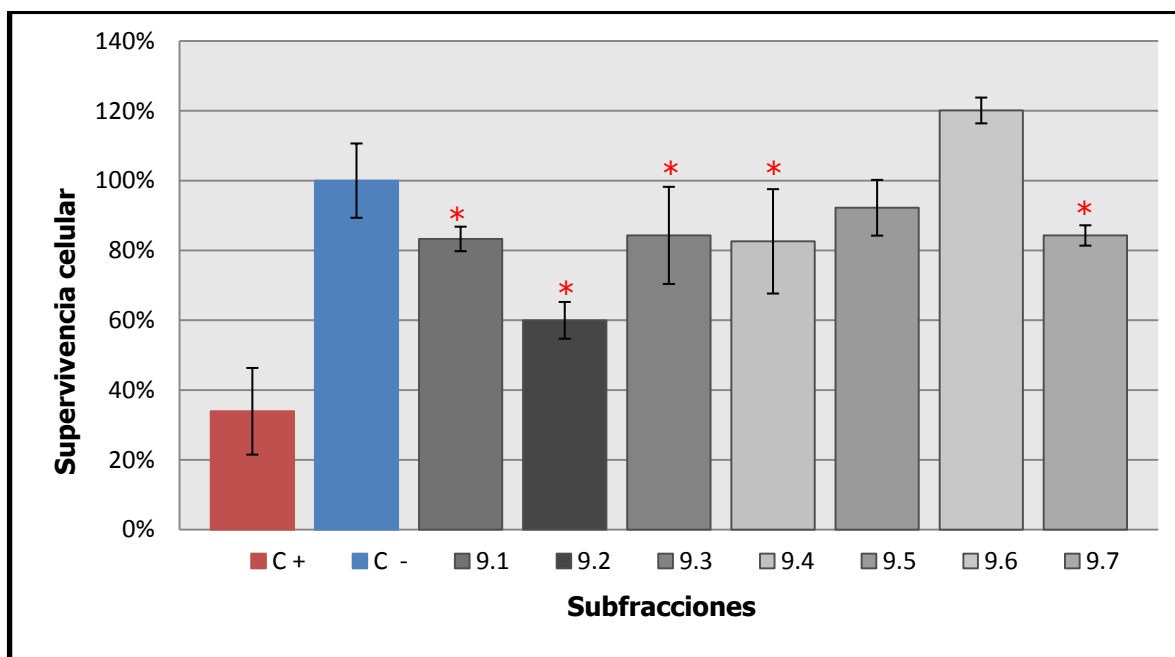


Figura 17. Efecto de las siete subfracciones sobre LIM-1215, donde se muestra que las subfracciones 9.1, 9.2, 9.3, 9.4 y 9.7 son las que presentan mayor actividad disminuyendo la supervivencia celular en un 17, 40, 16, 17 y 16% respectivamente. C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Cada subfracción fue agregada a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las subfracciones que presentaron diferencia significativa, con respecto al control negativo se señalan con un asterisco color rojo, las barras de error indican la desviación estándar.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, al observar que las subfracciones 9.1, 9.2, 9.3, 9.4 y 9.7 disminuían la supervivencia celular por lo menos en un 16%, de decidió repurificar cada una de ellas por medio de HPLC-RP para comprobar si existen o no más componentes dentro de cada subfracción. En este caso se repurificaron las subfracciones 9.1 y 9.7, las cuales disminuyen la supervivencia celular de LIM-1215 en un 17% y 16%, respectivamente. Para poder realizar la repurificación, se requieren aproximadamente 35 μg de cada subfracción, lo cual es sumamente difícil obtener. Por lo tanto, la decisión sobre cuáles subfracciones probar en el ensayo citotóxico se hizo bajo esta premisa.

7.6.2 Repurificación de la subfracción 9.1

En la figura 18, se puede observar la repurificación de la subfracción 9.1, se obtuvieron siete subfracciones, las cuales fueron nombradas de la siguiente manera: 9.1.N, donde N corresponde a cada subfracción obtenida.

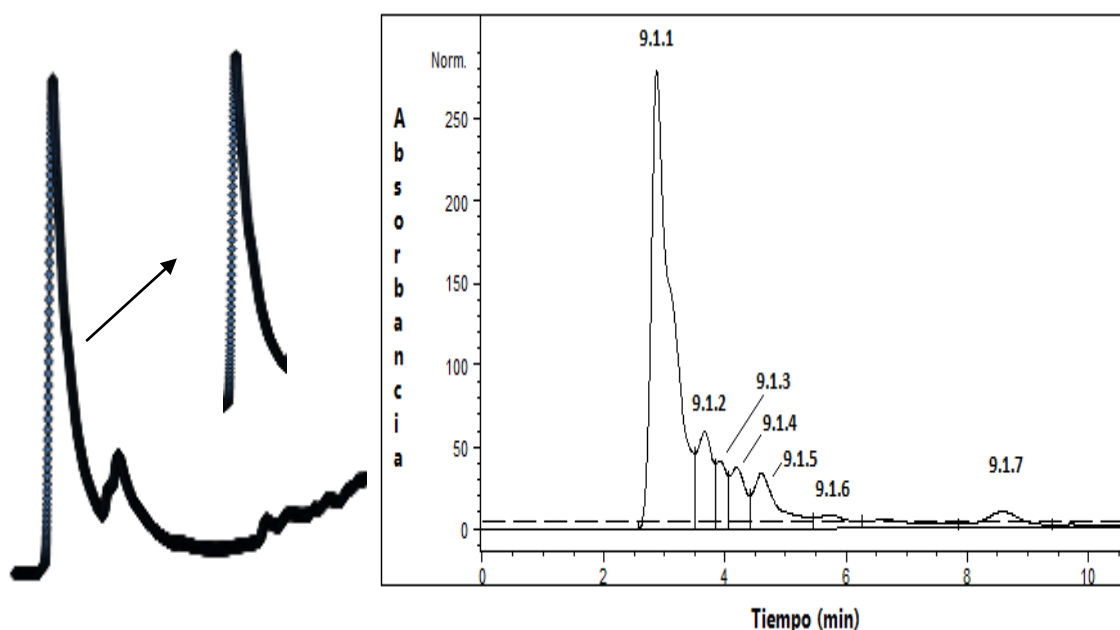


Figura 18. La imagen del lado derecho muestra el cromatograma de la repurificación de la fracción 9 así como la amplificación de la subfracción 9.1. La imagen de lado izquierdo muestra el cromatograma obtenido al purificar la subfracción 9.1, donde se pueden observar los 7 picos individuales, cada pico esta numerado en la parte superior.

El siguiente paso a realizar fue el ensayo citotóxico con cada una de las subfracciones obtenidos en la repurificación de la subfracción 9.1, para poder conocer el efecto que tienen estos sobre la línea celular de cáncer de colon utilizada (LIM-1215).

7.6.3 Ensayo citotóxico con la subfracción 9.1

Las siete subfracciones resultantes de la repurificación de la subfracción 9.1, fueron nombrados y agregados a la placa de cultivo de la siguiente manera.

Tabla III. Concentración de subfracciones en el ensayo de citotoxicidad.

Subfracción	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]
9.1	50
9.2	7.5
9.3	8
9.4	7
9.5	3.5
9.6	3
9.7	2.5

Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad, con las siete subfracciones obtenidas en la repurificación de la subfracción 9.1 en LIM-1215 se muestran en la figura 19.

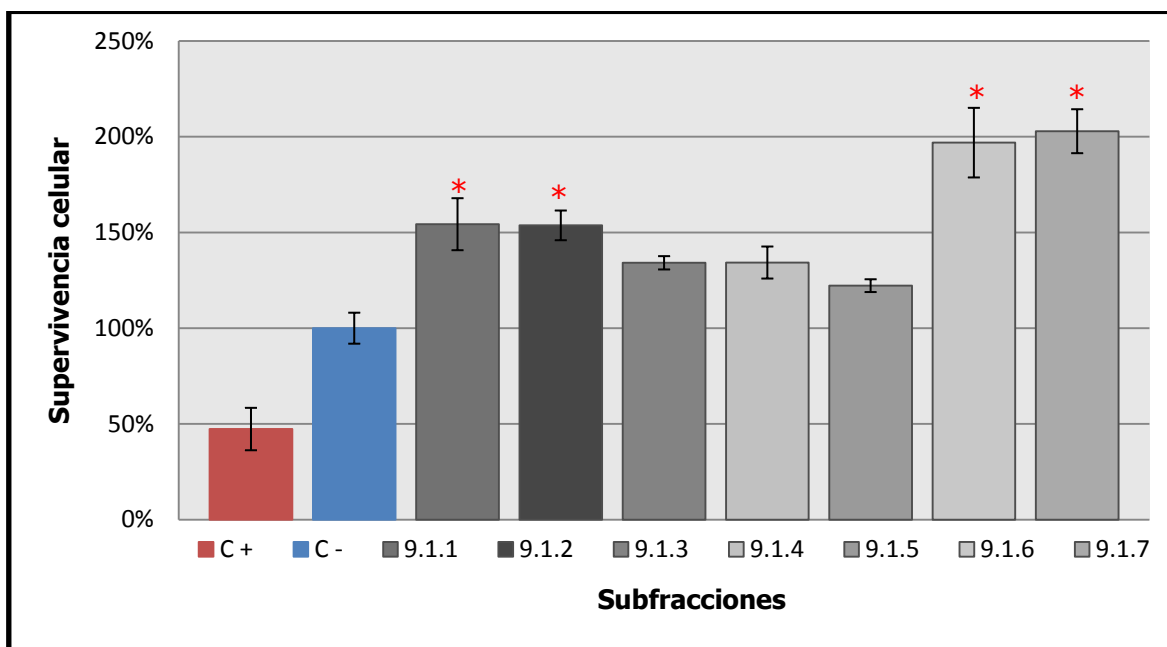


Figura 19. Efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación de la subfracción 9.1, las subfracciones que presentan mayor actividad aumentando la supervivencia celular de LIM-1215 son 9.1.1 en un 54% al igual que 9.1.2, 9.1.6 en un 97% y 9.1.7 en un 103%. C+ significa control positivo el cual es DMSO al 10% y C- significa control negativo el cual es agua destilada. Las subfracciones con diferencias estadísticamente significativas, con respecto al control negativo se señalan con un asterisco, las barras de error indican la desviación estándar.

7.6.4 Repurificación de la subfracción 9.7

Al repurificar la subfracción 9.7, se obtuvieron cuatro subfracciones, con las cuales se realizó un ensayo de citotoxicidad. Cada subfracción fue nombrada de acuerdo al tiempo de elución, 9.7.1, 9.7.2, 9.7.3 y 9.7.4. En la figura 20, se muestra el cromatograma.

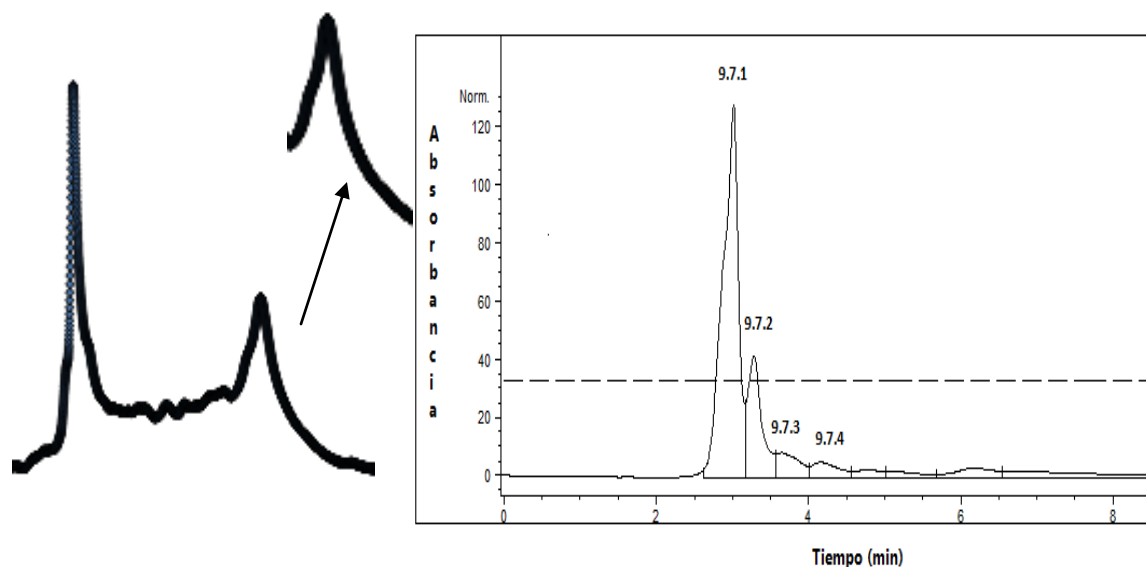


Figura 20. Derecha: Cromatograma de la fracción 9 individual, en el tiempo de elución del pico 9.7 así como una amplificación del mismo. Izquierda: Repurificación de la subfracción 9.7, donde se observan los 4 picos obtenidos.

De igual manera que la subfracción 9.1, se procedió a realizar un ensayo de citotoxicidad con las cuatro subfracciones obtenidas para conocer el efecto que tiene cada una de ellas contra la línea celular de cáncer de colon empleada. Ya que como se ha demostrado en los resultados obtenidos anteriormente cada subfracción tiene diferentes efectos.

7.6.5 Ensayo citotóxico de la subfracción 9.7

Las cuatro subfracciones obtenidas en la repurificación de la subfracción 9.7, se agregaron a diferentes concentraciones a la placa de cultivo en la cual se realizó el ensayo citotóxico. En la tabla II, se muestran las concentraciones de cada pico.

Tabla IV. Concentración de picos individuales en el ensayo de citotoxicidad.

Subfracción	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]
9.7.1	50
9.7.2	3.5
9.7.3	2.5
9.7.4	1.5

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo de citotoxicidad, de las cuatro subfracciones obtenidas en la repurificación de la subfracción 9.7 con LIM-1215, se muestran en la figura 21.

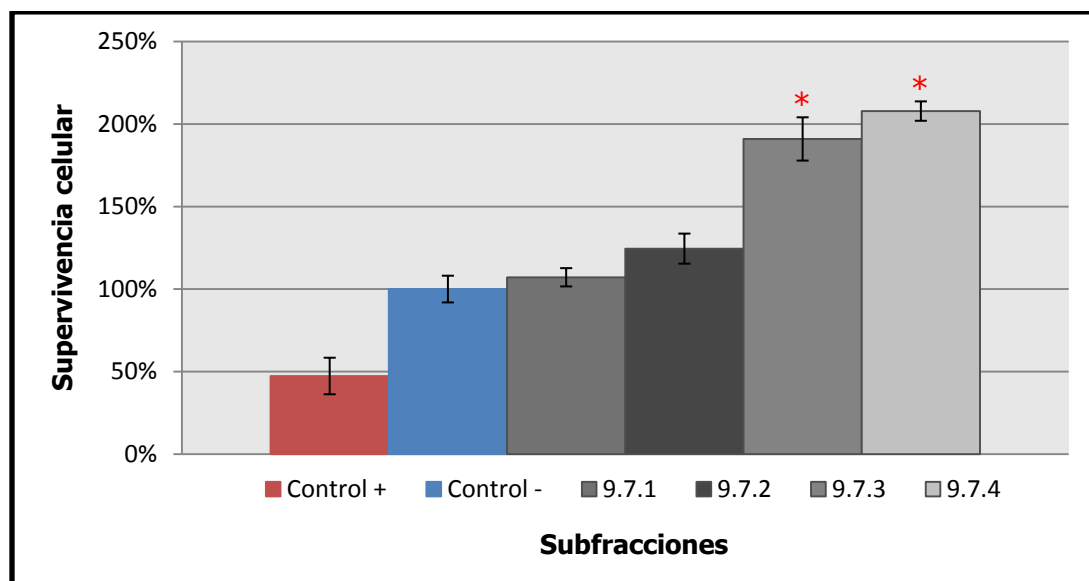


Figura 21. Efecto de las cuatro subfracciones obtenidos en la repurificación de la subfracción 9.7, las subfracciones que presentan mayor son 9.7.3 y 9.7.4 actividad aumentando la supervivencia celular de LIM-1215 en un 91% y 108%, respectivamente. Como control positivo se utilizó DMSO al 10% y como control negativo agua destilada. Las subfracciones con diferencias estadísticamente significativas, con respecto al control negativo se señalan con un asterisco, las barras de error indican la desviación estándar.

Se puede observar en las dos gráficas anteriores, las cuales pertenecen a los ensayos de citotoxicidad de la subfracción 9.1 y la subfracción 9.7, que se incrementa la supervivencia celular de LIM-1215 en vez de disminuirse, esto se puede asociar al resultado obtenido en un principio al realizar el ensayo de citotoxicidad con las 13 fracciones de veneno total, en donde las fracciones 7 y 9 individuales aumentaban la supervivencia celular hasta en un 100%. Con estos resultados se puede asumir que las fracciones del veneno trabajan de diferente manera al encontrarse en forma de veneno total o una vez separadas en subfracciones o picos individuales.

VIII. DISCUSIONES

El cromatograma de la purificación del veneno total de *C. ximenes* muestra la presencia de 45 componentes aproximadamente, esta cantidad es similar a la encontrada por Pitones, 2008, trabajo donde se reportaron 50 componentes en la purificación del veneno total de *Conus californicus*. El resultado obtenido en este trabajo está dentro del rango reportado por Wang y Chi en el 2004, donde se dice que aparentemente cada especie del género *Conus* contiene su propio repertorio que consta de 50 a 200 componentes diferentes. Sin embargo, como se esperaba, al realizar las repurificaciones de las fracciones individuales (7 y 9), se obtenían más subfracciones, por lo tanto, si se consideran las subfracciones que potencialmente se encuentran dentro de cada una de las 13 fracciones de veneno total, el número de componentes que se pudieran obtener, se acercan a los 200 componentes.

Al realizar el ensayo de citotoxicidad, con las 13 fracciones de veneno total de *C. ximenes*, se notó que las fracciones no disminuían la supervivencia celular de LIM-1215 de manera significativa, fue interesante el resultado obtenido con las fracciones individuales 7, 8 y 9, que presentaron un efecto contrario al esperado, aumentando la supervivencia celular en un 58%, 34% y 96%, respectivamente. Por estas razones, se decidió seguir trabajando con las fracciones individuales 7 y 9.

Está reportado que las toxinas que regulan los canales iónicos, pueden modular la supervivencia celular, pero no implica que ésta disminuya, también puede aumentar. La acción del veneno total puede actuar de manera diferente, a la que se presenta una vez que han sido separados los componentes del mismo, ya que cada componente tiene un blanco específico (Becker y Teralu, 2008).

En base a lo mencionado anteriormente, se puede suponer que en el veneno total se tienen componentes que actúan de manera antagonista, pero al purificarlo y separarlo en fracciones dicho antagonismo puede desaparecer o tener un efecto diferente ya sea mayor o menor.

Al repurificar las fracciones 7 y 9 individualmente, sus componentes tuvieron un efecto sobre LIM-1215 diferente, descrito en el primer ensayo de citotoxicidad. Esto se puede deber, como ya se mencionó anteriormente, a que los componentes del veneno total actúan de manera sinérgica y al ser separados o repurificados, el sinergismo se pierde y pueden actuar de diferente manera o de manera contraria. (Teraly y Olivera, 2004).

En el ensayo de la fracción 7 individual, se observó que las subfracciones 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.8 y 7.10, disminuían la supervivencia celular de LIM-1215, lo que demostró que al repurificar la fracción, los componentes pueden tener un efecto diferente, y se puede suponer que el sinergismo que se había presentado anteriormente se perdió, dando como resultado subfracciones que disminuyen la supervivencia celular desde 16% hasta 43%.

El ensayo de citotoxicidad en el que se probó la subfracción 7.8, mostró que las cinco subfracciones obtenidas de la repurificación, disminuían la supervivencia celular hasta en un 42%, por lo tanto, los resultados coinciden con el ensayo anterior, es decir, los componentes de la subfracción 7.8 siguen disminuyendo la supervivencia celular, al contrario que en el ensayo con las 13 fracciones de veneno total.

Con los resultados obtenidos de la fracción 7 individual y la subfracción 7.8, se observó que al repurificar la fracción 7, ésta perdió su sinergismo y actuó de manera diferente logrando disminuir la supervivencia celular de LIM-1215, y siguió con esta propiedad en todos los ensayos realizados. Con estos resultados, se vuelve a comprobar que los componentes del veneno se desempeñan en cabales cuando no están separados, y al separarlos o purificarlos éstos pueden tener un efecto diferente (Teralu y Olivera, 2004). Lo cual facilita la búsqueda del componente, que está teniendo el efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer.

Con respecto a la fracción 9 individual, se probaron las siete subfracciones resultantes de la repurificación, y se observó que la mayoría disminuye la supervivencia celular de LIM-1215 desde 16% hasta 40%, corroborando con los resultados anteriormente descritos. Esto es de sumo interés, ya que la fracción 9 individual presentó un aumento del 96%, en el primer ensayo de citotoxicidad realizado.

Al realizar el ensayo con la subfracción 9.1, se observó que todas las subfracciones aumentaban la supervivencia celular de LIM-1215, desde 54% hasta 103%. Haciéndose notar las subfracciones 9.1.6 y 9.1.7 ya que aumentan la supervivencia en 97% y 103%, respectivamente. Estos resultados, se asumen a lo que se ha venido mencionando. En el caso de la subfracción 9.1, ésta aumenta la supervivencia, como se observó en el primer ensayo con la fracción 9 individual. Esto se puede deber a que dentro de la subfracción 9.1, existen componentes capaces de aumentar la supervivencia, los cuales solo mostraron su efecto una vez que fueron separados, es decir, probados individualmente.

A pesar de estas suposiciones a base de los resultados obtenidos, y los que ya han sido reportados, se desconoce sobre qué canal iónico estén actuando los componentes presentes en la subfracción 9.1, y por consiguiente, se desconoce el mecanismo por el cual se estimula de tal manera la supervivencia celular.

En el ensayo de citotoxicidad de la subfracción 9.7, se observó que las cuatro subfracciones obtenidas en la repurificación, aumentaban la supervivencia celular, destacando las subfracciones 9.7.3 y 9.7.4 las cuales aumentan la supervivencia en 91% y 108%, respectivamente. Los resultados observados son los mismos que se presentan en el ensayo anterior, comprobando que dentro de la fracción 9 individual, existen componentes que aunque sean separados o purificados no modifican su actividad, la cual consiste en aumentar la supervivencia celular.

El hecho de que el resultado sea contrario al esperado, no descarta el interés sobre estas subfracciones, ya que se desconoce el mecanismo mediante el cual son capaces de alterar la división celular.

Se desconoce sobre qué canales estén actuando cada una de las subfracciones que se encontraron en este trabajo, sin embargo, varios autores han reportado que los canales de potasio dependientes de voltaje EAG, están directamente relacionados con cáncer y se expresan en varias células tumorales incluyendo las células de cáncer de colon (Neimeyer *et al*, 2001; Becker y Teralu, 2008; Camacho, 2005; Hemmerlein *et al*, 2006).

Se han caracterizado tres conotoxinas que bloquean canales iónicos de potasio éstas son: κ -conotoxinas, κ M-conotoxinas y κ A-conotoxinas, la primera pertenece a la superfamilia O, la segunda a la superfamilia M y la tercera a la superfamilia A (McIntosh *et al*, 1999; Teralu y Olivera, 2004). Se identificaron tres conotoxinas de la superfamilia I, bloqueadores de canales iónicos de potasio, siendo éstas, ViTx aislada de *Conus virgo*, K-BtX aislada de *Conus betulinus* y sr11a aislada de *Conus spurius* (Norton y Olivera, 2006; Aguilar *et al*, 2010), además de 2 conotoxinas: pI14 aislada de *Conus planorbis* y Conk-S1 aislada de *Conus striatus* (Aguilar *et al*, 2010). En total suman ocho conotoxinas que han sido caracterizadas como bloqueadoras de diferentes canales iónicos de potasio.

Es posible que las subfracciones 7.8.2, 7.8.4 y 7.8.5, que tuvieron un mayor efecto disminuyendo la supervivencia celular de LIM-1215, pertenezcan una de las familias de conotoxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio, mencionadas anteriormente. Esto es solo una suposición ya que para comprobarlo, se requiere un análisis más a fondo de cada uno de los picos individuales, empezando por conocer a que naturaleza pertenecen, es decir, conocer si son de naturaleza péptidica o no.

IX. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que, dentro del veneno del caracol marino *Conus ximenes*, existen varios componentes capaces de actuar sobre los canales iónicos de las células de cáncer de colon (LIM-1215), para disminuir o incrementar la división celular.

Los componentes 7.8.2, 7.8.4 y 7.8.5, aislados de la subfracción 7.8, tienen la capacidad de disminuir la supervivencia celular hasta en un 42%, por lo tanto, estos componentes pueden ser un buen candidato farmacológico.

Los componentes 9.1.1, 9.1.2, 9.1.6 y 9.1.7, repurificados de la subfracción 9.1, y los componentes 9.7.3 y 9.7.4, repurificados de la subfracción 9.7, tienen la capacidad de aumentar la supervivencia celular, hasta en un 108%, lo cual los convierte en herramientas moleculares, para el estudio de la regulación del ciclo celular.

Es importante mencionar que en todos los ensayos de citotoxicidad realizados con las subfracciones 7.8, 9.1 y 9.7, se utilizó muy poca concentración ($\mu\text{g/ml}$), por lo tanto, se puede concluir que los componentes presentes en cada subfracción son altamente potentes.

X. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, M. B., Pérez-Reyes, L. I., López, Z., Heimer de la Cotera, E. P., Falcón, A., Ayala, C., Galván, M., Salvador, C. y Escobar, L. I. 2010. **Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels.** *Peptides*. 31: 1287-1291.

Becker, S. y Teralu, H. 2008. **Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production.** *Appl Microbiol Biotechnol*. 79: 1-9.

Bulaj, G. y Olivera, B. M. 2008. **Folding of Conotoxins: Formation of the Native Disulfide Bridges During Chemical Synthesis and Biosynthesis of *Conus* Peptides.** *Antioxidants & Redox Signaling*. 10 (1): 141-155.

Buzcek, O., Bulaj G. y Olivera, B. M. 2005. **Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products.** *Cell. Moll. Life. Sci*. 62: 3067- 3079.

Camacho, J., 2006. **Ether a go-go potassium channels and cáncer.** *Cancer Letters*. 233: 1-9.

Fraser, S. P., Diss, J. K. J., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan H., Ramaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Karsowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., Tamburo, De Bella, M., Slade M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D. S., Coombes, R. C. y Djamgoz, M. B. A. 2005. **Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis.** *Clin Cancer Res*. 11 (15): 5381-5389.

González-Villarreal, L. M. 2005. **Guía ilustrada de los gasterópodos marinos de la Bahía de Tenacatita, Jalisco, México.** *Scinetia-CUCBA*. 7 (1): 1-84.

Gruber, A. D. y Pauli, B. U. 1999. **Tumorigenicity of Human Breast Cancer Is Associated with Loss of the Ca²⁺- activated Chloride Channel CLCA21.** *Cancer Reseach.* 59: 5488-5491.

Gurrola, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza A., Arcangeli, A. R., Olivotto, M., Possani, L. D. y Wanke, E. 1999. **A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom.** *The FASEB Journal.* 13: 953-962.

Halstead, B.W. 1988. **Phylum Mollusca: Snails, Bivalves, Octopuses, etc. Poisonous and Venoms Marine Animals of the World.** The Darwin Press inc Priceton. 2da Edición, New Jersey. 243-262 pp.

Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Mello de Queiroz, F., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E, Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Radzun, H. J., Stühmer, W. y Pardo, L. 2006. **Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours.** *Molecular Cancer.* 5: 41.

Jongsma, H. J. y Wilders, R. 2001. **Kir2.1 Mutations jeopardize many cell functions.** *Current Biology.* 11: 747- 750.

Jones, R. M., Bulaj, G. 2000. **Conotoxins - New vistas for peptide therapeutics.** *Current Pharmaceutical Design.* 6: 1249-1285.

Juárez, K. O. 2005. **Caracterización electrofisiológica del veneno del caracol marino *Conus californicus* en canales iónicos de potasio.** Tesis de Maestría. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.* Ensenada, B.C. México. 157 pp.

Kohn, A. J., Nybakken, J. W. y Mool V. 1972. **Radula Tooth Structure of the Gasteropod *Conus imperialis***. *Science*. 176: 49-51.

Lang, F., Föllner, M., Lang, K., Lang, P., Ritter, M., Vereninov, A., Szabo, I., Huber, S. y Gulbins, E. 2007. **Cell Volume Regulatory Ion Channels in Cell Proliferation and Cell Death**. *Methods in enzymology*. 428 (11): 209-218.

Liu, Y., Cai, B., Yang, L. y Jiang, X. 2008. **One potential new target of cáncer therapy mitochondrial ATP-sensitive potassium channels**. *Bioscience Hypotheses*. 1: 174-175.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, A. C., Krieger, M., Scott, P. M., Zipursky, L. S. y Darnell, J. 2005. **Biología Celular y Molecular**. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana. 7: 245-300.

Marshall, J., Kelley, W. P., Rubakhin, S. S., Bingham, J. P., Sweedler, J. V. y Gilly, W. F. 2002. **Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus***. *Biol. Bull.* 203: 27-41.

McIntosh, J. M. y Jones, R. M. 2001. **Cone venom – from accidental stings to deliberate injection**. *Toxicon*. 39: 1447-1451.

McIntosh, J. M., Santos, A. D. y Olivera B. M. 1999. **Conus Peptides Targeted to Specific Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes**. *Annual Review of Biochemistry*. 68: 59-88.

Neimeyer, B. A., Mery, L., Zawar, C., Suckow, A., Monje, F., Pardo, L. A., Stühmer, W., Flockerzi, V. y Hoth, M. 2001. **Ion channels in healt and disease: 83rd Boehringer Ingelheim Fonds International Titisee Conference**. *Embo Reports*. 2 (7): 568-573.

Nilius, B., Prenen, J., Vennekens, R., Hoenderop, J. G. J., Bindels, R. J. M. y Droogmans, G. 2001. **Pharmacological modulation of monovalent cations currents through the epithelial Ca²⁺ channel ECaC1**. *British Journal of Pharmacology*. 134 (3): 453-462.

Norton, R. S. y Olivera, B. M. 2006. **Conotoxins down under**. *Toxicon*. 48: 780-798.

Olivera, B. M. 1997. **Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology**. *Molecular Biology of the Cell*. 8: 2101-2109.

Olivera, B. M. 2006. **Conus Peptides, Biodiversity-Based Discovery and Exogenomics**. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (42): 31173-31177.

Olivera, B. M., Cruz, L. J. 2000. **Conotoxins, in retrospect**. *Toxicon*. 39: 7-14.

Pardo, L. A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S. y Stühmer, W. 1999. **Oncogenic potential of EAG K⁺ channels**. *The EMBO Journal*. 18 (20): 5540-5547.

Pitones, R. S., 2009. **Identificación y Caraterización de los Componentes Citotóxicos del Veneno del Caracol *Conus Californicus* sobre Diferentes Líneas Celulares de Cáncer**. Tesis de Maestría. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada*. Ensenada, B.C. México. 68 pp.

Remigio, E. A. y Duda, T.F. 2008. **Evolution of ecological specialization and venom of a predatory marine gastropod**. *Molecular Ecology*. 17: 1156-1162.

Teralu, H. y Olivera, B. M. 2004. **Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides**. *Physiol Rev*. 84: 41-68.

Tucker, J. K. 1985. **Conus ximenes and C. mahogani: two similar but distinct species**. *Shells and Sea Life*. 17(6):201-202.

Wang, C. Z. y Chi, C. W. 2004. **Conus Peptides – A rich pharmaceutical Treasure.** *Biophysica Sinica*. 36 (11): 713-723.

Wissenbach, U., Niemeyer, B., Fixemer, T., Schneidewind, A., Trost, C., Cavalie, A., Reus, K., Meese, E., Bonkhoff, H. y Flockerzi, V. 2001. **Expression of Cat-like, a Novel Calcium-selective Channel, Correlates with the Malignancy of Prostate Cancer.** *J. Biol. Chem.* 276: 19461-19468.

Páginas web:

<http://www.inegi.org.mx>

<http://www.who.com>

<http://www.schnr-specimen-shells.com/ximenes50mm.jpg>

<http://biology.burke.washington.edu/conus/recordview/record.php?ID=244211&tabs=51010111&frms=1&res=gallst&pglimit=>

XI. ANEXOS

Soluciones para HPLC**Anexo 1**

- Solución A

Compuesto	Porcentaje en solución
Ácido trifluoracético	0.12
Agua destilada	99.88

Anexo 2

- Solución B

Compuesto	Porcentaje en solución
Acetonitrilo	0.1
Ácido trifluoracético	99.99

Anexo 3

- Solución C

Compuesto	Porcentaje en solución
Acetonitrilo	40
Ácido trifluoracético	0.12
Agua destilada	59.88

Soluciones para cultivo celular

Anexo 4

- PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)

Compuesto	Concentración (mM)	Cantidad (g)
NaCl	137	80
KCl	2.7	2
Na ₂ HPO ₄	12	17
KH ₂ PO ₄	1.2	1.63

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