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



# Programa de Posgrado en Ciencias en Ciencias de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina

## Caracterización biológica de conotoxinas capaces de modular la supervivencia celular en diferentes líneas celulares de cáncer

Tesis

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

Presenta:

Irasema Oroz Parra

Ensenada, Baja California, México 2016 Tesis defendida por

### Irasema Oroz Parra

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

Director de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez Miembro del comité Dr. Genaro Pimienta Rosales Miembro del comité Dr. Mario Fco. Navarro Armenta Miembro del comité Dr. José Estuardo López Vera Miembro del comité



Dr. Clara Elizabeth Galindo Sánchez Coordinador del Posgrado en Ciencias en Ciencias de la vida

**Dr. Rufina Hernández Martínez** Director de Estudios de Posgrado

Irasema Oroz Parra © 2016 Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor Resumen de la tesis que presenta **Irasema Oroz Parra** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencia de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina.

## Caracterización biológica de conotoxinas capaces de modular la supervivencia celular en diferentes líneas celulares de cáncer

Resumen aprobado por:

#### Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro Director de tesis

El cáncer es la primer causa de muerte a nivel mundial. Siendo el cáncer de pulmón el tipo más común de este padecimiento en hombres y mujeres, con un índice a nivel mundial de un millón de muertes por año. El veneno de los caracoles marinos Conus, contiene hasta 200 compuestos farmacológicamente activos, dichos compuestos conocidos como conotoxinas tienen como blancos moleculares numerosos receptores en la membrana celular. Debido a la diversidad y a la especificidad que ofrecen, las conotoxinas poseen un gran potencial como fuente para desarrollar nuevos fármacos para combatir el cáncer. En este trabajo, se realizó la búsqueda de componentes citótoxicos dentro del veneno total de las especies Conus ximenes y Conus californicus, logrando encontrar dentro de la primera especie, componentes que disminuyen la supervivencia celular de las líneas de cáncer de pulmón H1299, H1975 y H661 hasta en un 60%. A su vez, se analizaron con dos péptidos sintéticos de 17 aminoácidos basados en los péptidos nativos de C. californicus (cal14.1a y cal14.1b) y un péptido sintético de 13 aminoácidos proveniente de C. ximenes (xm1b). Se demostró que los tres péptidos sintéticos tienen un efecto citotóxico al disminuir el 30% de la supervivencia celular, de las líneas H1299, H1437, H1975 y H661 de cáncer de pulmón. Además, se identificó el patrón de expresión de genes involucrados en la regulación de apoptosis BAX, Bcl-2, NFkB-1 y COX-2, y la activación de las proteasas clave en la ejecución de la apoptosis, caspasa-3 y -7 en respuesta a los péptidos. Los péptidos cal14.1a y xm1b disminuyeron significativamente la expresión del gen NFkB-1 en las líneas H1299, H1437 y H1975, y COX-2 en el caso de H1437. Ambos péptidos, activaron las caspasa-3 y -7 en las líneas H1299 y H1437. Cal14.1ª y xm1b, muestran resultados satisfactorios para el tratamiento del cáncer de pulmón y por primera vez se reporta un posible mecanismo de acción.

**Palabras clave:** conotoxinas, apoptosis, cáncer de pulmón, caspasa-3 y -7, genes relacionados en la apoptosis

Abstract of the thesis presented by **Irasema Oroz Parra** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

# Biological characterization of conotoxins that can modulate cell viability of various cancer cell lines

Abstract approved by:

#### Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro Director de tesis

Cancer is the most death-related disase. Lung cancer is one of the most common types of cancer in men and women and a leading cause of death worldwide resulting in more than one million deaths per year. The venom of marine snails Conus contains up to 200 pharmacologically active compounds that target several receptors in the cell membrane. Due to their diversity and specific binding properties, Conus toxins hold great potential as source of new drugs against cancer. In this work, the screening of cytotoxic compounds in the venom of Conus ximenes and Conus californicus was performed. In the species C. ximenes we found compounds that reduce the cell viability up to 60%. Further, we analyzed the cytotoxic effect of two a 17-amino acid synthetic peptide (cal14.1a y cal14.1b) that are based on a native toxin isolated from the sea snail Conus californicus and another peptide of 13-amino acid based on Conus ximenes (xm1b). Cytotoxicity studies in four lung cancer cell lines were complemented with measurement of gene expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, BAX and the pro-survival proteins NFkB-1 and COX-2, as well as quantification of caspase activity. Our results showed that H1299, H1437 and H1975 cell lines treated with cal14.1a and xm1b had decreased cell viability, activated caspases, and reduced expression of the pro-survival protein NFkB-1 and COX-2 in H1437. To our knowledge, this is the first report describing activation of apoptosis in human lung cancer cell lines by Conus synthetic peptides (cal14.1a and xm1b) and we offer insights as the possible mechanism of action.

**Keywords:** conotoxins, apoptosis, lung cancer, caspase-3 and -7, apoptotic-related genes

## Dedicatoria

A mi madre

Por ser el pilar de mi vida y apoyarme en todos los aspectos siempre. Esto es gracias a ti, una manera de regresarte un poco de lo mucho que me has dado. Te amo.

#### Agradecimientos

A CONACYT, por otorgarme beca para la manutención personal durante la realización de este proyecto.

A CICESE, por permitirme ser parte del posgrado y apoyarme durante todo el proceso.

Al Dr. Alexei F. Licea Navarro, por permitirme formar parte de su grupo laboral y darme su apoyo incondicional durante todos estos años.

A los miembros del comité, Dra. Clara E. Galindo Sánchez, Genaro Pimienta Rosales, Mario Navarro Armenta y José E. López Vera. Por sus valiosas aportaciones para concluir este trabajo.

A los técnicos del laboratorio, Hanna, Sam y Ricardo. Por aguantar toda la lata que les di estos años, ayudarme y apoyarme con todas las dudas. Y sobre todo, por ser más que compañeros de trabajo, grandes amigos.

A mis queridas changas, Andrea y Leonora. Por ser mi paño de lágrimas y darme apoyo cada vez que quería renunciar. Son las mejores amigas que cualquier persona pudiese tener.

A mi gran amigo Félix, por resolver todas mis dudas aún cuando hago las mismas preguntas, por estar ahí siempre a pesar de la distancia. Te quiero mucho.

A todos mis compañeros de trabajo, en especial a Junior (Salvador) y Jahaziel, por ayudarme con todos mis problemas informáticos y ser tan buenos compañeros.

A mi familia, por estar ahí en las buenas y en las malas. Los amo a todos.

Gracias a todos.

## Tabla de contenido

## Página

Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	х
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1 Características de los caracoles del género Conus	3
2.2 Generalidades de las especies Conus ximenes y Conus californicus.	6
2.3 Blancos moleculares de la conotoxinas	8
2.4 Características de los nAChRs y su rol potencial en el cáncer	11
2.5 Funcionamiento e importancia del cáncer	14
2.6 Apoptosis y genes involucrados en el proceso	16
Capítulo 3. Justificación	19
Capítulo 4. Hipótesis	20
Capítulo 5. Objetivos	
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos particulares	21

## Capítulo 6. Metodología

6.1 Organismos, extracción de veneno y cuantificación de proteína del extracto	22
6.2 Purificación por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP)	23
6.3 Repurificación de fracciones de veneno total por HPLC-RP	23
6.4 Cultivo de líneas celulares de cáncer	24
6.4.1 Preparación de material y equipo	24
6.4.2 Cultivo de líneas celulares	24
6.4.3 Desprendimiento de líneas celulares	25
6.4.3.1 Mantenimiento y expansión del cultivo	25
6.4.3.2 Conteo celular	25
6.4.4 Criopreservación de líneas celulares	26
6.5 Ensayos citotóxicos	26
6.6 Análisis de genes por PCR de tiempo real (RT-PCR)	27
6.6.1 Extracción de ARN total de cada línea celular	27
6.6.2 Retrotranscripción del ARN obtenido	28
6.6.3 Validación de oligonucleótidos por RT-PCR	28
6.6.4 Análisis de resultados de RT-PCR	30
6.7 Ensayos in vitro de imagen por fluorescencia	30

### Capítulo 7. Resultados

7.1 Colecta de organismos y extracción de veneno	32
7.2 Cultivo de líneas celulares de cáncer	32
7.3 Purificación del veneno total de <i>C. ximenes</i>	33
7.4 Ensayos de citotoxicidad en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón con las fracciones del veneno total de <i>C. ximenes</i>	34

7.5 Repurificación de las fracciones de <i>C. ximenes</i> y ensayos de citotoxicidad con las subfracciones obtenidas	36
7.5.1 Fracción 5	36
7.5.2 Fracción 6	38
7.5.3 Fracción 7	41
7.5.4 Fracción 8	43
7.5.5 Fracción 9	45
7.5.6 Fracción 12	47
7.6 Purificación del veneno total de <i>C. californicus</i>	49
7.7 Ensayos de citotoxicidad en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón con las fracciones del veneno total de <i>C. californicus</i>	50
7.8 Péptidos sintéticos basados en las secuencias de los péptidos nativos de los <i>Conus ximenes</i> y <i>Conus californicus</i>	51
7.9 Ensayo de citotoxicidad con péptidos sintéticos en líneas celulares de cáncer de pulmón	52
7.10 Análisis de la expresión de subunidades de nAChRs	55
7.11 Análisis de la expresión de genes relacionados con apoptosis	56
7.12 Activación de caspasa-3 y -7 en células de cáncer de pulmón	60

## Capítulo 8. Discusión de resultados

8.1	Componentes citotóxicos dentro del veneno de los caracoles Conus ximenes y Conus californicus	66
8.2	Características de los péptidos sintéticos cal14.1a, cal14.1b y xm1b	67
8.3	Efecto citotóxico de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón	72
8.4	Genes relacionados en la apoptosis como reguladores de la muerte celular	75
8.5	Activación de las caspasa-3 y 7 por acción de los péptidos cal14.1a, cal14.1b y xm1b	79

Capítulo 9. Conclusiones	81
Lista de referencias bibliográficas	82
Anexos	
Anexo 1	96
Anexo 2	97
Anexo 3	98
Anexo 4	99
Anexo 5	100

ix

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema del aparato venenoso de los caracoles Conus	4
2	Clasificación de las conotoxinas	6
3	Morfología de Conus ximenes	7
4	Morfología de la concha de Conus californicus	8
5	Estructura de los nAChRs	12
6	Modelo de las vías de señalización mediadas por los nAChRs en cáncer de pulmón	13
7	Principales vías de la apoptosis	17
8	Fotografía de células de cáncer de pulmón	33
9	Purificación del veneno total de C. ximenes por RP-HPLC	34
10	Efecto citótoxico de 13 fracciones de veneno total de <i>C. ximenes</i>	35
11	Cromatograma de la repurificación de la fracción 5	37
12	Efecto citótoxico de subfracciones de la fracción 5 de C. ximenes	37
13	Cromatograma de la repurificación de la fracción 6	39
14	Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 6 de <i>C. ximenes</i> con la línea celular H1975	40
15	Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 6 de <i>C. ximenes</i> en la línea H661	41
16	Cromatograma de la repurificación de la fracción 7	42
17	Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 7 de <i>C. ximenes</i>	43
18	Cromatograma de la repurificación de la fracción 8	44
19	Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 8 de <i>C. ximenes</i>	45
20	Cromatograma de la repurificación de la fracción 9	46

21	Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 9 de <i>C. ximenes</i>	
22	Cromatograma de la repurificación de la fracción 12	48
23	Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 12 de <i>C. ximenes</i>	48
24	Purificación del veneno total de C. californicus por RP-HPLC	49
25	Efecto citótoxico de 13 fracciones de veneno total de <i>C. californicus</i>	51
26	Efecto citotóxico de 12 péptidos sintéticos en la supervivencia celular	53
27	Efecto citotóxico de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en la supervivencia celular	54
28	Expresión de subunidades de nAChRs	56
29	Perfil de expresión de ARNm de BAX, Bcl-2, NFκB-1 y COX-2 en A) H1299, B) H1437, C)H1975 y D) H661	59
30	Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H1299	62
31	Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H1437	63
32	Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H1975	64
33	Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H661	65
34	Posible mecanismo de acción de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en las líneas de cáncer de pulmón H1299, H1437, H1975 y H661	78

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Canales iónicos involucradas en cáncer	9
2	Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los análisis de expresión de genes por RT-PCR y clave de acceso a base de datos (GenBank database) o referencia	29
3	Esquema de repurificación de las fracciones de C. ximenes	36
4	Lista de péptidos sintéticos	52
5	Comparación de secuencias de cal14.1a y cal14.1b con diferentes α-conotoxinas	68

### Capítulo 1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y durante los últimos años se ha considerado como una de las enfermedades más peligrosas para los humanos. La incidencia y mortalidad a causa de ésta enfermedad se ha incrementado notablemente con el paso de los años (www.who.int).

El cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más comunes, sigue siendo el líder de las muertes a causa de esta enfermedad y representa el 15% de todos los casos a nivel mundial (M. R. Improgo, Tapper, & Gardner, 2011; Ma et al., 2014). A pesar de todos los esfuerzos para avanzar en los procedimientos quirúrgicos, radioterapia y quimioterapia, la tasa de sobrevivencia de 5 años para los pacientes con cáncer de pulmón ha permanecido constante en las últimas tres décadas y persiste en el mínimo del 15% (Reina Improgo, Soll, Tapper, & Gardner, 2013; H. Zhang, Zhang, & Wu, 2015). Por estas razones, hay un énfasis cada vez mayor en las estrategias para maximizar el control del crecimiento tumoral, prolongar la supervivencia, minimizar los efectos secundarios de la quimioterapia y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Haque et al., 2015).

La muerte celular programada o apoptosis, es un proceso biológico vital de los organismos multicelulares (Korbakis & Scorilas, 2012). La desregulación del proceso de apoptosis, ya sea por la pérdida de señales proapoptóicas o por ganar señales antiapoptóticas, puede dar lugar al inicio, desarrollo y progresión del cáncer. Y es posible que esto resulte en fallas en la respuesta a terapias (Zheng et al., 2013). La eliminación de las células cancerosas del cuerpo depende de la activación de la muerte celular por apoptosis (Haque et al., 2015), debido a esto, el desarrollo de péptidos anticancerígenos que estimulen la activación de las caspasas y la ejecución de la apoptosis, representa una estrategia prometedora para descubrir terapias alternativas contra el cáncer.

Los venenos son una fuente extraordinaria de nuevos péptidos, de algunos de ellos se

han encontrado aplicaciones para tratar numerosas patologías humanas (Franklin & Rajesh, 2015). La gran biodiversidad que ofrecen los péptidos provenientes de venenos, especialmente las conotoxinas aisladas del veneno de los caracoles marinos predadores llamados *Conus*, tienen un gran potencial para el desarrollo de fármacos basados en péptidos (Akondi et al., 2014). El género *Conus* está constituido por 500 a 700 especies (B. M. Olivera, 1999; Wang & Chi, 2004; Zhou et al., 2013), y el veneno de cada especie contiene hasta 200 componentes farmacológicamente activos que poseen blancos moleculares específicos como receptores de membrana, canales iónicos y transportadores del sistema nervioso (Aguilar et al., 2013; Chen, Garrett, Watkins, & Olivera, 2008; Kaas, Yu, Jin, Dutertre, & Craik, 2012; Terlau & Olivera, 2004).

En este estudio, se analizaron las propiedades citotóxicas de péptidos sintéticos basados en las formas nativas de toxinas de los caracoles *Conus ximenes* y *Conus californicus* y del veneno total de la primera especie, se emplearon cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón. Para entender el mecanismo de acción por el que actúan estos péptidos sintéticos, se analizó la expresión de genes involucrados en la regulación de la apoptosis y la activación de la caspasa-3 y -7.

#### 2.1 Características de los caracoles del género Conus

Los caracoles del género Conus, que pertenecen a la superfamilia Conoidea y a la familia Conidae, son predadores marinos que utilizan su veneno para capturar a sus presas, como defensa contra predadores y para disuadir a competidores (Aguilar et al., 2006). Poseen un sofisticado aparato venenoso con un sistema de inyección y liberación del veneno (Terlau & Olivera, 2004). Está compuesto por, un ducto venenoso donde se sintetiza y almacena el veneno, un bulbo (en la parte posterior) que se cree proporciona la fuerza para la expulsar el veneno del ducto. Un saco radular compuesto por dos protuberancias, una larga y una corta (Figura 1). En la protuberancia larga se sintetizan los dientes radulares, mientras que la protuberancia corta almacena los dientes radulares maduros. Los dientes radulares tiene la forma de un arpón hueco parecido a una ajuga hipodérmica. La mayoría de los Conus tienen una probóscide larga y extensible, cuando buscan a una presa un solo diente radular (arpón) es transferido por el lumen de la probóscide. Una vez que la probóscide es extendida y toca a su presa, el arpón captado por músculos circulares en la parte anterior de la probóscide, es expulsado y finalmente el veneno se inyecta en la presa a través del arpón hueco (Favreau & Stöcklin, 2009; Norton & Olivera, 2006). La producción y liberación del veneno involucra tres pasos: 1) síntesis, procesamiento y empaquetamiento de las toxinas; 2) generación y almacenamiento de los dientes radulares, y la transferencia de los dientes a la parte superior de la probóscide; y 3) la inserción final del diente radular y la liberación del veneno (Marshall et al., 2002).



Figura 1. Esquema del aparato venenoso de los caracoles *Conus*. Esta conformado por un ducto venenoso, glándula salivaria, esófago, saco radular que contiene los dientes radulares (arpones) que serán llenados con el veneno y expulsados a través de la probóscide. Modificado de Favreau & Stöcklin, 2009.

Desde un punto de vista estructural, los péptidos encontrados en el veneno de los Conus, se dividen en general, en dos grupos: conopéptidos, que no poseen o tienen sólo un enlace disulfuro y conotoxinas, que poseen más de dos enlaces disulfuro (Aguilar et al., 2005; Norton & Olivera, 2006; Baldomero M. Olivera, 2002). Se ha estimado que existen más de 700 especies pertenecientes al género Conus, que han generado hasta 100, 000 conotoxinas y han sido clasificadas en superfamilias (Zhou et al., 2015). Se ha observado que especímenes pertenecientes a la misma especie, de la misma o de diferentes regiones, expresan venenos ampliamente diferentes. Además, ocurren variaciones dramáticas en la composición del veneno entre los especímenes de la misma especie, lo que contribuye a la gran diversidad de conotoxinas (Dutertre, Biass, Stöcklin, & Favreau, 2010; Prashanth, Lewis, & Dutertre, 2012). Estudios funcionales han demostrado que las conotoxinas exhiben afinidad por receptores de la membrana celular con alta potencia y selectividad, y son capaces de discriminar entre subtipos de receptores estrechamente relacionados (Lewis, 2009; Zamora-Bustillos, Aguilar, Falcón, & Heimer de la Cotera, 2009). Los blancos moleculares de las conotoxinas son, canales iónicos dependientes de voltaje (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), canales iónicos dependientes de ligando como, receptores de acetilcolina nicotínicos, receptor

3A 5-hidroxitriptamina (serotonina) y, el receptor N-metil-D-aspartato (nAChR, 5-HT<sub>3</sub>R, NMDAR), receptores acoplados a la proteína G (neurotensina, vasopresina) y transportadores de neurotransmisores (NET) (Aguilar et al., 2007; Terlau & Olivera, 2004). Por lo mencionado anteriormente, son consideradas como moléculas interesantes con un gran potencial terapéutico para los humanos, ya que poseen actividad antinociceptiva, antiepiléptica, y cardio y neuro protectora. Se han convertido en herramientas importantes en la investigación de enfermedades como cáncer, y desordenes psiquiátricos y neuromusculares (BernaÍdez et al., 2013).

Las conotoxinas son productos de un solo gen que generalmente contiene tres regiones: la región N-terminal (región señal) que mide aproximadamente 25 aminoácidos; la región pro, normalmente de 20-40 aminoácidos y la región C-terminal (región madura) de 12-35 aminoácidos (Kaas, Westermann, & Craik, 2010). Se estiman decenas de miles de conotoxinas en base a la región señal y han sido clasificadas en las superfamilias A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N, O1, O2, O3, P, S, T, V y Y (Aguilar et al., 2013; Kaas et al., 2012). De acuerdo a los blancos moleculares específicos, se han clasificado a su vez en familias:  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , I,  $\kappa$ ,  $\mu$ ,  $\rho$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$ ,  $\chi$  y  $\omega$  (Figura 2) (Zhou et al., 2015). Adicionalmente, modificaciones postrasduccionales como amidaciones, epimerizaciones, bromaciones, sulfuraciones, carboxilaciones, incrementan la diversidad de las conotoxinas (Buczek, Bulaj, & Olivera, 2005).



Figura 2. Clasificación de las conotoxinas. Las conotoxinas se clasifican en varias superfamilias basándose en la homología de la secuencia señal conservada. A su vez, se clasifican en familias basándose en su marco de cisteínas y blancos moleculares. NE= norepineprina, nAChR= receptores de acetilcolina nicotínicos. Modificado de Akondi et al., 2014.

# 2.2 Generalidades de las especies Conus ximenes y Conus californicus

Los especímenes pertenecientes a la especie *Conus ximenes* (Figura 3), 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 (Monteiro, 2006).



Figura 3. Morfología de *Conus ximenes*. Se muestra la morfología de la concha de la especie C.ximenes, así como el aparato venenoso disecado (Fotografía tomada en el Departamento de Innovación Biomédica).

Los caracoles pertenecientes a la especie *Conus californicus* (Figura 4) son los únicos que se encuentran en el Océano Pacífico oriental, desde la bahía de San Francisco, California hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur, México. Consecuentemente, se han adaptado a aguas más frías y a la falta de competencia con otras especies del mismo género. No poseen dieta especializada y pueden consumir hasta 56 organismos pertenecientes a diferentes phyla, que incluyen, gusanos, moluscos, peces y crustáceos (Bernaldez et al., 2011).



Figura 4. Morfología de la concha de Conus californicus. (Tomado de www.gastropods.com)

#### 2.3 Blancos moleculares de la conotoxinas

Los canales iónicos son proteínas transmembranales presentes en las células excitables o no excitables, participan en diversas actividades fisiológicas integrales para la excitabilidad, contracción, ciclo celular, secreción de agua y sal y cascadas metastásicas (Hille, 2001). Son cruciales para el mantenimiento del tejido, para la homeostasis durante la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Los mecanismos más importantes por los cuales lo canales iónicos contribuyen a estos eventos cruciales incluyen control del flujo de iones, regulación del volumen celular y generación del potencial de membrana (Lang et al., 2005; W. Liu, Lu, Liu, Huang, & Wang, 2012).

Los canales iónicos juegan un papel crítico en la patogénesis y fisiología del cáncer, debido a los mecanismos mencionados anteriormente, y numerosos canales iónicos y receptores se expresan en células tumorales (Tabla 1) (Kale, Amin, & Pandey, 2015). Estudios revelan que la sobreexpresión o el incremento de la cinética de los canales iónicos sensitivos al voltaje, está asociado con un aumento del potencial maligno, por estas razones, los canales iónicos se han convertido en blancos moleculares de suma

importancia para desarrollo de nuevos fármacos que bloqueen o reduzcan la actividad de estos. De esta manera previniendo o combatiendo la enfermedad (Fiske, Fomin, Brown, Duncan, & Sikes, 2006).

Blanco molecular	Tipo de cáncer
nAChR	Carcinoma de pulmón
Na <sup>⁺</sup> voltaje	Cáncer de mama y próstata
Ca <sup>2+</sup> voltaje	Pulmón, ovario, esofago, próstata, colorectal gástrico
K <sup>+</sup> voltaje	Mama, neuroblastoma, cervical, colon, pulmón
Ca <sup>2+</sup> activado por K <sup>+</sup>	Mama, cervical, ovario, glioma, melanoma
Cl	Prostata, glioma

Tabla 1. Canales iónicos involucradas en cáncer.

Tomado de: Kale, Amin, & Pandey, 2015.

Se ha presentado evidencia que los canales de K+ dependientes de voltaje "ether à gogo" (Eag1), se expresan en varios tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, próstata, hígado, colon y pulmón (Hemmerlein et al., 2006). Pueden regular su progresión, y mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales se logra inhibir su activación restringiendo la proliferación de las células de cáncer, por lo tanto, han ganado interés por su rol oncogénico potencial (Pardo, Camino, Alves, & Stu, 1999; Pardo & Stühmer, 2008; Stühmer, Alves, Hartung, Zientkowska, & Pardo, 2006). Estos canales se expresan de manera aberrante en más del 70% de los sarcomas. En células de sarcoma, la inhibición de la expresión o función de Eag1 mediante ARN de interferencia lleva a una reducción de la proliferación celular (Mello de Queiroz, Suarez-Kurtz, Stühmer, & Pardo, 2006). Se ha encontrado la sobreexpresión de EAG en cáncer de cérvix, considerándolo como blanco terapéutico potencial para este tipo de cáncer (Barajas Farias, Bermúdez, Díaz, & Larrea, 2004). La expresión de Eag1 está correlacionado con malignidad del colon en humanos y roedores, su sobreexpresión es directamente asociada con la baja tasa de sobrevivencia. Esto sugiere que este canal es sumamente importante para el desarrollo de tumores en el colon (Ding, Yan, An, Lü, & Luo, 2007; Ousingsawat et al., 2007).

Se ha reportado evidencia que el canal de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje N<sub>v</sub>1.5 es sobreexpresado durante la progresión de cáncer de mama y potencia una serie de procesos celulares integrales que conllevan a una cascada metastásica, los canales N<sub>v</sub>1.5 se consideran herramientas terapéuticas y de diagnóstico potenciales en la progresión del cáncer de mama (Fraser et al., 2005). Algunos de los canales de potasio dependientes de voltaje que más han sido estudiado en cáncer son Kv1.3, IKCal, TASK-3, HERG, Eag1 (Stühmer et al., 2006). El canal de K<sup>+</sup> activado con Ca<sup>2+</sup>, hIK1, es importante en la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular. La aplicación de bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> como, clotrimazole, en células de cáncer de mama (MCF-7) disminuyó la proliferación en la fase G1 (Ouadid-ahidouch et al., 2004).

La regulación de Ca<sup>2+</sup> intracelular, es una pieza clave en el desarrollo y crecimiento de las células. El canal de Ca<sup>2+</sup> relacionado a CaT1, CaT-like (CaT-L), se expresa en cáncer de próstata avanzado, en lesiones prostáticas metastásicas e intensivitas a andrógenos, pero no se expresa en tejido prostático sano ni en hiperplasia prostática temprana. Por lo tanto, el canal CaT-L representa marcadores para la progresión del cáncer de próstata y puede servir como blanco para estrategias terapéuticas (Wissenbach, Niemeyer, Fixemer, Schneidewind, & Trost, 2001). La sobreexpresión del canal epitelial de Ca<sup>2+</sup>, ECaC1, es crucial para la diferenciación de las células epiteliales de próstata en células de cáncer, por lo tanto, bloqueadores selectivos pudiesen ayudar a reducir este proceso y ganar atención como fármacos anticancerígenos (Nilius, Prenen, Vennekens, Hoenderop, & Droogmans, 2001). El canal 2 de Ca<sup>2+</sup> activado con Cl<sup>-</sup> (CLCA2) (miembro de la familia de canales de Ca<sup>2+</sup> activado con Cl<sup>-</sup>, CLCA), se expresa de manera prominente en epitelio humano de mama, pero no se expresa en cáncer de mama o en líneas celulares. Al restablecer la expresión de CCLA2 en células de carcinoma de mama (negativas a CCLA2), se redujo la tumorigenicidad, la invasión y la habilidad de colonizar los pulmones de ratones desnudos. CCLA2 puede actuar como supresor de tumor en cáncer de mama (Gruber & Pauli, 1999).

Ha sido reportado que las conotoxinas tienen como blancos moleculares diferentes receptores, entre los más estudiados están los receptores de acetilcolina nicotínicos

(nAChRs). La nicotina y sus derivados actúa sobre la subunidad  $\alpha$ 5 de los nAChRs en células de cáncer de pulmón y activa la vía de ERK y Akt, promoviendo la proliferación, angiogénesis e invasión de las células (Ma et al., 2014). La conotoxina  $\alpha$ -ImI fue utilizado como péptido blanco para administrar el fármaco comercial paclitaxel en células de cáncer de mama en los receptores nAChR- $\alpha$ 7. Puede ser considerada como péptido blanco para intervenir en tumores que sobreexpresen los nAChRs  $\alpha$ 7 (Mei et al., 2015a).

#### 2.4 Características de los nAChRs y su rol potencial en el cáncer

Los receptores de acetilcolina (AChRs), son proteínas integrales de membrana que responden a la unión de acetilcolina (ACh), que es sintetizada, almacenada y finalmente liberada por las neuronas colinérgicas (Reina Improgo et al., 2013). Estos receptores puede ser activados por la molécula de nicotina, de ahí el nombre receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs) (Ho, Lee, & Wu, 2011). Los nAChRs, son estructuras pentaméricas formadas por subunidades que incluyen,  $\alpha 2 - \alpha 10 \gamma \beta 2 - \beta 4$ . Consisten de un extremo N-terminal extracelular de aproximadamente 200 residuos, cuatro segmentos transmembrana (designados M1-M4), un bucle variable (100-200 residuos) entre M3 y M4 y un extremo extracelular C-terminal (4-28 residuos) (Figura 5A). El extremo Nterminal contiene el dominio de unión a ACh (M. R. D. Improgo, Scofield, Tapper, & Gardner, 2010). En base a las propiedades de unión con el ligando, los nAChRs neuronales, se dividen en dos clases: 1) los que tienen unión con la  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgTx), y contienen las subunidades  $\alpha$ 7- $\alpha$ 9 que forman homopentámeros; y, 2) los que no se unen a  $\alpha$ -BgTx, que contienen las subunidades  $\alpha$ 2-  $\alpha$ -6 y  $\beta$ 2- $\beta$ 4, y forman receptores heteroméricos que poseen gran afinidad por agonistas como acetilcolina y nicotina (Figura 5B) (Wu, Lee, & Ho, 2011).



Figura 5. Estructura de los nAChRs. A) Representación esquemática de una subunidad de nAChR. B) Ejemplos de receptores homoméricos y heteroméricos. Tomado de M. R. D. Improgo, Scofield, Tapper, & Gardner, 2010.

La expresión de los nAChRs estaba restringida para las células neuronales y musculares, pero investigaciones posteriores demostraron que también se expresan ampliamente en células de cáncer (Schuller, 2009). Los nAChRs juegan un papel clave en la patogénesis ya que interactúan con agonistas y activan múltiples vías de señalización que regulan la progresión, el crecimiento y metástasis de tumores (Guo et al., 2012; Ma et al., 2014; G. W. Warren et al., 2012).

Se ha reportado que los nAChRs se expresan en células de cáncer de pulmón, donde regulan la proliferación y apoptosis (Schuller, 2009). Actúan como mediadores para varios estímulos que promueven la progresión de los tumores. Esos múltiples estímulos pueden activar numerosas vías de señalización en cáncer de pulmón, que llevan a la resistencia a las terapias (M. R. Improgo et al., 2011).

Se ha demostrado que agonistas de los nAChRs, como la nicotina, estimula la proliferación de líneas celulares de cáncer de pulmón. Efecto que puede ser irrumpido

por antagonistas de los nAChRs (M. R. Improgo et al., 2011). Además de la nicotina y sus metabolitos derivados, el ligando fisiológico de los nAChRs es la acetilcolina, que actúa como un agente autocrino y paracrino. De manera general, la señalización de los nAChRs en cáncer, empieza con la unión de agonistas que causan un cambio conformacional en el receptor que permite la apertura del canal iónico y el flujo de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup>, activando cascadas de señalización involucradas en la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, migración y angiogénesis (Figura 6) (Cattaneo, Codignola, Vicentini, Clementi, & Sher, 1993; M. R. Improgo et al., 2011; Medjber et al., 2015).



Figura 6. Modelo de las vías de señalización mediadas por los nAChRs en cáncer de pulmón. Agonistas de los nAChRs como acetilcolina, nicotina y nitrosaminas de tabaco, se unen y activan receptores homoméricos (rojo) o heteroméricos (multicolor). Los componentes de la vía de señalización indicados con rojo, son aquellos identificados en células pequeñas de cáncer de pulmón (SCLC) y sus células precursoras; aquellos en verde han sido identificados en células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC); y los de color purpura en ambos tipos de cáncer y sus células de origen (Modificado de M. R. Improgo et al., 2011).

Estos receptores pueden ser considerados como blancos terapéuticos prometedores para desarrollar terapias alternativas más efectivas contra el cáncer, así como, para identificar moléculas involucradas en su mecanismo de acción.

#### 2.5 Funcionamiento e importancia del cáncer

En promedio, una de cada cuatro personas padecerán cáncer. La mayoría de los cánceres se deben a causa de una mezcla entre factores hereditarios y ambientales. Es provocado por mutaciones que ocurren dentro del tejido de las células madre, y es consecuencia de ambos, de una diferenciación descontrolada, así como, una proliferación incontrolada (Ghavami et al., 2009). Por estas razones, terapias basadas en alteraciones genéticas específicas ha abierto una nueva era para el tratamiento del cáncer.

El cáncer tiene su génesis debido 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 tres amplias clases de genes: 1) los proto-oncogenes, 2) los genes supresores de tumores y 3) los genes vigilantes. Los primeros son activados para volverse oncogenes mediante mutaciones que los 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 y por último los genes vigilantes a menudo son ligados con el cáncer, éstos normalmente protegen la integridad del genoma, cuando son inactivados, las células adquieren mutaciones a una tasa muy alta, incluyendo mutaciones que dañan el control del crecimiento celular y llevan a la producción de tumores cancerígenos (Lodish *et al.*, 2008).

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. En el 2012 hubo 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que los casos anuales aumentarán de 14 millones en el 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas. El principal tipo de cáncer es el pulmonar, que reporta 1.59 millones de defunciones por año. (www.whi.int).

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer a nivel mundial (Medjber et al., 2015). Se clasifica en dos tipos histológicos, células pequeñas de cáncer de pulmón (SCLC, por sus siglas en inglés), que abarca el 15-20% de los casos; mientras que las células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC) el 80-85%, incluyendo tres subtipos: adenocarcinoma, células escamosas y carcinoma de células grandes. Cada subtipo se refiere al tipo específico de célula afectada y se agrupan juntos porque se comportan de manera similar (Oser, Niederst, Sequist, & Engelman, 2015; W. Zhang et al., 2015). A pesar de numerosos intentos en desarrollar estrategias de tratamiento efectivas para combatir el cáncer de pulmón, el pronóstico general de supervivencia de 5 años es menor del 15% en NSCLC y para SCLC es aún más bajo (Pore, Milind M. Jeroen N. Hiltermann, 2013).

Las estrategias terapéuticas utilizadas con mayor frecuencia para combatir las primeras etapas del cáncer, incluyen incisión del tumor primario seguido de una terapia adyuvante (por ejemplo, quimioterapia y radioterapia) con la finalidad de destruir todas las células cancerígenas restantes. Sin embargo, a pesar de que puede ser efectivo varios años, el resurgimiento de los tumores es común. La propagación de las células de cáncer que forman el tumor primario, finalmente forman tumores secundarios, proceso que se conoce como "metástasis". La metástasis es causante de más del 90% de la mortalidad relacionada con el cáncer (Onkal & Djamgoz, 2009).

#### 2.6 Apoptosis y genes involucrados en el proceso

La apoptosis es el proceso por el cual, las células dañadas, no adheridas, mutantes y de larga vida, son eliminadas. Cualquier aberración que ocurra en el proceso puede llevar a la iniciación de numerosas enfermedades, incluyendo cáncer (Khan, Blanco-Codesido, & Molife, 2014; Wong, 2011).

La apoptosis es mediada por la activación de diferentes proteasas llamadas caspasas (Oliver & Vallette, 2005; Reed, 2000). Una familia de cistein-proteasas que son específicas para los residuos de ácido aspártico. Las caspasas son normalmente expresadas como zimógenos inactivos y son convertidos a su forma activa en el comienzo del proceso de apoptosis (Shivapurkar, Reddy, Chaudhary, & Gazdar, 2003). La familia de las caspasas pueden ser dividida en dos grupos funcionales, basados en sus funciones (Shioiri et al., 2009). El primer grupo corresponde a las caspasas inflamatorias (caspasa-1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14), que juegan un papel en la maduración de citosinas y respuestas inflamatorias. El segundo grupo se divide a su vez en subgrupos, que abarcan las caspasas iniciadoras (-2, -8, -9, -10, y -15), que son activadas por estímulos proapoptóticos y responsables de la activación de las caspasas efectoras (-3, -6, y -7), que poseen el substrato para que se lleve a cabo la proteólisis durante la apoptosis (Deveraux et al., 1998; Earnshaw, Martins, & Kaufmann, 1999; Shivapurkar et al., 2003).

La activación de las caspasas se lleva a cabo por dos grandes sistemas de señalización 1) la vía extrínseca (o del ligando de muerte), que es activada por medio receptores de membrana específicos y 2) la vía intrínseca (o vía mitocondrial), activada tras la ruptura de la mitocondria y la liberación del citocromo c (Gupta, Kass, Szegezdi, & Joseph, 2009; Kroemer, 2003; Ozören & El-Deiry, 2003; Pore, Milind M. Jeroen N. Hiltermann, 2013; Thorburn, 2004).



Figura 7. Principales vías de la apoptosis. Dos vías que llevan a la muerte celular por apoptosis; la vía extrínseca, que actúa por medio del receptor de muerte, mientras que la vía intrínseca actúa por medio de la liberación de proteínas mitocondriales. La activación de cualquiera de las dos vías, extrínseca o intrínseca, llevan a la activación de las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) (Modificado de Shivapurkar et al., 2003).

Elegir como blancos moleculares componentes de la vía apoptótica en un enfoque terapéutico en cáncer, es apoyado por el hecho que los procesos aberrantes de la apoptosis son centrales para el crecimiento y progresión tumoral. De hecho, la supresión de la apoptosis es ampliamente reconocido como la característica principal contra el cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Nuevos alcances en la activación de la vía apoptótica han resultado en la inducción de la muerte de las células cancerosas. Los miembros de la familia de la proteína Bcl-2 han sido ampliamente estudiados, debido a que son moléculas clave para activar la vía apoptótica. La sobreexpresión de los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, causa apoptosis o resistencia a la terapia en un amplio rango de tumores. El desarrollo de terapias que tengan como blancos estos moduladores de apoptosis aparecen como objetivos prometedores (Chonghaile & Letai, 2008; Pellecchia & Reed, 2004). La familia de factores de transcripción NFκB, son mediadores centrales del sistema inmune, procesos de

inflamación, respuestas al estrés, apoptosis y proliferación celular. NFκB es constitutivamente activado en una variedad de leucemia y tumores sólidos, incluyendo cáncer de pulmón, ya que juega un papel crítico al promover la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales (Chai et al., 2014; Garg et al., 2012; Magné et al., 2006). COX-2 es una forma inducible de la enzima ciclooxigenasa, representa un blanco farmacológico potencial para prevenir y tratar una gran variedad de enfermedades malignas (Maeng, Lee, Jin, Chang, & Shim, 2014). La sobreexpresión de COX-2 se ha observado en varios tipos de cáncer y se ha ligado con la baja sobrevivencia de los pacientes que padecen cáncer de pulmón (Aggarwal & Gehlot, 2009).

En la actualidad los fármacos utilizados para combatir el cáncer actúan de manera inespecífica, generando terapias altamente tóxicas. La expresión de algunos receptores o canales iónicos en las células de cáncer causan un efecto en la migración o proliferación celular. Las conotoxinas de los caracoles del género *Conus* bloquean de manera específica estos canales y/o receptores, pueden ser consideradas como fármacos potenciales para el tratamiento del cáncer.

Las conotoxinas presentan una alternativa para generar terapias más efectivas y específicas contra el cáncer, desarrollando fármacos basados en péptidos.

Dentro del veneno de los caracoles *Conus ximenes* y *Conus californicus* existe por lo menos un componente con efecto citotóxico sobre líneas de cáncer de pulmón, que afecta la expresión de proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis.

#### 5.1 Objetivo general

Analizar el efecto de las conotoxinas provenientes de los caracoles *Conus* ximenes y *Conus californicus* sobre líneas celulares de cáncer, e identificar su posible mecanismo de acción.

#### 5.2 Objetivos particulares

- Determinar si algunos de los componentes del veneno de los caracoles *C. californicus* y *C. ximenes* poseen actividad citotóxica sobre diferentes líneas de cáncer.
- Analizar el efecto citotóxico de diferentes conotoxinas en líneas celulares de cáncer.
- Determinar la modificación que ejercen las conotoxinas en la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la vía apoptótica en líneas celulares de cáncer de pulmón, e identificar la expresión de blancos moleculares.

# 6.1 Obtención de organismos, extracción de veneno y cuantificación de proteína del extracto

Los organismos de las especie *Conus ximenes* fueron colectados en Bahía de los Ángeles, Baja California, ubicada a 480 km al sur de Ensenada, Baja California. Los organismos pertenecientes a la especie *Conus californicus* se colectaron en la región intermareal del km 58 carretera Tijuana-Ensenada, Baja California, México. Ambas colectas se realizaron en base a la predicción de mareas, proporcionada por el calendario del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

El veneno total se obtuvo mediante la disección de los caracoles, 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 homogenizado, se centrifugó durante 5 minutos a 10, 000 x g, para eliminar residuos de tejido y se recuperó el sobrenadante (se repite dos veces el proceso). El sobrenadante colectado se liofilizó y almacenó a -80°C hasta su utilización. Todo el procedimiento se realizó en un tubo eppendorf previamente pesado. La cuantificación de la proteína obtenida en la extracción de veneno total, se realizó por peso seco. Después de liofilizar el sobrenadante recuperado en la extracción, se pesó nuevamente el tubo con la muestra liofilizada y se analizó la diferencia de peso total dando como resultado el peso seco de la muestra de veneno total.

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

Este método se utilizó para separar los componentes del extracto de veneno total (apartado 6.1). Se empleó un cromatógrafo Agilent 1220 Infinity LC (Agilent Technologies) y una columna Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies, 5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm), una precolumna Zorbax C18 (Agilent Technologies, 5  $\mu$ m, 4.6 x 12.5 mm) la cual se equilibra con solución A (anexo 1). Posteriormente, se cargaron 5 mg del extracto de veneno total, en un volumen de 200  $\mu$ l de solución A. Se eluyó a un flujo constante de 1ml min <sup>-1</sup>, con un gradiente de 0 a 60% de solución B (anexo 2) durante 60 minutos. Previo al gradiente, se realizó un lavado de 5 minutos, la detección de los péptidos se realizó por absorbancia en el espectro de UV a una longitud de onda de 230 nm.

Se colectaron las fracciones obtenidas de acuerdo a un plan estratégico cada 5 minutos, las fracciones obtenidas se liofilizaron y almacenaron a 4°C hasta su utilización.

#### 6.3 Repurificación de fracciones de veneno total por HPLC-RP

La repurificación de las 13 fracciones de veneno total obtenidas, se llevó a cabo mediante un gradiente suave que se determinó a partir del porcentaje de solución B en el que eluyó la fracción de veneno total que se desea repurificar. Se realizó la purificación de seis fracciones de veneno total de *C. ximenes*, las especificaciones del gradiente utilizado para cada fracción se muestran en el capítulo 7. Todas las repurificaciones se realizaron en una corrida de 60 minutos con un flujo de 0.3 ml min<sup>-1</sup> con una columna Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies, 5 µm, 4.6 x 250 mm) y una precolumna Zorbax C18 (Agilent Technologies, 5 µm, 4.6 x 12.5 mm), que se equilibró con solución A. Se inyectaron 200 µl de muestra y se detectó la absorbancia en el espectro de UV a una longitud de onda de 230 nm.
## 6.4 Cultivo de cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón

#### 6.4.1 Preparación de material y equipo

Todo el material utilizado para trabajar con líneas celulares fue esterilizado y el equipo utilizado se limpió debidamente, para tenerlo bajo condiciones extremas de asepsia. El medio de cultivo utilizado es RPMI-1640 1x (Corning, con L-glutamina), suplementado con antibiótico-antimicótico (Penicilina 10,000 U ml<sup>-1</sup>, Estreptomicina 10 µg ml<sup>-1</sup> y anfotericina B 5 µg ml<sup>-1</sup> SIGMA-ALDRICH) al 1% y suero fetal bovino (SFB) (Corning) al 10%.

## 6.4.2 Cultivo de líneas celulares

Se cultivaron cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón: H1299, H1437, H1975 y H661. En el interior de la campana de flujo laminar activada, se agregaron a un tubo de cultivo de 15 ml, 9 ml de medio de cultivo suplementado y 1 ml de células de la línea celular deseada, que se descongeló previamente a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 130 rad durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio suplementado y 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 CO<sub>2</sub> del 5%. Se observaron las células diariamente en un microscopio invertido (EVOS), con un objetivo de 4x, 10x y 20x. Un día después del cultivo, se realizó un lavado con 2 ml de PBS 1x, posteriormente se agregaron 10 ml de medio de cultivo suplementado. El medio de cultivo, se cambió de acuerdo a la confluencia presente de las células (2 a 3 veces por semana), una vez alcanzado el 80% de confluencia de la monocapa celular se procedió a separar las células de la caja. Cada línea celular se trabaó por separado.

## 6.4.3 Desprendimiento de líneas celulares

La enzima tripsina (tripsina EDTA 0.25%/0.2 g, SIGMA-ALDRICH), se utilizó para separar las células de la placa a la que están adheridas. Esto se realizó una vez que se observó el 80% de confluencia en el cultivo celular, por medio del microscopio invertido. Primeramente, se retiró el medio de cultivo de la caja con la ayuda de una pipeta, después se adicionaron 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1x) para lavar. Posteriormente, se retiró el PBS 1x, se agregaron 2 ml de tripsina y, se colocó la caja en la incubadora a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 minutos. Se retiró la caja y se agregaron 8 ml de medio suplementado. Se homogenizó la solución. La suspensión celular homogenizada se utilizó ya sea para, realizar los conteos para la realización de ensayos experimentales, expansión del cultivo celular y/o preservar las líneas celulares.

### 6.4.3.1 Mantenimiento y expansión del cultivo

Para el mantenimiento de los cultivos se realizó una expansión 1:3; se transfirieron 3.3 ml de la solución homogenizada (resultante en el apartado 6.5.3) a una caja de 100 mm (Corning), lo que da lugar a tres cajas, a cada una se les adicionaron 6.7 ml de medio suplementado. Se incubó a 37°C con 5% de  $CO_2$  hasta su utilización.

#### 6.4.3.2 Conteo celular

El conteo celular se realizó por medio de un hemocitómetro, en el cual se colocaron 10  $\mu$ I de una solución previamente preparada que contiene: 5  $\mu$ I de la solución homogenizada (resultante en el apartado 6.5.3) y 5  $\mu$ I del colorante azul de tripano filtrado. Las células se contaron por cuadrante y se sumó el resultado. El resultado se dividió entre cuatro, y se multiplicó por el factor de dilución 2, después se multiplicó por 10, 000 (área del hematocitómetro). El resultado obtenido representó la concentración total de células contenidas en un volumen conocido (10 ml).

## 6.4.4 Criopreservación de líneas celulares

Este método se utilizó para la conservación de las líneas celulares viables, puede ser realizado después del procedimiento de desprendimiento de células (apartado 6.5.3). Se agregaron 2 ml de la enzima tripsina (tripsina EDTA 0.25%/0.2 g, SIGMA-ALDRICH), que ayuda a las células a separarse de la base de la caja de cultivo. Se agregaron 8 ml de medio suplementado, se homogenizó y posteriormente se trasladó la solución a un tubo cónico de 15 ml, se centrifugó a 130 rad durante 5 min, y por último se agregó 1 ml de medio suplementado (apartado 6.4.1) al 5% de dimetil sulfósido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se colocó en una hielera de poliestireno con algodón en todas sus paredes y tapa durante 24 horas a -80°C, esto permitió que la temperatura disminuyera gradualmente. Después de concurridas las 24 horas de congelación, se trasladaron los viales preservados a su caja de almacenamiento a -80°C.

## 6.5 Ensayos citotóxicos

La supervivencia celular se determinó utilizando el reactivo CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay MTS (PROMEGA). El reactivo MTS se basa en la conversión de la sal tetrazolium en formazan, a un producto de color soluble, por acción de enzimas deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas. La cantidad producida de formazan es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Se adicionaron 5, 000 células por pozo a una placa de cultivo de 96 pozos (Corning) y se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Una vez concurridas las primeras 24 horas de incubación, se agregaron 50 µg/ml de cada una de las fracciones obtenidas en la purificación de veneno total, los péptidos sintéticos cal14.1a (27 µM), cal14.1b (28 µM) y xm1b (33 µM), como controles positivos se utilizaron estaurosporina a una concentración de 5 µM y dimetil sulfóxido (DMSO) al 5%, y como control negativo células sin tratamiento. Como blanco de lectura se utilizó medio RPMI-1640 suplementado. Después de colocar las muestras deseadas en cada pozo, se incubó la placa de cultivo nuevamente a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Por último, se agregaron 20 µl del reactivo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, sal interior (MTS)) por pozo y se incubó durante 1-4 horas bajo las mismas condiciones. Se tomó lectura de la placa de cultivo en un lector de placas EPOCH (BioTek) a una longitud de onda de 490 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## 6.6 Análisis de genes por PCR de tiempo real (RT-PCR)

### 6.6.1 Extracción de ARN total de cada línea celular

Se realizó la extracción de ARN total de las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299, H1437, H1975 y H661, tratadas con: péptidos sintéticos; cal14.1a (54 µM), cal14.1b (56  $\mu$ M) y xm1b (66  $\mu$ M), y controles; positivo (estaurosporina, 7  $\mu$ M) y negativo (células sintratamiento). Se utilizó el reactivo Tri-reagent (SIGMA-ALDRICH) siguiendo el protocolo que indica el fabricante. Se realizó un cultivo en una placa de 24 pozos agregando 50, 000 células por pozo. Después de agregar los tratamientos mencionados anteriormente, se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 500 µl de PBS 1X. Posteriormente, se agregaron 200 µl de Tri-reagent (Sigma-Aldrich) a cada pozo, se resuspendió hasta homogenizar y se añadió a un tubo de 1.5 ml, se dejó reposar durante 2-5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 80 µl de BCP (1-bromo-cloro-propano) y se agitó intensamente durante 15 segundos, se dejó reposar nuevamente de 2-10 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12,100 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa (contiene el ARN) y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de isopropanol, se mezcló suavemente y dejó reposar de 5-10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se centrifugó a 12, 100 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y se agregaron 400 µl de etanol al 75% (preparado con agua con DEPC), se centrifugó a 11, 900 rpm durante 5 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. Se secó el exceso de líquido, finalmente se agregaron 15 µl de agua con DEPC y se guardó a -80°C hasta su utilización.

La cantidad extraída de ARN se cuantificó por espectrofotometría en un nanodrop a una absorbancia de 260 y 260/280. La integridad del ARN se evaluó por medio de un gel desnaturalizante de agarosa al 1.6% (0.8 gr de agarosa) disuelto en 50 ml de buffer TAE 1x (Anexo 5). Se agregaron 8  $\mu$ l de bromuro de etidio. El gel, una vez preparado y cargado se corrió en un cámara de electroforesis con buffer TAE 1x, a 30 Volts durante 4 horas. Se cargaron 2  $\mu$ g de ARN y se calientaron durante un minuto a 70°C, posteriormente, se pasó a hielo y se agregaron 4  $\mu$ l de buffer de carga 5x. Finalmente se aforó a 20  $\mu$ l con agua con DEPC.

#### 6.6.2 Retrotranscripción del ARN obtenido

La retrotranscripción del ARN obtenido se realizó mediante el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen<sup>™</sup>), que consta del siguiente protocolo: se realizó una mezcla de oligo dT y Random Hexamer, a la mezcla se le agregó 1 µl de buffer de alineación (Annealing Buffer), se aforó a 8 µl con agua con DEPC y se añadieron 2 µg de ARN total (máximo 6 µl). Se calientó a 65°C durante 5 minutos y se deja reposar en hielo. Finalmente se agregaron 10 µl de mezcla de reacción (2X First-Strand Reaction Mix) y 2 µl de enzima (SuperScript® III/RNaseOUT<sup>™</sup> Enzyme Mix), teniendo un volumen final de 20 µl. La retrotranscripción se realizó en un termocliclador Verti para placas de 96 pozos (Applied Biosystems) empleando un programa que consta de 25°C durante 5 minutos, 50°C durante 50 minutos, 85°C durante 5 minutos y una etapa final a 4°C. Al final de la reacción se obtuvo una concentración de 100 ng/µl de ADNc.

## 6.6.3 Validación de oligonucleótidos por PCR de tiempo real (RT-PCR)

Para obtener resultados viables en la cuantificación relativa del ARN mensajero de cada línea celular utilizada, se realizó la validación de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada gen (tabla 2). Esto mediante una curva estándar de cada par de

oligonucleótidos. Para realizar la curva estándar se midieron cinco diluciones de una concentración conocida de ARNm (100, 20, 4, 0.8, 0.16 ng), las condiciones de reacción son: 95°C durante 10 minutos (hot-start) seguido de 40 ciclos de 95°C durante un minuto, 60°C durante 30 segundos. En un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem), utilizando 5 µl de Sybrgreen master Mix (Apllied Biosystems), 0.9 µM de cada oligonucleótido (a excepción del gen  $\alpha$ 5 que utilizó 0.2 µM de oligonucléotido sentido y 0.5 µM de antisentido) y 3 µl de ADNc ajustado a la concentración requerida para cada análisis. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción para cada uno de los tratamientos a evaluar.

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los análisis de expresión de genes por RT-PCR y clave de acceso a base de datos (GenBank database) o referencia.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Clave de GenBank	
β-actina	S: GCGAGAAGATGACCCAGATC	BRWS1	
	A: CCAGTGGTACGGCCAGAGG		
Bcl-2	S: ATGTGTGTGGAGAGCGTCACC	BC027258.1	
	A: TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC		
BAX	S: TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC	NM_004324.3	
	A: TCACCCAACCACCCRGGTCTT		
NF-кB1	S: CGCCGCTTAGGAGGGAGA	NM_003998.3	
	A: AGGTATGGGCCATCTGCTGT		
COX-2	S: TGCATTCTTTGCCCCAGCACT	Inoue et al., 2013	
	A: AAAGGCGCAGTTTACGCTGT		
α3	S: CTGGTGAAGGTGGATGAAGT	NM_001166694.1	
	A: CTCGCAGCAGTTGTACTTGA		
α5	S: TCAACACATAATGCCATGGC	NM_000745.3	
	A: CCTCACGGACATCATTTTCC		
α7	S: GCCAATGACTCGCAACCACGTC	X70297.1	
	A: CCAGCGTACATCGATGTAGCA		
α9	S: GACTGAGAGCTGCAGAGACG	NM_017581.3	
	A: AATCTGCAGGGTCACATTCA		

α10	S: AGCTGTTCCGTGACCTCTTT A: TGTCGATGATCTGGGACAGT	NM_020402.2
β2	S: ATGACCAGAGCGTGAGTGAG A: AAGAGAGGCTGCAGGAACAT	NM_000748.2
β4	S: TGTGCAGGAGGCATTAGAAG A: GACGCACACAAACATGAACA	NM_000750.3

S: sentido; A: antisentido.

### 6.6.4 Análisis de resultados de RT-PCR

Para realizar la comparación entre la expresión de genes de los tratamientos utilizados, se utilizó el método de curva estándar relativa. Se convirtió el valor de Ct obtenido para cada gen a cantidad relativa de ADNc empleando la eficiencia de amplificación (Eamp), obtenida mediante la curva de validación de cada par de oligonucleótidos. Utilizando la fórmula (Rieu y Powers, 2009):

$$RQ = \frac{1}{E^{Ct}}$$

Donde:

RQ= Cantidad relativa

E= Eficencia del gen

Ct= "Cycle threshold" para cada valor de la muestra

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

## 6.7 Ensayos in vitro de imagen por fluorescencia

El ensayo se realizó agregando  $6x10^4$  células/ml a una placa de 96 pozos. Se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente, se agregaron 27 µM de

cal14.1a, 28 µM de cal14.1b y 33 µM de xm1b. Para el control positivo (C+), se utilizó 1 µM de estaurosporina y las células sin tratamiento fueron consideradas como control negativo (C-). Se incubó la placa en los horarios establecidos (3, 6, 12 y 24 horas) con las mismas condiciones. Una vez concurrido el tiempo se agregaron 3 colorantes; CellEvent™Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Life Technologies) 5 µM, Hoechst 33342 triclorhidrato trihidrato (solución 10 mg/ml, Life Technologies) 10 µg/ml y loduro de propidio (IP) 50 µg/ml. Se incubó nuevamente durante 30 minutos y se observó en un microscopio de fluorescencia invertido EVOS® FLoid® Cell Imaging Station (Life technologies), con tres filtros azul (390-40/446-33 nm), verde (482-18/532/59 nm) y rojo (586-15/646-68 nm). Se tomaron fotografías que abarcaran todo el área del pozo y se contó el número de células para cada colorante, tomando el conteo del colorante azul (Hoechst 33342) como el total de células y en base a eso se normalizó el total de células activas para los colorantes rojo (ioduro de propidio) y verde (CellEvent Caspase-3/7).

## 7.1 Colecta de organismos y extracción de veneno

Se trabajó con 670 organismos de la especie *Conus ximenes* y 580 organismos de *Conus californicus*, de los cuales se obtuvieron 273 mg de extracto de proteína total para cada especie, utilizada para la realización de cada una de las purificaciones por HPLC-RP y los ensayos de citotoxicidad con las líneas celulares de cáncer.

## 7.2 Cultivo de líneas celulares de cáncer

El cultivo de las líneas celulares se realizó de acuerdo a la descripción del apartado 6.5. Se cultivaron cuatro líneas de cáncer de pulmón; H1299 (carcinoma, NSCLC), H1437 (adenocarcinoma, NSCLC), H1975 (adenocarcinoma, NSCLC), y H661 (carcinoma, células grandes de cáncer de pulmón). En la Figura 8, se muestran las fotografías de las cuatro líneas celulares con una confluencia del 80%. Es importante analizar las respuestas de las cuatro líneas debido a que, a pesar de ser del mismo tejido presentan diferencias entre sí, y asimismo, responden de manera diferente a los tratamientos.

La línea celular H1299 fue derivada de un sitio metastásico (nódulo linfático), de un paciente masculino y posee una baja expresión de p53, una proteína sumamente involucrada en la regulación del ciclo celular, por lo tanto, H1299 se puede considerar una línea celular más resistente. H1437 también fue derivada de un sitio metastásico (efusión pleural), de un paciente masculino en fase 1. La línea H1437 fue derivada de un paciente femenino, mientras que, H661 de un paciente masculino y de un nódulo linfático.



Figura 8. Fotografía de células de cáncer de pulmón. A) línea celular H1299, B) línea celular H1437, C) línea celular H1975 y D) línea celular H661. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido con un objetivo de 10x.

# 7.3 Purificación del veneno total de C. ximenes

La purificación del veneno total de *C. ximenes* se realizó por HPLC- RP, en una corrida de 60 minutos con un gradiente del 0 al 60% de solución B (Anexo 2). En la figura 9, se muestra el cromatograma obtenido.



Figura 9. Purificación del veneno total de *C. ximenes* por RP-HPLC. En la parte inferior se indican las 13 fracciones obtenidas, de cinco minutos cada una, en una corrida de 60 minutos con un gradiente que va de 0 a 60% de solución B. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm en el eje "y" izquierdo. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida.

Se obtuvieron un total de 13 fracciones que contienen los componentes del veneno total de *C. ximenes*, que posteriormente se analizaron en las cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón para identificar las fracciones que tengan un efecto citotóxico en las células.

# 7.4 Ensayos de citotoxicidad en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón con las fracciones del veneno total de *C. ximenes*

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron como se indica en el apartado 6.6. El resultado muestra, que la mayoría de las fracciones disminuyen de manera significativa la supervivencia celular en las líneas celulares H1299, H1437 y H661 (Figura 10). En la línea H1437 (Figura 9B) no se observó disminución de la supervivencia celular en ninguna de las fracciones de veneno total de *C. ximenes.* Por el contrario, algunas fracciones aumentan la supervivencia celular de manera significativa, por ejemplo, las fracciones 7 y 10 en la línea H1975 que aumentan 32 y 30%, respectivamente. Esto

puede ser debido a que los componentes presentes en el veneno también puede tener un efecto promoviendo la división celular, de la misma manera que bloquean receptores o canales presentes en la membrana celular para disminuir la supervivencia es posible que tengan un efecto opuesto promoviendo la expresión de ciertos factores de transcripción y a su vez la división celular. A pesar de que no es el resultado que cumple los objetivos de este trabajo, no deja de ser interesante realizar una investigación más detallada para saber como se promueve esta división celular y poder aplicarlo a enfermedades degenerativas.



Figura 10. Efecto citótoxico de 13 fracciones de veneno total de *C. ximenes*. A) H1299, B) H1437, C) H1975, D) H661. Se analizó el efecto de las fracciones obtenidas en la purificación por RP-HPLC en las líneas celulares de cáncer de pulmón. Después de exponer a las células a 50  $\mu$ g/ml durante 24 horas, se agrega el reactivo colorimétrico MTS y se mide la absorbancia de cada tratamiento a 490 nm. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media±SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental.

En la tabla 3 se muestra un esquema de las fracciones que se repurificaron en base a los resultados de citotoxicidad obtenidos para las líneas celulares: H1299, H1975 y H661. Al realizar la repurificación de las fracciones que tuvieron mayor efecto citotóxico, se separan los componentes. De esa manera, se puede identificar cual componente del veneno tiene el efecto deseado y posteriormente poder caracterizarlo.

Línea celular	Fracción	Porcentaje de superviencia celular (%)
H1299	5	35
	9	22
H1975	5	40
	6	42
	7	29
	8	22
	9	29
	12	21
H661	5	22
	6	26
	9	17
	12	34

Tabla 3. Esquema de repurificación de las fracciones de C. ximenes

# 7.5 Repurificación de las fracciones de *C. ximenes* y ensayos de citotoxicidad con las subfracciones obtenidas

### 7.5.1 Fracción 5

La fracción 5 se repurificó con un gradiente suave de 0 a 35% de solución B (Anexo 2), en una corrida de 60 minutos con un flujo de 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Se inyectaron 156.25  $\mu$ g de muestra en un volumen final de 200  $\mu$ l. Se colectaron las subfracciones de manera individual y se nombraron con el número 5 primero para indicar que pertenecen a la fracción 5. En la figura 11 se muestra el cromatograma de las subfracciones obtenidas.



Figura 11. Cromatograma de la repurificación de la fracción 5. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm, en el eje "y" izquierdo. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida. En la parte superior con números rojos se indica el nombre de cada subfracción obtenida.

Se realizó el ensayo de citotoxicidad con las subfracciones obtenidas en la repurificación de la fracción 5 (Figura 12) y las líneas celulares H1299, H1975 y H661.



Figura 12. Efecto citótoxico de subfracciones de la fracción 5 de *C. ximenes*. Se analizó el efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación por RP-HPLC en la líneas celularres de cáncer de pulmón H1299, H1975 y H661. Los resultados fueron normalizados con el C- para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media  $\pm$  SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental. Se agregaron 6.286, 6.625 y 2.789 µg de cada subfracción, respectivamente.

37

En los resultados se observa (Figura 12) que las subfracciones obtenidas en la repurificación de la fracción 5 no disminuyen la supervivencia celular en ninguna de las líneas analizadas, a excepción de la subfracción 5.3 que disminuye de manera significativa (17%) en la línea H1299. Estos resultados no son los esperados ya que la fracción 5 tuvo un efecto muy significativo al disminuir la supervivencia celular de la línea H1299 en un 34%, H1975 en 40% y H661 en un 22%, sin embargo, es probable que los componentes del veneno actúen de manera diferente o contraria cuando se separan y se prueban individualmente. Este puede ser el caso de la fracción 5, se lograron repurificar tres subfracciones pero al probarlas de manera individual no tuvieron el mismo efecto que se obtuvo con la fracción 5 total. Otra razón pudiese ser la concentración que se utilizó de cada una de las subfracciones en los ensayos de citotoxicidad, una opción sería repetir el ensayo con una cantidad mayor de cada subfracción para poder elucidar los resultados.

#### 7.5.2 Fracción 6

La fracción 6 se repurificó con un gradiente de 8 a 37% de solución B (Anexo 2), en una corrida de 60 minutos con un flujo de 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Se inyectaron 117  $\mu$ g de muestra en un volumen final de 200  $\mu$ l. Se colectaron las subfracciones de manera individual y se nombraron con el número 6 primero para indicar que pertenecen a la fracción 6. A continuación se muestra el cromatograma de las subfracciones obtenidas (Figura 13).



Figura 13. Cromatograma de la repurificación de la fracción 6. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm en el eje "y" izquierdo. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida. En la parte superior con números rojos se indica el nombre de cada subfracción obtenida.

Se realizó el ensayo de citotoxicidad como se indica en el apartado 6.6 con las líneas H1975 (Figura 14) y H661 (Figura 15). Se probaron las 17 subfracciones obtenidas de la repurificación de la fracción 6.



Figura 14. Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 6 de *C. ximenes* con la línea celular H1975. Se analizó el efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación por RP-HPLC en la línea celular de cáncer de pulmón H1975. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento, 100%) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media  $\pm$  SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental. Se agregaron 1.725, 6.494, 1.46, 4.272, 1.358, 3.494, 1.92, 1.618, 0.901, 2.325, 0.531, 0.964, 0.762, 0.013 µg de cada subfracción, respectivamente.

En el resultado del ensayo de citotoxicidad con la línea H1975 (Figura 14) se observa que la mayoría de las subfracciones aumentan la supervivencia celular, a excepción de las subfracciones 6.9 que disminuye en un 6% y 6.12 en un 12%. Por lo tanto, las subfracciones 6.9 y 6.12 pudieran ser los componentes que poseen actividad citótoxica dentro de la fracción 6.



Figura 15. Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 6 de *C. ximenes*. Se analizó el efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación por RP-HPLC en la línea celular de cáncer de pulmón H661. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento, 100%) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media  $\pm$  SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental. Se agregaron 1.725, 6.494, 1.46, 4.272, 1.358, 3.494, 1.92, 1.618, 0.901, 2.325, 0.531, 0.964, 0.762, 0.013 µg de cada subfracción, respectivamente.

Para la línea celular H661 (Figura 15), las subfracciones que presentaron una mayor disminución de la supervivencia celular son 6.6 que disminuye la supervivencia celular en un 26%, 6.8 en un 16% y 6.15 en un 15%.

## 7.5.3 Fracción 7

La fracción 7 se repurificó con un gradiente suave que va de 13 a 42% de solución B (Anexo 2), en una corrida de 60 minutos con un flujo de 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Se inyectaron 155.25  $\mu$ g de muestra en un volumen final de 200  $\mu$ l. Se colectaron las subfracciones de manera individual y se nombraron con el número 7 primero para indicar que pertenecen a la fracción 7.



Figura 16. Cromatograma de la repurificación de la fracción 7. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm en el eje "Y" derecho. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida. En la parte superior con números rojos se indica el nombre de cada subfracción obtenida.

De la repurificación de la fracción 7 se obtuvieron 12 subfracciones (Figura 16) que fueron probadas en la línea celular H1975. En la figura 17, se muestra el resultado obtenido en el ensayo de citotoxicidad.



Figura 17. Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 7 de *C. ximenes*. Se analizó el efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación por RP-HPLC en la línea celular de cáncer de pulmón H1975. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento, 100%) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media  $\pm$  SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental. Se agregaron 1.648, 3.422, 0.83, 2.59, 12.825, 22.32, 3.458, 6.66, 13.978, 0.978, 0.832, 1.448 µg de cada subfracción, respectivamente.

Se puede observar que, la mayoría de las subfracciones disminuyen la supervivencia celular de manera significativa, siendo las subfracciones 7.1, 7.2, 7.5, 7.6 y 7.9 que disminuyen en un mayor porcentaje la supervivencia celular 37, 40, 18, 16 y 24%, respectivamente.

## 7.5.4 Fracción 8

Se repurificó la fracción 8 (Figura 18) con un gradiente suave que va de 18 a 47% de solución B, en una corrida de 60 minutos con un flujo de 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Se inyectaron 115  $\mu$ g de muestra en un volumen final de 200  $\mu$ l. Se colectaron las subfracciones de

manera individual y se nombraron con el número 8 primero para indicar que pertenecen a la fracción 8.



Figura 18. Cromatograma de la repurificación de la fracción 8. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm en el eje "y" izquierdo. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida. En la parte superior con números rojos se indica el nombre de cada subfracción obtenida.

De la repurificación de la fracción 8 se obtuvieron un total de 8 subfracciones siendo la subfracción 8.8 la subfracción mayoritaria. Se probó la citotoxicidad de todas las subfracciones obtenidas en la línea H1975 (Figura 19).



Figura 19. Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 8 de *C. ximenes*. Se analizó el efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación por RP-HPLC en la línea celular de cáncer de pulmón H1975. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento, 100%) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media  $\pm$  SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental. Se agregaron 0.678, 0.678, 3.175, 1.498, 1.675, 6.98, 4.355, 26.618 µg de cada subfracción, respectivamente.

En el resultado, se puede observar que todas las subfracciones disminuyen de manera significativa la supervivencia celular de la línea H1975, la subfracción mayoritaria 8.8 tiene un porcentaje de disminución de 31%.

#### 7.5.5 Fracción 9

Se repurificó la fracción 9 con un gradiente de 23 a 52% de solución B (Figura 20), en una corrida de 60 minutos con un flujo de 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Se inyectaron 130 µg de muestra en un volumen final de 200 µl. Se colectaron las subfracciones de manera individual y se nombraron con el número 9 primero para indicar que pertenecen a la fracción 9.



Figura 20. Cromatograma de la repurificación de la fracción 9. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm en el eje "Y" derecho. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida. En la parte superior con números rojos se indica el nombre de cada subfracción obtenida.

En el ensayo de citotoxicidad (Figura 21), se muestra que la mayoría de las subfracciones disminuyen de manera significativa la supervivencia celular de la línea H1299, la subfracción mayoritaria 9.4 disminuye en un 21% y la subfracción 9.6 es la que tiene mayor efecto al disminuir la supervivencia celular en un 28%. En la línea H1975 la subfracción 9.5 tuvo mayor efecto citotóxico al disminuir la supervivencia celular en un 26%. El ensayo de citotoxicidad con la línea H661 reveló que ninguna de las subfracciones tuvo efecto de disminución, al contrario, la mayoría de las subfracciones aumentan la supervivencia celular.



Figura 21. Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 9 de *C. ximenes*. Se analizó el efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación por RP-HPLC en la líneas celulares de cáncer de pulmón H1299, H1975 y H661. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento, 100%) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media ± SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental. Se agregaron 1.755, 1.755, 4.481, 0.706, 0.706 y 1.351 µg de cada subfracción, respectivamente.

## 7.5.6 Fracción 12

Se repurificó la fracción 12 con un gradiente suave de 38 a 62% de solución B (Figura 22), en una corrida de 60 minutos con un flujo de 0.3 ml min<sup>-1</sup>. Se inyectaron 168.25  $\mu$ g de muestra en un volumen final de 200  $\mu$ l. Se colectaron las subfracciones de manera individual y se nombraron con el número 12 primero para indicar que pertenecen a la fracción 12.



Figura 22. Cromatograma de la repurificación de la fracción 12. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm en el eje "y" derecho. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida. En la parte superior con números rojos se indica el nombre de cada subfracción obtenida.

Se obtuvieron un total de 9 subfracciones de la repurificación de la fracción 12, que se probaron en la línea H1975 (Figura 23).



Figura 23. Ensayo de citotoxicidad con subfracciones de la fracción 12 de *C. ximenes*. Se analizó el efecto de las subfracciones obtenidas en la repurificación por RP-HPLC en la líneas celulares de cáncer de pulmón H1975 y H661. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento, 100%) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media ± SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental. Se agregaron 4.121, 1.216, 0.556, 0.235, 2.026, 2.026, 0.845, 0.845, 2.859 µg de cada subfracción, respectivamente.

Las subfracciones que tuvieron una diferencia significativa respecto al control negativo fueron 12.2, 12.5 y 12.6, que disminuyen la supervivencia celular de H1975 9, 11 y 12%, respectivamente.

## 7.6 Purificación del veneno total de C. californicus

La purificación del veneno total de *C. californicus* se realizó por HPLC- RP, en una corrida de 60 minutos con un gradiente del 0 al 60% de solución B (Anexo 2). En la figura 24, se muestra el cromatograma obtenido.



Figura 24. Purificación del veneno total de *C. californicus* por RP-HPLC. En la parte inferior se indican las 13 fracciones obtenidas, de cinco minutos cada una, en una corrida de 60 minutos con un gradiente que va de 0 a 60% de solución B. El gradiente se indica con una línea roja en la escala del eje "y" derecho, con azul se indican los picos detectados a una longitud de onda de 230 nm en el eje "y" derecho. En el eje "x" se indican los minutos de la corrida.

Se obtuvieron un total de 13 fracciones que contienen los componentes del veneno total de *C. californicus*. Las fracciones obtenidas se probaron en las cuatro líneas celulares

de cáncer de pulmón para identificar las fracciones que tengan un efecto citotóxico en las células.

# 7.7 Ensayos de citotoxicidad en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón con las fracciones del veneno total de *C. californicus*

El resultado del ensayo de citotoxicidad con las 13 fracciones de veneno total de *C. californicus* (Figura 25), muestra que la mayoría de las fracciones no presentan un efecto citotóxico significativo en las cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón. Las fracciones que mostraron una disminución significativa de la supervivencia celular fueron la fracción 5 que disminuye el 12% de supervivencia de la línea H1437, la fracción 7 que disminuye en 11% la supervivencia de la línea H1975 y la fracción 9 que disminuye la supervivencia de las líneas H1437 y H661 en 11 y 15%, respectivamente.



Figura 25. Efecto citótoxico de 13 fracciones de veneno total de *C. californicus*. A) H1299, B) H1437, C) H1975, D) H661. Se analizó el efecto de las fracciones obtenidas en la purificación por RP-HPLC en las líneas celulares de cáncer de pulmón. Después de exponer a las células a 50  $\mu$ g/ml durante 24 horas, se agrega el reactivo colorimétrico MTS y se mide la absorbancia de cada tratamiento a 490 nm. Los resultados fueron normalizados con el C- (células sin tratamiento) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media±SEM. p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de student, no pareada). n=3. Se utilizó DMSO al 5% como control positivo (C+) experimental.

# 7.8 Péptidos sintéticos basados en las secuencias de los péptidos nativos de los *Conus ximenes* y *Conus californicus*

Se probaron ocho péptidos sintéticos provenientes de secuencias nativas de los caracoles *Conus californicus*, cuatro de *Conus ximenes* y un péptido proveniente de la anemona marina *Stichodactyla helianthus* (Tabla 4). Se realizó un ensayo de citotoxicidad para conocer el potencial de los 12 péptidos mencionados anteriormente,

para disminuir la supervivencia celular de las líneas celulares H1299, H1437, H1975 y H661.

Nombre	Origen	Masa	Número de	Patrón de	Bibliografía
		molecular (Da)	aminoácidos	cisteínas	
				XIV,	
				reportado	
cal16_2	Conus californicus	1325.564	13	para la	Bernáldes et al.,
				superfamilia	2011.
				М	
cal16b_1		1325.564	13		
xm1a		1519.6	14	C-C-CC	Bernáldez, 2013.
xm1b	Conus ximenes	1519.6	14		
xm1c		1538.78	14		
cal14.1a		1847.16	17	XIV C-C-C-C	Cervantes,
					2013.
cal14.1b	Conus californicus	1775.1	17		
cal14c		1858.1	17		
cal14.2b		1828.07	17		
cal14.2c		1844.07	17		
cal14b		1904.22	17		
St I (esticolisina)	Stichodactyla	3246.7	31	No	Casallanovo et
	helianthus				<i>al.</i> , 2005; Cilli et
					al., 2007.

Tabla 4. Lista de péptidos sintéticos.

# 7.9 Ensayo de citotoxicidad con péptidos sintéticos en líneas celulares de cáncer de pulmón

El ensayo de citotoxicidad con los 12 péptidos sintéticos y las cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón, fue evaluado utilizando el método colorimétrico del reactivo MTS (Malich, Markovic, & Winder, 1997). En todas las líneas celulares (Figura 26) se observa que los péptidos cal14.1a, cal14.1b, cal14.2b y xm1b, disminuyen la supervivencia celular hasta un 30%.



Figura 26. Efecto citotóxico de 12 péptidos sintéticos en la supervivencia celular. Las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299, H1437, H1975 y H661 se cultivaron en placas de 96 pozos y fueron tratadas con 50 μg/ml de cada péptido durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm con el reactivo MTS. Los resultados se normalizaron con el C-para obtener el porcentaje de supervivencia celular y se expresaron como la media±SEM. Para el C+ se utilizó DMSO al 5%. Los experimentos se realizaron en triplicado. \*p<0.05, \*\*p<0.001 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de Student's, no pareada).

Se repitió el ensayo de citotoxicidad con los péptidos cal14.1a, cal14.1b y xm1b en la línea H1299, y cal14.1a y xm1b en las líneas H1437, H1975 y H661. Con el fin de corroborar el resultado obtenido en el ensayo con los 12 péptidos sintéticos y trabajar en ensayos posteriores con los que presentaron un mayor efecto citotóxico en las cuatro líneas celulares.

Para el ensayo se utilizaron los mismos parámetros anteriores. Esta vez utilizando como control positivo (C+) estaurosporina, que es un alcaloide aislado de *Streptomyces* 

staurosporeus que se conoce por activar apoptosis en numerosas células de cáncer (Yadav et al., 2015). El resultado muestra que, efectivamente los péptidos analizados en la línea H1299 (cal14.1a, cal14.1b y xm1b) disminuyen hasta 30% de la supervivencia celular, porcentaje muy parecido al que muestra el C+ (staurosporina) (Figura 27A). Lo mismo se observa para las líneas H1437, H1975 y H661 al ser expuestas a los péptidos cal14.1a y xm1b, disminuyen la supervivencia celular (Figura 27B-D).

El péptido cal14.1b se probó únicamente en la línea celular H1299, debido a que presentó mayor actividad citótoxica en esta línea al disminuir la supervivencia celular en un 40%.



Figura 27. Efecto citotóxico de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en la supervivencia celular. Las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299, H1437, H1975 y H661 se cultivaron en placas de 96 pozos y fueron tratadas con 27  $\mu$ M de cal14.1a. 28  $\mu$ M de cal14.1b y 33  $\mu$ M de xm1b, durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm con el reactivo MTS. Los resultados se normalizaron con el C- para obtener el porcentaje de supervivencia celular y se expresaron como la media±SEM. Para el C+ se utilizó 5  $\mu$ M de estaurosporina. Los experimentos se realizaron en triplicado. \*p<0.05, \*\*p<0.001 y \*\*\*p<0.001 respecto al C- (*t* de Student's, no pareada).

# 7.10 Análisis de la expresión de subunidades de nAChRs

Se ha presentado evidencia que las células de cáncer de pulmón expresan diferentes subunidades de los nAChRs como,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$ , y su sobreexpresión esta directamente relacionada con la patogénesis y resistencia del cáncer de pulmón (Lam et al., 2007; Ma et al., 2014; Reina Improgo et al., 2013; Tsurutani et al., 2005). En este trabajo, se determinó la expresión de los niveles de transcritos de diferentes subunidades de nAChRs en las líneas H1299, H1437, H1975 y H661 (Figura 28). En todas las líneas celulares se expresó la subunidad  $\alpha 5$ ; H1299 (Figura 28A) y H1437 (Figura 28B) expresan niveles menores de  $\alpha 7$ . H1974 también expresa la subunidad  $\alpha 9$  (Figura 28C). La línea celular H661 también expresa las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  (Figura 28D). Debido a que los resultados muestran que efectivamente, las líneas celulares empeladas expresan diferentes subunidades de nAChRs, surge la hipótesis que cal14.1a, cal14.1b y xm1b actúen sobre estas, bloqueando la cascada de señalización río abajo.



Figure 28. Expresión de subunidades de nAChRs. A) H1299, B) H1437, C) H1975 and D) H661. Los niveles de ARNm se compararon por RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados con el gen  $\beta$ -actina y expresados como la media±SD.

## 7.11 Análisis de la expresión de genes relacionados con apoptosis

Se analizó el efecto de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en la expresión del ARNm de los genes relacionados en la apoptosis Bcl-2, BAX, NF $\kappa$ B-1 y COX-2, por RT-qPCR. El "treshold cycles" (CT) del gen de referencia ( $\beta$ -actina) y de los genes blanco (Bcl-2, BAX, NF $\kappa$ B-1 y COX-2) se determinaron para cada tratamiento. El nivel de expresión de ARNm relativo de cada gen blanco fue normalizado contra  $\beta$ -actina y después con el control negativo (C-) de cada tratamiento, calculado como se indica en el método de la curva estandar relativa (Skrzypski, 2008). Las células se incubaron con 54 µM de

cal14.1a, 56 µM de cal14.1b, 66 µM de xm1b y como control positivo (C+) 7 µM de estaurosporina. Se utilizó el doble de concentración en los tratamientos que en los ensayos de citotoxidad presentados anteriormente. Esto debido a que en esta ocasión se cultivó 10 veces más el número de células, asegurando así observar un efecto similar en los cultivos.

En la Figura 29, se muestra el resultado de la expresión de los niveles de ARNm de BAX, Bcl-2, NFκB-1 y COX-2. Es ampliamente conocido que BAX codifica para una proteína proapoptótica (Paul-Samojedny et al., 2005), por lo tanto, se espera un aumento en su expresión después del tratamiento con los péptidos sintéticos y C+. Sin embargo, en la línea H1299 (Figura 29A) se observa un aumento de los niveles de ARNm de BAX pero una disminución en el C+. Los niveles de Bcl-2 parecen ser muy elevados con cal14.1a y cal14.1b, al igual que con el C+ (Figura 29A). Esto es contradictorio a las expectativas debido a que Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica (Akl et al., 2014), se esperan que sus niveles de ARNm sean reducidos al exponer las células a tratamiento con inductores de apoptosis conocidos como, estaurosporina. Respecto a la expresión de NFκB-1 en la línea H1299 (Figura 29A), se observa una disminución significativa de los niveles de expresión con los péptidos cal14.1b y xm1b, así como con el C+. El péptido cal14.1a aumenta de manera significativa la expresión de NFκB-1. Los niveles de ARNm del gen COX-2 (Figura 29A) disminuyen de manera significativa con xm1b, pero aumentan con los cal14.1a y con el C+.

En la línea H1437 (Figura 29B), la expresión de Bcl-2 aumentó después del tratamiento con cal14.1a y en mayor proporción con el C+ (60-veces). Con respecto a NFκB-1 los niveles de ARNm mostraron una disminución menor con cal14.1a y xm1b comparada con el C+, que mostró un decrecimiento considerable (0.7-veces) después de 24 horas de tratamiento. Se observó una disminución de la expresión de COX-2 después del tratamiento con xm1b, al igual que con el C+. Para el gen BAX, no se observó una diferencia significativa entre el C- y los péptidos, sólo disminuyó su expresión con el C+.

La expresión de genes en la línea H1975 (Figura 29C), mostró que BAX no tuvo diferencia significativa con respecto al C- en ninguno de los tratamientos. Los niveles de

Bcl-2 fueron ligeramente incrementados (0.25-veces) con cal14.1a, mientras que el C+ y xm1b no presentaron diferencia significativa con respecto al C-. Los niveles de ARNm de NFκB-1 fueron equivalentes en los tres tratamientos (cal14.1a, xm1b y C+), presentando una disminución significativa de su expresión en comparación con el C-. La expresión del gen COX-2 mostró un aumento con el tratamiento con xm1b y un incremento considerable con el C+ (50-veces).

El resultado en la línea H661 (Figura 29D), mostró que la expresión de BAX disminuye de manera significativa con el C+ y xm1b. El tratamiento de las células de la línea H661 con cal14.1a y xm1b, así como con el C+, mostraron un incremento en los niveles de ARNm de Bcl-2 ( $\cong$ 3-veces). Mientras que en las células tratadas con el C+, se incrementó la expresión de Bcl-2 (8-veces), como se ha observado previamente en las otras tres líneas celulares analizadas. Los niveles de NFkB-1 y COX-2 no mostraron una diferencia significativa en el tratamiento con los cal14.1a y xm1b, comparado con el C-.



Figura 29. Perfil de expresión de ARNm de BAX, BcI-2, NF $\kappa$ B-1 y COX-2 en A) H1299, B) H1437, C)H1975 y D) H661. Un total de 1x10<sup>6</sup> células se trataron con 54  $\mu$ M de cal14.1<sup>a</sup>, 56  $\mu$ M de cal14.1b y 66  $\mu$ M de xm1b durante 24 horas. El ARN total fue aislado y tratado con DNase, 2  $\mu$ g se retrotranscribieron con el kit SuperScript III, utilizando oligodT<sub>20</sub> y hexámeros al azar. Los niveles de ARNm fueron comparados por RT-qPCR. Los resultados se normalizaron con el gen  $\beta$ -actina y se expresaron como la media±SD relativa al C- (células sin tratamiento). Como control positivo (C+) las células se trataron con 7  $\mu$ M de estaurosporina. n=3. \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001 con respecto al C- (*t* de Student, no pareada).

La expresión de genes relacionados en la apoptosis en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón tuvo un resultado interesante. En el caso del gen Bcl-2, los niveles de ARNm fueron incrementados en las cuatro líneas celulares analizadas después de 24 horas de tratamiento con los tres péptidos sintéticos (cal14.1a, cal14.1b y xm1b). Debido a que Bcl-2 es una proteína antiapoptótica, se esperaba una disminución de sus niveles de expresión. Por otra parte, la expresión del gen proapoptótico BAX se incrementó en la línea H1299 con cal14.1a pero disminuyó con xm1b y con el C+ (Figura 29A). En las líneas H1437, H1975 y H661 no se observó una diferencia significativa de los niveles de BAX comparados con el C-, a excepción, de xm1b que disminuye de manera significativa en la línea H661 al igual que el C+ (Figura 29B-C). Ambos genes, BAX y Bcl-2 se expresaron de manera contraria a las expectativas. Los
niveles de expresión de NFkB-1 y COX-2, fueron diferentes en todas las líneas celulares. NFkB-1, se incrementó con cal14.1a, mientras que, con cal14.1b, xm1b y C+ los niveles disminuyeron en H1299. Así mismo, en las líneas H1437 y H1975 los niveles de expresión de NFkB-1 tuvieron un decrecimiento en el tratamiento con cal14.1a, xm1b y con el C+. La vía de señalización de NFkB juega una función importante promoviendo la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales (Chai et al., 2014). Los niveles del gen COX-2 fueron ligeramente incrementados en la línea H1299 con cal14.1a y con el C+, lo mismo para la línea H1975 donde se observó un incremento de COX-2 con el péptido xm1b y con el C+ (Figura 29). Sin embargo, en la línea H1299 se mostró una disminución de los niveles de COX-2 con el péptido xm1b, asimismo, en la línea celular H1437 se observó una disminución de la expresión de este gen con xm1b y con el C+. Pese a que estos resultados son un tanto contradictorios a las expectativas que se tienen de acuerdo a la literatura, BAX, Bcl-2, NFkB-1 y COX-2 son solamente cuatro de los diferentes genes involucrados en la regulación de la apoptosis. Un análisis más global pudiese revelar más cambios en la expresión de genes, que no se vieron reflejados en los genes analizados en este trabajo.

#### 7.12 Activación de caspasa-3 y -7 en células de cáncer de pulmón

Para determinar si los péptidos sintéticos cal14.1a, cal14.1b y xm1b, promueven muerte celular en las líneas celulares de cáncer de pulmón, buscamos analizar la activación de la apoptosis. La ejecución de la apoptosis depende de la actividad proteolítica de la caspasa-3 y -7, que a su vez escinden substratos de proteínas que llevan a las células a un desequilibrio metabólico (Walsh et al., 2008). Después de incubar las líneas celulares con los tratamientos, la activación de la caspasa-3 y -7 fue evaluada por microscopia de fluorescencia, utilizando el kit comercial CellEvent<sup>™</sup>Caspase-3/7. Este kit se basa en la emisión de fluorescencia debido a una escisión del péptido DEVD cargado. Además, las células se tiñeron con los colorantes nucleares Hoechst 33342 y ioduro de propidio (IP), este último también es utilizado para identificar células necróticas o apoptóticas. Después de capturar las imágenes en diferentes tiempos de incubación, se calculó el porcentaje de células positivas a la activación de la caspasa-3

y -7 y aquellas células teñidas con IP. Cabe destacar, que las imágenes no siempre coinciden con el conteo celular indicado en las gráficas, esto se debe a que a imagen abarca cierta área de todas las imágenes tomadas y el conteo es para todas las células.

Después de incubar las células de la línea H1299, muestran un mayor porcentaje de activación de la caspasa-3 y -7 a las 12 horas de incubación con los péptidos cal14.1a y xm1b, 41 y 48%, respectivamente, mientras que a las 6 y 24 horas de incubación el porcentaje de células positivas fue menor (Figura 30). Las células tratadas con estaurosporina (C+) mostraron 36% de células positivas durante todos los horarios analizados. Estos resultados sugieren que las células de H1299 son más sensibles a cal14.1a y xm1b que al C+.



Figura 30. Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H1299. Las células fueron tratadas con 27 µM de cal14.1a, 28 µM de cal14.1b y 33 µM de xm1b por 3, 6, 12 y 24 horas. Se incubaron con CellEvent<sup>™</sup>Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A) Imágenes representativas indicando las células sin tratamiento (C-), células tratadas con cal14.1a, cal14.1b y xm1b y el C+ (1 µM de estaurosporina). B) Conteo de células positivas a diferentes colorantes. Las células teñidas de azul se consideraron como el 100%. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células positivas a caspasa-3 y -7 (verde) y a IP( (rojo).

La activación de la caspasa-3 y-7 en la línea celular H1437 (Figura 31), muestra un porcentaje de células positivas del 22% después de 3 horas de incubación con cal14.1a, seguido de un decrecimiento a las 6 y 12 horas (5%) y un incremento final a las 24 horas (14%), al igual que xm1b que muestra un porcentaje del 25% a las 24 horas. El tratamiento con estaurosporina (C+) induce una mayor activación de la caspasa-3 y -7 a las 24 horas de incubación (64%). Estos resultados difieren de los

obtenidos con la línea H1299, que activan un mayor porcentaje de células a las 6 y 12 horas. Esto puede indicar que la activación de la caspasa-3 y -7 depende del tipo de célula y del estímulo para inducir apoptosis (Wolbers, Buijtenhuijs, Haanen, & Vermes, 2004).



Figura 31. Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H1437. Las células fueron tratadas con 27  $\mu$ M de cal14.1a y 33  $\mu$ M de xm1b por 3, 6, 12 y 24 horas. Se incubaron con CellEvent<sup>TM</sup>Caspase-3/7 (verde), Hoechst 33342 (azul) y IP (rojo) durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A) Imágenes representativas indicando las células sin tratamiento (C-), células tratadas con cal14.1a y xm1b y el C+ (1  $\mu$ M de estaurosporina). B) Conteo de células positivas a diferentes colorantes. Las células teñidas de azul se consideraron como el 100%. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células positivas a caspasa-3 y -7 (verde) y a IP( (rojo).

Con respecto a las líneas celulares H1975 y H661, ninguna de las dos presenta más del 7% de células positivas a caspasa-3 y -7 en ninguno de los tratamientos con cal14.1a y xm1b (Figura 32A y 33A). Las células de H1975 y H661 tratadas con estaurosporina muestran un 27 y 34% de células positivas, respectivamente (Figura 32B y 33B). Este tipo de células parece ser más resistente a la activación de la apoptosis y pudiese necesitar mayor tiempo de incubación con los tratamientos o mayor concentración de éstos.



Figura 32. Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H1975. A) Imágenes representativas indicando las células sin tratamiento (C-), células tratadas con cal14.1a y xm1b y el C+ (1  $\mu$ M de estaurosporina). B) Conteo de células positivas a diferentes colorantes. Las células teñidas de azul se consideraron como el 100%. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células positivas a caspasa-3 y -7 (verde) y a IP( (rojo).



Figura 33. Lapso de activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H661. A) Imágenes representativas indicando las células sin tratamiento (C-), células tratadas con cal14.1a y xm1b y el C+ (1  $\mu$ M de estaurosporina). B) Conteo de células positivas a diferentes colorantes. Las células teñidas de azul se consideraron como el 100%. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células positivas a caspasa-3 y -7 (verde) y a IP( (rojo).

Todas las líneas celulares mostraron porcentajes de células positivas a IP y caspasa-3 y -7. Después del tratamiento con cal14.1a, cal14.1b y xm1b, se observó un porcentaje de células positivas a IP en las líneas H1299 y H1437. Esto confirma los resultados obtenidos en la activación de la caspasa-3 y -7 y demuestra que los péptidos inducen apoptosis.

### 8.1 Componentes citotóxicos dentro del veneno de los caracoles *Conus ximenes y Conus californicus*

Se analizó el efecto del veneno total de las especies *C. ximenes* y *C. californicus* sobre cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón. El ensayo de citotoxicidad con las fracciones del veneno total de *C. ximenes* (Figura 10) mostró que la mayoría de las fracciones disminuyen de manera significativa la supervivencia celular de las líneas H1299, H1975 y H661, hasta en un 40%. Por el contrario, en la especie *C. californicus* se observó que solo las fracciones 5, 7 y 9 disminuyen solo el 15% de la supervivencia celular (Figura 25). Estos resultados comprueban la diversidad de las conotoxinas entre una especie y otra. Poseen componentes específicos para ciertos blancos moleculares que muestran un efecto diferente en las líneas celulares analizadas.

En el ensayo con las 13 fracciones de veneno total de C. ximenes, se observó que la mayoría aumentan la supervivencia celular de la línea H1437 (Figura 10A), efecto contrario al esperado para cumplir los objetivos de este trabajo. Los mismo se observó, al realizar las repurificaciones de varias fracciones en las líneas H1299, H1975 y H661. Cuando se separaron los componentes de las fracciones que mostraron efecto citótoxico y se probaron individualmente, algunas de estas provocaron un efecto contrario, es decir, aumentaron la supervivencia de las mismas líneas celulares o no mostraron diferencia significativa con respecto al control negativo (ej. Fracciones 5, 6, 7, 9 y 12). Generalmente, los Conus, alteran cualquier proceso fisiológico en diferentes puntos utilizando múltiples péptidos, así maximizando el éxito en la ejecución de sus presas (Baldomero M. Olivera, 2002). La combinación de estos conopéptidos que funcionan en conjunto para obtener una respuesta fisiológica en específico ha sido referido cono "cabal". Cada componente en el cabal es farmacológicamente distinto (Becker & Terlau, 2008; Baldomero M Olivera & Teichert, 2007; Terlau & Olivera, 2004; Wang & Chi, 2004). Por lo tanto, si estos componentes se separan pueden perder su sinergismo y actuar de manera diferente, es el caso de las fracciones de C. ximenes que tuvieron efecto contrario en los ensayos de citotoxicidad, después de haber sido separadas en la repurificación. Esto no significa que no pudiesen tener una importancia farmacológica para objetivos diferentes a los de este trabajo. También, es posible que una concentración mayor en los ensayos citótoxicos con las subfracciones sea necesaria para ver un efecto equivalente al observado en nos ensayos con las fracciones de veneno total. La fracción 8 (Figura 19), muestra el mejor resultado ya que todos los componentes que se lograron obtener de manera individual en la repurificación, disminuyen de manera altamente significativa la supervivencia celular de la línea H1975 (hasta 60%).

De manera natural, el veneno de los *Conus* es obtenido en cantidades muy pequeñas, por lo tanto, trabajar forma nativa limita sus aplicaciones en investigación. La síntesis química o recombinante de conotoxinas surge como alternativa para producirlas a gran escala (Becker & Terlau, 2008). En este trabajo, se logró identificar componentes dentro del veneno de *C. ximenes* que pudiesen ser péptidos potenciales para el tratamiento del cáncer de pulmón, y candidatos para caracterizarlos hasta obtener su secuencia y consecuentemente la síntesis química o recombinante.

# 8.2 Características de los péptidos sintéticos cal14.1a, cal14.1b y xm1b

Los péptidos sintéticos cal14.1a y cal14.1b (secuencias GDCPPWCVGARCRAEKC y GDCPPWCVGARCRAGKC, respectivamnte) se obtuvieron sintéticamente a partir de la secuencia nativa de ambos péptidos provenientes de *C. californicus*. Fueron caracterizados biológicamente por primera vez en el trabajo de Cervantes, 2013, forman parte de una nueva superfamilia denominada como J<sub>2</sub> (Biggs et al., 2010). Tienen una longitud de 17 aminoácidos y mantienen el arreglo (X2)-CPP(X)-C(X4)-C(X4)-C-, donde el patrón de cisteínas y dos prolinas seguidas de la primera cisteína, son altamente conservadas entre sí y con otras conotoxinas activas sobre los nAChRs como, It14a de *Conus literattus*, Pu14a de *Conus pulicarius* y ts14a de *Conus tessulatus* (Tabla 5)

(Peng et al., 2006, 2010; B. Zhang, Huang, & Du, 2012). Además, se ha descrito que los residuos alifáticos hidrofóbicos, como Leu y Val, que se encuentran en posiciones clave (posición 7 del segundo) dentro de la secuencia de las conotoxinas, aumentan de manera significativa la afinidad hacia los nAChRs (López-Vera, Aguilar, et al., 2007; B. Zhang et al., 2012). De esta manera, se pudo asumir que los péptidos sintéticos cal14.1a y cal14.1b, pudiesen actuar sobre los nAChRs.

Nombre	Especie	Secuencia	Cita
cal14.1a	C. californicus	GDCPPWCVGARCRAEKC	Cervantes, 2013
cal14.1b		GDCPPWCVGARCRAGKC	
lt14a	C. literattus	MCPPLCKPSCTNC-NH2	Peng et al., 2006
Pu14a	C. pulicarius	DCPPHPVPGMHKCVCLKTC	Peng et al., 2010; B. Zhang et al., 2012
Ts14a	C. tessulatus	DGCPPHPVPGMHPCMCTNTC	Peng et al., 2010

Tabla 5. Comparación de secuencias de cal14.1a y cal14.1b con diferentes α-conotoxinas.

En el trabajo de Cervantes (2013), se demostró que cal14.1a tiene un efecto proinflamatorio y cal14.1b un fuerte efecto anti-inflamatorio en macrófagos. La única variación entre ambas secuencias es el residuo Gly15 en cal14.1b, que se cambia por un Glu en cal14.1a. El hidrógeno de la cadena lateral de la Gly le da una mayor flexibilidad, lo que da como resultado que se encuentre en zonas de plegamiento, el cambio por otro aminoácido puede afectar la estructura tridimensional y la función del péptido (Betts y Russell, 2003). Esto puede explicar las los resultados que presentan cal14.1a y cal14.1b en la línea H1299. En el análisis de la expresión de genes relacionados en la apoptosis, cal14.1a aumenta de manera significativa la expresión del gen BAX (15-veces), mientras que, cal14.1b no presenta diferencia con respecto al control negativo. Para Bcl-2, ambos péptidos aumentan la expresión del gen siendo cal14.1a el que incrementa en mayor proporción (4-veces), comparado con cal14.1b (0.5-veces). Ambos péptidos muestran diferencias en la activación de la caspasa-3 y -7 en la línea celular H1299. Por un lado, cal14.1a muestra un mayor porcentaje de células positivas a caspasa-3 y -7 a las 12 horas (41%) mientras que, cal14.1b solo presenta el 20% de células positivas a las 6 horas de tratamiento. Por lo tanto, el cambio de un aminoácido a otro puede influir en la conformación estructural del péptido, y en la diferencia que presenta cal14.1a en los resultados. El péptido cal14.1a, disminuye de manera significativa genes que codifican para proteínas involucradas en la inflamación e inhibición de la apoptosis, en las líneas celulares de cáncer de pulmón analizada. Es sabido que éstas proteínas se sobreexpresan en células de cáncer. Además, se observó la activación de las caspasas efectoras -3 y -7 en las líneas H1299 y H1437 después del tratamiento con cal14.1a. Por lo tanto, puede ser considerado como candidato para el tratamiento del cáncer de pulmón.

El péptido sintético de 14 aminoácidos, xm1b, esta basado en la secuencia de la conotoxina nativa de la especie Conus ximenes. Se caracterizó por primera vez en el trabajo de Bernaldéz, 2013. La secuencia de xm1b no se presenta por cuestiones de propiedad intelectual. Presenta gran similitud con la  $\alpha$ -ImI aislada de C. imperialis, motivo por el que se pudo asumir que xm1b pertenece a la familia de las  $\alpha$ -conotoxinas. Esta familia posee una subclasificación por el número de residuos que existen entre las cisteínas llamada α4/3 y se caracterizan por ser bloqueadores selectivos de los nAChRs (Azam & McIntosh, 2009; López-Vera, Jacobsen, Ellison, Olivera, & Teichert, 2007). Las  $\alpha$ -conotoxinas aisladas de *C. imperialis*,  $\alpha$ -ImI y  $\alpha$ -ImII, conservan 9 de 12 residuos, pero  $\alpha$ -ImII no compite con la  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgTx) por el sitio de unión de la subunidad  $\alpha$ 7 de nAChR, esto se debe a la ausencia de una Pro en la posición 6 de ImII y a la presencia de una Arg en dicha posición. La Pro6 en ImI se ha considerado como el aminoácido crucial para determinar la unión con el receptor α7 (Azam & McIntosh, 2009; M. Ellison, McIntosh, & Olivera, 2003). xm1b posee la subclasificación  $\alpha 4/3$  y el aminoácido Pro, lo que permitió aseverar que pertenece a la familia de las aconotoxinas. Además, se ha presentado evidencia que α-ImII inhibe el nAChR-α7 con la misma potencia que  $\alpha$ -ImI pero se une a un sitio completamente diferente en el receptor (Michael Ellison & Olivera, 2007).

Otra  $\alpha$ -conotoxina que presenta 8 residuos idénticos en su estructura primaria a  $\alpha$ -ImI es  $\alpha$ -RgIA proveniente de *Conus regius*, a pesar de solo diferir en los últimos

aminoácidos del C-terminal se demostró que ambas poseen diferencias en sus blancos moleculares,  $\alpha$ -ImI inhibe con menos potencia a  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 nAChRs que  $\alpha$ -RgIA que se caracteriza por ser un fuerte antagonista de éstos. Los aminoácidos Arg9, Tyr10 y Arg13 de  $\alpha$ -RgIA contribuyen significativamente a su afinidad para bloquear el  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 de los nAChRs (Azam & McIntosh, 2009; Michael Ellison, Haberlandt, Gomez-casati, Watkins, & Bele, 2006; Vincler et al., 2006). Información sobre la actividad de la estructura de  $\alpha$ -RgIA revela que se une en el sitio de la ACh en el receptor y los residuos Asp5, Pro6, Arg7 y Arg9 son importantes para interacción con α9α10 nAChR, en especial Arg9 que interactúa con los residuos cargados negativamente en el α9α10 nAChR. Se ha demostrado que también los residuos Asp5, Pro6 y Arg7 del primer bucle de  $\alpha$ -ImI, homóloga a  $\alpha$ -RgIA, así como el residuo Trp10 en el segundo bucle interactúan con la subunidad α7 de los nAChRs. Modelos utiliziando Aplysia AChBP, un homólogo estructural del sitio de unión N-terminal de los nAChRs, confirma que los residuos Arg7 y Trp10 tienen un rol esencial en la interacción con los residuos en el sitio de unión del ligando (Azam & McIntosh, 2009). El hecho de que el residuo Asp5 funcione como un protector en el N-terminal y Pro6 como un iniciador de hélice, sugiere que la contribución de ambos aminoácidos a la unión con el receptor se debe a los roles estructurales más que a la interacción directa con el AChR. Otros análisis de termodinámica han demostrado la existencia de una interacción de acoplamiento dominante entre el Asp7 a-ImI y el receptor a7 y múltiples interacción débiles entre Asp5 y Trp10 y dicho receptor (Arias & Blanton, 2000). La presencia de los residuos Asp5, Pro6 y Arg7 en el primer bucle de xm1b nos permite asumir una posible interacción similar a  $\alpha$ -ImI con el receptor  $\alpha$ 7 nAChR.

El péptido xm1b presenta un residuo adicional en el extremo N- y C- a diferencia de  $\alpha$ -ImI. El residuo en el N-terminal con carga negativa dada por el Asp ha sido reportado para tres  $\alpha$ -conotoxinas;  $\alpha$ -PIA,  $\alpha$ -ArIA y  $\alpha$ -GIA, para la última se ha demostrado que este residuo es importante para la afinidad hacia el receptor  $\alpha$ 7 (Dowell et al., 2003; Millard et al., 2009; Whiteaker et al., 2007). Otra diferencia, es la presencia de Asp5 con carga positiva (Ser4 en ImI) que se ubica en el bucle que incluye los residuos más importantes para la interacción con el receptor, sin embargo, se necesitarían estudios más profundos acerca de la estructura-actividad de xm1b para poder comprobar como funciona la unión al receptor con estas diferencias entre los residuos.

Para las α-conotoxinas se han reportado algunas modificaciones postraduccionales, donde destaca la amidación del carboxilo. Esta modificación favorece la estabilidad del péptido ante proteasas, el plegamiento y la actividad biológica (Kang, Vivekanandan, Jois, & Kini, 2005; R-, Kang, Radic, & Kini, 2007).

En este trabajo, xm1b disminuyó la expresión de los genes NFkB-1 y COX-2 en las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299, H1437 y H1975 (en la última sólo disminuyó la expresión de NFkB-1 después del tratamiento con xm1b). Ambos genes están involucrados en promover factores de inflamación y por ende inducir crecimiento de células tumorales y angiogénesis. Los tejidos inflamatorios regularmente son hipóxicos, la hipoxia estimula la angiogénesis por la virtud del factor-1 inducido por hipoxia (HIF-1) que a su vez regula la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Jackson, Zhou, & Kim, 2010). VEGF activa a las células endoteliales (ECs) (Pober & Sessa, 2007). Se ha descrito que las citosinas inflamatorias como IL-1β, pueden sobre regular a HIF-1α a través de la vía clásica de señalización inflamatoria que involucra NFkB-1 y COX-2, culminando en la sobrerregulación de VEGF, un factor angiogénico potente que se requiere para el crecimiento tumoral y la metástasis (Jung, Isaacs, Lee, Trepel, & Neckers, 2003). Por lo tanto, se ha presentado un incremento en antiangiogénicos, el interés para evaluar agentes inmunomoduladores y antiinflamatorios en el tratamiento de varias tumores malignos, incluyendo células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC) (Blumenschein, 2012). En base a los resultados obtenidos, el péptido xm1b puede ser considerado como agente para el tratamiento del cáncer de pulmón.

## 8.3 Efecto citotóxico de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón

Las α-conotoxinas son péptidos pequeños (12-20 aminoácidos) aislados del veneno de los caracoles Conus, y son conocidos por tener como blancos moleculares diferentes tipos de nAChRs (de músculo y neuronales). Están reportados entre las contoxinas más pequeñas, éstas se unen a un sitio en el nAChR y actúan como antagonistas competitivos (Lebbe et al., 2014). En este trabajo, se analizó el efecto de cal14.1a, cal14.1b y xm1b en la supervivencia celular de cuatro líneas de cáncer de pulmón, estos péptidos sintéticos se han caracterizado por tener como blancos moleculares a los nAChRs. En las células de cáncer de pulmón los nAChRs actúan como mediadores centrales de la activación de vías que promueven el crecimiento, progresión y metástasis de tumores. También es conocido que regulan una cadena de neurotransmisores que son estimuladores e inhibidores, que a su vez provocan la síntesis y liberación de factores de crecimiento, angiogénicos y neurogénicos en el microambiente de las células de cáncer y en órganos distantes (Ma et al., 2014; Schuller, 2009). Por estas razones, el uso de antagonistas para bloquear la cascada río abajo de los nAChRs, puede tener como resultado la muerte celular (M. R. Improgo et al., 2011).

Se ha reportado ampliamente, que las células de cáncer de pulmón expresan subunidades de los nAChRs y que la sobreexpresión de los mismos está directamente relacionada con la progresión y resistencia de esta enfermedad (Chernyavsky, Shchepotin, Galitovkiy, & Grando, 2015; Lam et al., 2007; Medjber et al., 2015; Reina Improgo et al., 2013; Tsurutani et al., 2005). El análisis de expresión de los genes de diferentes subunidades de nAChRs, indica que las cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón analizadas (H1299, H1437, H1975 y H661) expresan las subunidades  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 7 y  $\alpha$ 9 (Figura 28). Al tratar las células de cáncer de pulmón con cal14.1a, cal14.1b y xm1b, se descubrió que disminuyen la supervivencia hasta en un 40% (Figura 27), con esto, se puede especular que los tres péptidos sintéticos pudiesen actuar sobre los nAChRs expresados en las líneas celulares, bloqueando la cascada de señalización y

provocando así la muerte celular. La señalización de los nAChRs empieza con la unión de agonistas como, acetilcolina (ACh), nicotina o nitrosaminas de tabaco, causando un cambio conformacional que lleva a la apertura del canal y la entrada de iones de Na<sup>+</sup> y  $Ca^{2+}$ , y la salida de iones de K<sup>+</sup>. Provocando así, la despolarización de la membrana y la consecuente apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> regulados por voltaje, llevando a un flujo adicional de Ca<sup>2+</sup> hacia dentro de la célula. La entrada de Ca<sup>2+</sup> dispara la secreción de factores mitogénicos, activando la cascadas de señalización involucradas en angiogénesis, migración, inhibición de la apoptosis y proliferación celular (Cattaneo et al., 1993; Dasgupta et al., 2006; M. R. Improgo et al., 2011; Schuller, 2009). Está descrito que los nAChR-α7 actúan como canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de ligando, exhiben una alta permeabilidad a los iones de Ca<sup>2+</sup> y que las señales de Ca<sup>2+</sup> evocadas por el nAChR-α7 pueden ser inhibidas por antagonistas selectivos de los nAChR-α7, como α-conotoxinas (Arredondo et al., 2002; Zia, Ndoye, Lee, Webber, & Grando, 2000). La participación directa de los nAChR-α7 ha sido documentado en la fisiopatología del cáncer de pulmón (Davis et al., 2009). Al bloquear los nAChRs con antagonistas, como cal14.1a, cal14.1b y xm1b se podría prevenir la activación de la señalización río abajo, resultando en la inhibición de la proliferación, migración y angiogénesis. Un estudio enfocado en los antagonistas de los nAChRs como alternativas terapéuticas ha previsto ideas del posible mecanismo de acción (Schuller, 2009). Entre estos, las subunidad  $\alpha$ 7 es conocida por sobreexpresarse en cáncer de pulmón, experimentos in vitro han sugerido que el crecimiento maligno puede ser detenido utilizando α-conotoxinas (Ho et al., 2011). De manera alternativa, la gran especificidad que poseen las toxinas ha sido utilizada para propósitos de administración de fármacos en diferentes blancos moleculares. La α-conotoxina ImI fue utilizada como péptido blanco para dirigir eficientemente el agente quimioterapéutico paclitaxel hacia el nAChR-α7 en las células de cáncer de mama (Mei et al., 2015b). Se ha evidenciado que los nAChRs tienen un rol muy importante en la patogénesis del cáncer de pulmón relacionado con la nicotina (Grando, 2008). Sin embargo, la nicotina como tal, no se considera como carcinógeno, pero es el componente principal en el humo de cigarro y puede promover el crecimiento tumoral mediante la inducción de la proliferación, angiogénesis, migración e invasión (G. Warren & Singh, 2013).

Se ha descrito que, la nicotina promueve el crecimiento tumoral y la metástasis en un modelo murino de cáncer de pulmón (Davis et al., 2009). Las diferencias en la composición de las subunidades de los nAChRs, determinan las características funcionales y farmacológicas de los pentámeros formados en el receptor. Debido a esto, el efecto biológico producido por los agonistas de la nicotina depende del subtipo de nAChRs que se une a su ligando con una mayor afinidad (Chernyavsky et al., 2015). Mediante el silenciamiento de la expresión de subunidades y el tratamiento con antagonistas de los nAChRs se producen efectos antitumorales en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Catassi et al., 2008; Grozio et al., 2008; Lau et al., 2013; Paleari et al., 2009; Shih et al., 2010). Por estas razones, los nAChRs pueden ser considerados como blancos terapéuticos importantes y el desarrollo de nuevos antagonistas que los bloqueen específicamente son candidatos potenciales para generar nuevas terapias alternativas contra el cáncer.

Estudios previos demostraron que la exposición a la nicotina y sus derivados, que se unen a los nAChRs en las células bronquiales epiteliales, pueden regular la proliferación y apoptosis en NSCLC, activando la vía de Akt (Cardinale, Nastrucci, Cesario, & Russo, 2012; Nakada et al., 2012). En particular, se ha encontrado que nAChR-α5 esta estrechamente asociado con el riesgo de padecer cáncer de pulmón y con la dependencia a la nicotina. Se ha reportado que la nicotina interactúa con el nAChR-α5 en la superficie de las células de cáncer de pulmón A549, llevando a la activación de la señalización de las cinasas reguladas por vía extracelular (ERK1/2) o MAPK proteínas cinasas activadas por mitógenos) y PI3K/Akt, por medio de la sobreregulación de los niveles de VEGF y la señalización de HIF-1a. La activación de estas vías promueven la proliferación celular, invasión y angiogénesis (Ma et al., 2014). Se ha descrito, la estimulación de la invasión tumoral y de a transición epitelial a mesenquimal (EMT) en líneas celulares de cáncer de pulmón, especialmente en SCLC y NSCLC, tratadas con nicotina, por medio de la vía de nAChR-α7 y la proteína Src, así como, la vía de señalización dependiente de calcio (Dasgupta et al., 2009; M. R. D. Improgo et al., 2010). Se sabe que el nAChR- $\alpha$ 9 tiene un rol muy importante en el cáncer de mama (C. H. Lee et al., 2010; C.-H. Lee et al., 2011; Tu et al., 2011). Estudios demostraron que el nAChR- $\alpha$ 9 es clave para mediar la migración de las células de cáncer de mama inducida por nicotina, a través de la regulación de marcadores de EMT, la aplicación de un pre tratamiento con inhibidores de los nAChRs puede irrumpir estos efectos (Ho et al., 2011; Hung et al., 2011). La señalización río debajo de los nAChR-α9 en células tumorales de mama, activa las vías de las MAP cinasas (MAPK) y fosfatidil inositol-3/Akt (PI3K/Akt) (Wu et al., 2011). Medjber et al., 2015 reporto experimentos in vivo que demuestran la localización del nAChR heteromérico a5β2β4 y el nAChR-a7 en adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas de pulmón y NSCLC, y juegan un papel importante en la invasión de tumores. Experimentos in vitro confirmaron que el uso de inhibidores de nAChRs (mecamilamida y α-conotoxina MII) en cultivos primarios de NSCLC disminuyó la invasión en tumores. Además reportaron que, mediante la inhibición ya sea del nAChR heteropentamérico α5β2β4 o del nAChR-α7 se logró disminuir la invasión in vitro de las NSCLC de un 30-40%. La Nicotina y 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyrydyl)-1-butatione, un agonista específico de los nAChR- $\alpha$ 7, estimulan la invasión y migración de líneas celulares de cáncer de pulmón mediante la activación de las vías de ERK/Calpaínas y c-Src/PKCi/FAK (Shen et al., 2012; Xu & Deng, 2004).

En base en los estudios anteriores, se propone que posiblemente los péptidos sintéticos probados en este trabajo, cal14.1a, cal14.1b y xm1b, pueden inducir muerte celular actuando en los nAChRs expresados en las líneas de cáncer de pulmón H1299, H1437, H1975 y H661, y pueden ser considerados como un enfoque alternativo para el diseño de nuevos compuestos terapéuticos. Los péptidos sintéticos basados en las secuencias nativas de las conotoxinas de *C. californicus* y *C. ximenes*, también pueden ser utilizados como herramientas para caracterizar los nAChRs.

# 8.4 Genes relacionados en la apoptosis como reguladores de la muerte celular

En el presente trabajo se evaluó el rol de los tres péptidos (cal14.1a, cal14.1b y xm1b), en células de cáncer de pulmón. Se observó que los péptidos tienen un efecto citotóxico en las células y con el fin de elucidar el comportamiento de algunos genes involucrados en el proceso de apoptosis en las líneas H1299, H1437, H1974 y H661, se determinó la expresión de BAX, Bcl-2, NFκB y COX-2 y a su vez, la inducción de la activación de las caspasa-3 y -7.

Los niveles de expresión de los genes de proteínas involucradas en la regulación y ejecución de la apoptosis revelan un patrón interesante para BAX, Bcl-2, NFkB y COX-2 (Figura 29). En todas las líneas celulares se detectó una disminución de la expresión de BAX y un aumento en los niveles de ARNm de Bcl-2, a excepción de la línea H1299 que mostró un aumento considerable (15-veces) del gen BAX después del tratamiento con el péptido cal14.1a. Se ha reportado que en adenocarcinoma gástrico la expresión de BAX disminuye significativamente durante las primeras 24 horas de tratamiento con los fármacos comerciales etoposido, cisplatin y taxol, sin embargo, los niveles de expresión aumentan gradualmente en las siguientes 48 y 72 horas de tratamiento (Korbakis & Scorilas, 2012). Otro estudio demostró que el fármaco antineoplásico 5-Fluoruacilo disminuye los niveles de ARNm de Bcl-2 a las 48 horas de tratamiento, que coincide con un aumento en la expresión de BAX, después de 72 horas de tratamiento, los niveles de Bcl-2 aumentaron y los de BAX disminuyeron en adenocarcinoma gástrico humano (Korbakis & Scorilas, 2009). Es posible que, análisis con mayor tiempo de tratamiento y dosis dependientes para tratar las células de cáncer de pulmón con cal14.1a, cal14.1b y xm1b, sean necesarios para revelar un patrón de expresión diferente para Bcl-2 y BAX. O bien, los resultados presentados pueden ser resultado de un efecto citotóxico independiente de Bcl-2 y BAX.

La expresión de NFkB-1 en la línea H1299 aumentó considerablemente después del tratamiento con cal14.1a (Figura 29A), pero se observó una disminución en el tratamiento con cal14.1b y xm1b, así como en el C+. En las líneas celulares H1437 y H1975, la expresión de NFkB-1 disminuyó después del tratamiento con los péptidos cal14.1a y cal14.1b. Estos resultados indican que los péptidos cal14.1a y xm1b probablemente induzcan muerte celular por una vía dependiente de NFkB-1. Bajo ciertas condiciones, NFkB puede promover o amplificar la muerte celular. La mayoría de

estos efectos están relacionados con la vía extrínseca de apoptosis, que incluye la expresión de genes que codifican para el receptor de muerte Fas o su ligando FasL (Magné et al., 2006). Almeida et al., 2014, reportaron que células resistentes a cisplatin tienen activada la señalización de NFkB y mediante la inhibición de la translocación de NFκB al núcleo se promueve apoptosis en carcinoma escamoso de cabella y cuello. Elegir a NFkB como blanco molecular se puede considerar como un objetivo terapéutico potencial para tratar la quimioresistencia y radioresistencia en el tratamiento del cáncer (Li & Sethi, 2010). Las líneas H1299 y H661 también presentan una disminución de los niveles de ARNm del gen COX-2 (Figura 29A), además de presentar niveles bajos de expresión de NFkB-1. Altas concentraciones de COX-2 han sido asociadas con la progresión, supresión del sistema inmune, invasión y resistencia a la apoptosis en NSCLC. Los inhibidores de COX-2 poseen propiedades antiinflamatorias y antiangiogénics, y son capaces de inducir apoptosis y estimular la respuesta inmune. Por lo tanto, los inhibidores de COX-2 ofrecen una gran oportunidad para interferir con el desarrollo, progresión y metástasis de cáncer de pulmón (Han & Roman, 2006). Se ha reportado que el tratamiento con diclofenaco en células de cáncer de próstata inhibe la expresión de COX-2, que es inducida por la irradiación, provocando resistencia a los tratamientos. La terapia combinada de radiación con diclofenaco incrementa la expresión del ligando inductor de la apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral (TRAIL), induciendo apoptosis en las células (Inoue et al., 2013). El inhibidor de COX-2, celecoxib, bloquea la señalización río debajo de prostraglandin E2 (PGE2) suprimiendo la expresión de otros factores como NFkB, llevando a la inducción de la apoptosis en cáncer de pulmón (R. Liu, Xu, & Tan, 2015). Debido a esto, podemos inferir que cal14.1a y xm1b inducen apoptosis al inhibir la expresión de NFkB-1 y COX-2 en las líneas H1299 y H661, y pueden ser considerados como inhibidores potenciales de éstos genes.

Se sabe que las células de cáncer de pulmón expresan diferentes nAChRs y están involucrados en procesos como, proliferación, angiogénesis, invasión, migración, EMT, que son combinados con una reducción en la sensibilidad a la quimioterapia y/o radioterapia. La activación de los nAChRs por antagonistas (ej. Ach, nicotina, nitrosaminas), involucra numerosas vías de señalización como, PI3K/Akt/NFĸB,

βarrestina/Scr/Ras/Raf/MEK/ERK, VEGF/HIF-1α, entre otras (M. R. Improgo et al., 2011; Ma et al., 2014; G. Warren & Singh, 2013; Wu et al., 2011). Debido a los resultados obtenidos con los péptidos sintéticos cal14.1a, cal14.1b y xm1b, se plantea la hipótesis de que éstos pudiesen actuar como antagonistas de los nAChRs expresados en las líneas de cáncer de pulmón H1299, H1437, H1975 y H661. Bloqueando las cascadas de señalización mencionadas anteriormente y por consecuente inhibiendo la supervivencia y promoviendo la apoptosis, inhibiendo la proliferación, migración e invasión y, la angiogénesis de las células de cáncer de pulmón (Figura 34).



Figura 34. Posible mecanismo de acción de cal14.1a, cal14.1b y xm1b las líneas de cáncer de pulmón H1299, H1437, H1975 y H661. Los péptidos sintéticos actúan como antagonistas en los nAChRs expresados en las líneas de cáncer de pulmón. Bloqueando la cascada de señalización río abajo inhibiendo la supervivencia y promoviendo la apoptosis, inhibiendo la proliferación, migración e invasión y, la angiogénesis (Modificado de M. R. Improgo et al., 2011).

# 8.5 Activación de las caspasa-3 y 7 por acción de los péptidos cal14.1a, cal14.1b y xm1b

En el presente trabajo, se analizó la activación de las caspasa-3 y -7 inducida por cal14.1a, cal14.1b y xm1b. La línea H1299 tratada muestra una activación de caspasa-3 y -7 del 41 y 48% en el tratamiento con los péptidos cal14.1a y xm1b, respectivamente, a las 12 horas de incubación (Figura 30), mientras que, el tratamiento con estaurosporina (C+) mostró solamente un 20% de células positivas. En las células de H1437 el péptido cal14.1a mostró un 20% de células positivas a caspasa-3 y -7 a las 3 y 24 horas de tratamiento (Figura 31). En el tratamiento con xm1b se observó una activación del 20% a las 24 horas, solamente. Estos resultados indican que la máxima activación de caspasa-3 y -7 es alcanzada entre las 6 y 12 horas de tratamiento. Es sabido que la vía básica mitocondrial de apoptosis, desde la activación inicial hasta la destrucción de la célula, puede tomar horas incluso días. Aún así, los eventos que llevan a la activación de las caspasas generalmente toman alrededor de 10 minutos, esto puede ocurrir en cualquier momento seguido de la inducción de apoptosis por una señal de muerte (Green, 2005). A pesar de esto, el 50% de células HL60 se smetieron a apoptosis durante las primeras 6 horas de tratamiento con factor de necrosis tumoral-a y ciclohexamide (TNF- $\alpha$ /CHX), y en células HUVECs el mismo tratamiento indujo la activación de apoptosis hasta las 18 horas (Wolbers et al., 2004). La caspasa-3 es el mayor ejecutor de la apoptosis y puede ser activado a través de ambas vías, intrínseca o extrínseca (Ghavami et al., 2009). Se ha mostrado evidencia, que la perdida en la función de caspasa-3 puede provocar resistencia a la apoptosis en células de cáncer de mama. Este descubrimiento puede tener implicaciones clínicas importantes, ya que se puede utilizar no solo como marcador de las enfermedades, sino también como blanco terapéutico para diferentes tipos de cáncer (Devarajan et al., 2002). Con esto podemos explicar la falta de actividad de caspasa-3 y -7 en las células de cáncer de pulmón sin tratamiento (C-), en todas las líneas celulares analizadas el C- mostró menos del 20% de células positivas (Figura 30-33). Se logró demostrar que la actividad de caspasas fue incrementada en el lapso después de tratar a las células con los péptidos. Por estas razones, cal14.1a y xm1b, pueden ser considerados como activadores potenciales en

células de cáncer de pulmón. Se ha visto que la caspasa-3 interfiere con la activación de NF $\kappa$ B, en este caso, la caspasa-3 escinde a I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidores  $\alpha$  del factor  $\kappa$ B) generando una ruptura y la formación de fragmentos que actúan potencialmente como inhibidores constitutivos de NFkB. Se ha reportado también, que la proteólisis realizada por las caspasas inactivan a las proteínas de NFkB y las transforman en factores negativos dominantes, que son capaces todavía de unirse al ADN pero evitando su transactivación (Magné et al., 2006). Estas inferencias pueden explicar los niveles de expresión reducidos de NFκB-1 y la consecuente activación de las capasa-3 y -7 en las líneas celulares H1299 y H1437 después del tratamiento con los péptidos cal14.1a y xm1b. La inhibición de NFkB induce apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón deficientes en el supresor de tumores p53 (Staal, Bekaert, & Beyaert, 2011). La línea H1299 carece de la expresión de p53 y presenta una inhibición de NFkB-1 después del tratamiento con el péptido cal14.1b y xm1b. Con estos resultados podemos ultimar que los péptidos cal14.1a y xm1b inducen apoptosis por medio de la vía que involucra la inhibición de NFkB-1 y la activación de las caspasa-3 y -7. Sin embargo, análisis adicionales son necesarios para explicar a gran detalle el mecanismo de acción de estos péptidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la purificación del veneno total. Se encontraron componentes dentro del veneno de las especies *Conus ximenes* y *Conus californicus*, con actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de pulmón. Estos componentes pueden ser considerados como componentes potenciales para el tratamiento del cáncer y futura caracterización

Los péptidos sintéticos cal14.1a, cal14.1b y xm1b presentaron capacidad para disminuir la supervivencia celular de cuatro líneas de cáncer de pulmón de manera significativa. Al presentar características similares a las α-contoxinas y el hecho que las células de pulmón expresen diferentes subunidades de los nAChRs, se puede asumir que actúan como antagonistas de estos receptores, provocando muerte celular.

En base al patrón de expresión de los genes involucrados en la modulación de la apoptosis. Es probable que los péptidos cal14.1a y xm1b induzcan apoptosis por una vía dependiente de NFκB-1 en las líneas celulares H1299, H1437 y H1975.

El tratamiento de líneas celulares H1299 y H1437 con cal14.1a y xm1b inducen la activa las caspasas efectoras -3 y -7. Debido a esto, se puede concluir que ambos péptidos inducen muerte celular por apoptosis en las células de cáncer de pulmón.

### Lista de referencias bibliográficas

- Aggarwal, B. B., & Gehlot, P. (2009). Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients?. *Current Opinion in Pharmacology*, *9*(4), 351–369. doi:10.1016/j.coph.2009.06.020
- Aguilar, M. B., López-Vera, E., de la Cotera, E. P. H., Falcón, A., Olivera, B. M., & Maillo, M. (2007). I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: Peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides*, 28(1), 18–23. doi:10.1016/j.peptides.2006.08.024
- Aguilar, M. B., López-Vera, E., Imperial, J. S., Falcón, A., Olivera, B. M., & De La Cotera, E. P. H. (2005). Putative γ-conotoxins in vermivorous cone snails: The case of *Conus delessertii. Peptides*, *26*(1), 23–27. doi:10.1016/j.peptides.2004.10.012
- Aguilar, M. B., Lezama-Monfil, L., Maillo, M., Pedraza-Lara, H., López-Vera, E., & Heimer De La Cotera, E. P. (2006). A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides*, 27(3), 500–505. doi:10.1016/j.peptides.2005.07.020
- Aguilar, M. B., Ortiz, E., Kaas, Q., López-Vera, E., Becerril, B., Possani, L. D., & De La Cotera, E. P. H. (2013). Precursor De13.1 from *Conus delessertii* defines the novel G gene superfamily. *Peptides*, *41*, 17–20. doi:10.1016/j.peptides.2013.01.009
- Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J. B., De Smedt, H., & Bultynck, G. (2014). A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research*, 1843(10), 2240–2252. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.017
- Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J., & Alewood, P. F. (2014). Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chemical Reviews*, *114*(11), 5815–5847. doi:10.1021/cr400401e
- Almeida, L. O., Abrahao, A. C., Rosselli-Murai, L. K., Giudice, F. S., Zagni, C., Leopoldino, A. M., Castilho, R. M. (2014). NFκB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio*, *4*, 96–104. doi:10.1016/j.fob.2013.12.003

Arias, H. R., & Blanton, M. P. (2000). α-Conotoxins. *IJBCB*, 32, 1017–1028.

- Arredondo, J., Nguyen, V. T., Chernyavsky, A. I., Bercovich, D., Orr-Urtreger, A., Kummer, W., Grando, S. A. (2002). Central role of α7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *Journal of Cell Biology*, 159(2), 325–336. doi:10.1083/jcb.200206096
- Azam, L., & McIntosh, J. M. (2009). Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(6), 771–783. doi:10.1038/aps.2009.47

- Barajas Farias, L. M., Bermúdez, D., Díaz, L., & Larrea, F. (2004). Ether a go-go Potassium Channels as Human Cervical Cancer Markers. *Cancer Research*, *64*(19), 6996–7001. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1204
- Becker, S., & 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
- Bernaldez, J., López, O., Licea, A., Salceda, E., Arellano, R. O., Vega, R., & Soto, E. (2011). Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of Conus californicus that targets voltage-gated neuronal Ca<sup>2+</sup> channels. *Toxicon*, 57(1), 60–67. doi:10.1016/j.toxicon.2010.09.015
- Bernaldez, J., Román-Gonźalez, S. A., Martińez, O., Jimeńez, S., Vivas, O., Arenas, I., Licea, A. (2013). A Conus regularis conotoxin with a novel eight-cysteine framework inhibits CaV2.2 channels and displays an anti-nociceptive activity. *Marine Drugs*, *11*(4), 1188–1202. doi:10.3390/md11041188
- Bernáldez, J. S. (2013). Aislamiento y Caracterización de toxinas caracoles marinos del género Conus con actividad en Mycobacterium tuberculosis. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 128 p.
- Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J. P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Olivera, B. M. (2010). Evolution of Conus peptide toxins: Analysis of Conus californicus Reeve, 1844. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 1–12. doi:10.1016/j.ympev.2010.03.029
- Blumenschein, G. R. (2012). Developmental antiangiogenic agents for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Investigational New Drugs*, *30*(4), 1802–11. doi:10.1007/s10637-011-9750-1
- Buczek, O., Bulaj, G., & Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(24), 3067–3079. doi:10.1007/s00018-005-5283-0
- Cardinale, A., Nastrucci, C., Cesario, A., & Russo, P. (2012). Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Critical Reviews in Toxicology*, *42*(1), 68–89. doi:10.3109/10408444.2011.623150
- Catassi, A., Paleari, L., Servent, D., Sessa, F., Dominioni, L., Ognio, E., Russo, P. (2008). Targeting α7-nicotinic receptor for the treatment of pleural mesothelioma. *European Journal of Cancer*, *44*(15), 2296–2311. doi:10.1016/j.ejca.2008.06.045
- Cattaneo, M. G., Codignola, a, Vicentini, L. M., Clementi, F., & Sher, E. (1993). Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Research*, *53*(22), 5566–8. doi:10.1016/0169-5002(94)90314-X

Cervantes, K. E. (2013). Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género *Conus.* Universidad Autónoma de Baja California. 67p.

- Chai, S., Qian, Y., Tang, J., Liang, Z., Zhang, M., Si, J., Wang, K. (2014). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IIγ, a critical mediator of the NF-κB network, is a novel therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 344(1), 119–128. doi:10.1016/j.canlet.2013.10.022
- Chen, P., Garrett, J. E., Watkins, M., & Olivera, B. M. (2008). Purification and characterization of a novel excitatory peptide from Conus distans venom that defines a novel gene superfamily of conotoxins. *Toxicon*, *52*(1), 139–145. doi:10.1016/j.toxicon.2008.05.014
- Chernyavsky, A. I., Shchepotin, I. B., Galitovkiy, V., & Grando, S. A. (2015). Mechanisms of tumor-promoting activities of nicotine in lung cancer: synergistic effects of cell membrane and mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors. *BMC Cancer*, 1–12. doi:10.1186/s12885-015-1158-4
- Chonghaile, T. N., & Letai, a. (2008). Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. Oncogene, 27 Suppl 1(S1), S149–S157. doi:10.1038/onc.2009.52
- Dasgupta, P., Rastogi, S., Pillai, S., Ordonez-ercan, D., Morris, M., Haura, E., & Chellappan, S. (2006). Nicotine induces cell proliferation by β-arrestin–mediated activation of Src and Rb Raf-1 pathways. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(8), 2208–2217. doi:10.1172/JCI28164.2208
- Dasgupta, P., Rizwani, W., Pillai, S., Kinkade, R., Kovacs, M., Rastogi, S., ... Chellappan, S. (2009). Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelialmesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *International Journal* of Cancer, 124(1), 36–45. doi:10.1002/ijc.23894
- Davis, R., Rizwani, W., Banerjee, S., Kovacs, M., Haura, E., Coppola, D., & Chellappan, S. (2009). Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer. *PLoS ONE*, 4(10), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0007524
- Devarajan, E., Sahin, A. a, Chen, J. S., Krishnamurthy, R. R., Aggarwal, N., Brun, A.-M., Mehta, K. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, 21(57), 8843–8851. doi:10.1038/sj.onc.1206044
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO Journal*, 17(8), 2215– 2223. doi:10.1093/emboj/17.8.2215
- Ding, X., Yan, J., An, P., Lü, P., & Luo, H. (2007). Aberrant expression of ether à go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines. *World J Gastroenterol*, *13*(8), 1257–1261.

- Dowell, C., Olivera, B. M., Garrett, J. E., Staheli, S. T., Watkins, M., Kuryatov, A., McIntosh, J. M. (2003). Alpha-conotoxin PIA is selective for alpha6 subunitcontaining nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(24), 8445–52. doi:23/24/8445 [pii]
- Dutertre, S., Biass, D., Stöcklin, R., & Favreau, P. (2010). Dramatic intraspecimen variations within the injected venom of Conus consors: An unsuspected contribution to venom diversity. *Toxicon*, *55*(8), 1453–1462. doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.025
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 383–424.
- Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-casati, E., Watkins, M., & Bele, A. (2006). α-RgIA : A Novel Conotoxin That Specifically and Potently Blocks the α9α10. *Biochemistry*, 1511–1517.
- Ellison, M., McIntosh, J. M., & Olivera, B. M. (2003). α-Conotoxins ImI and ImII: Similar α7 nicotinic receptor antagonists act at different sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 757–764. doi:10.1074/jbc.M204565200
- Ellison, M., & Olivera, B. M. (2007). α4/3 Conotoxins: phylogenetic distribution, functional properties, and structure–function insights. *The Chemical Record*, *7*(6), 341–353. doi:10.1002/tcr.20131
- Favreau, P., & Stöcklin, R. (2009). Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 594–601. doi:10.1016/j.coph.2009.05.006
- Fiske, J. L., Fomin, V. P., Brown, M. L., Duncan, R. L., & Sikes, R. A. (2006). Voltagesensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 493–500. doi:10.1007/s10555-006-9017-z
- Franklin, J. B., & Rajesh, R. P. (2015). A sleep-inducing peptide from the venom of the Indian cone snail Conus araneosus. *Toxicon*, *103*, 39–47. doi:10.1016/j.toxicon.2015.06.017
- Fraser, S. P., Diss, J. K. J., Chioni, A., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Djamgoz, M. B. A. (2005). Human Cancer Biology Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis. *Clin Cancer Res*, *c*(7), 5381–5389.
- Garg, R., Blando, J., Perez, C. J., Wang, H., Benavides, F. J., & Kazanietz, M. G. (2012). Activation of Nuclear Factor B (NF-B) in Prostate Cancer Is Mediated by Protein Kinase C (PKC). *Journal of Biological Chemistry*, 287(44), 37570–37582. doi:10.1074/jbc.M112.398925

- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S. R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Los, M. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics*, 46(8), 497–510. doi:10.1136/jmg.2009.066944
- Grando, S. a. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106(2), 174–179. doi:10.1254/jphs.FM0070087
- Green, D. R. (2005). Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell*, *121*(5), 671–674. doi:10.1016/j.cell.2005.05.019
- Grozio, A., Paleari, L., Catassi, A., Servent, D., Cilli, M., Piccardi, F., Russo, P. (2008). Natural agents targeting the α7-nicotinic-receptor in NSCLC: A promising prospective in anti-cancer drug development. *International Journal of Cancer*, 122(8), 1911–1915. doi:10.1002/ijc.23298
- Gruber, A. D., & Pauli, B. U. (1999). Tumorigenicity of Human Breast Cancer Is Associated with Loss of the Ca<sup>2+</sup>- activated Chloride Channel CLCA2<sup>1</sup>. C, 5488– 5491.
- Guo, L., Li, L., Wang, W., Pan, Z., Zhou, Q., & Wu, Z. (2012). Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1α expression in human non-small cell lung cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(6), 852–61. doi:10.1016/j.bbadis.2012.02.004
- Gupta, S., Kass, G. E. N., Szegezdi, E., & Joseph, B. (2009). The mitochondrial death pathway: A promising therapeutic target in diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(6), 1004–1033. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00697.x
- Han, S., & Roman, J. (2006). COX-2 inhibitors suppress lung cancer cell growth by inducing p21 via COX-2 independent signals. *Lung Cancer*, *51*(3), 283–296. doi:10.1016/j.lungcan.2005.10.015
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Haque, A., Rahman, M. a., Fuchs, J. R., Chen, Z. G., Khuri, F. R., Shin, D. M., & Amin, a. R. M. R. (2015). FLLL12 induces apoptosis in lung cancer cells through a p53/p73-independent but death receptor 5-dependent pathway. *Cancer Letters*, 363(2), 166–175. doi:10.1016/j.canlet.2015.04.017
- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Queiroz, F. M. De, Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer*, *13*, 1–13. doi:10.1186/1476-4598-5-41
- Hille, B. (2001). Ion Channel Excitable Membranes. Sunderland Massachusetts USA. doi:10.1007/3-540-29623-9\_5640

- Ho, Y. S., Lee, C. H., & Wu, C. H. (2011). The alpha 9-nicotinic acetylcholine receptor serves as a molecular target for breast cancer therapy. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, *3*(6), 246–251. doi:10.1016/j.jecm.2011.10.007
- Hung, C.-S., Peng, Y.-J., Wei, P.-L., Lee, C.-H., Su, H.-Y., Ho, Y.-S., Chang, Y.-J. (2011). The alpha9 Nicotinic Acetylcholine Receptor is the Key Mediator in Nicotineenhanced Cancer Metastasis in Breast Cancer Cells. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 3(6), 283–292. doi:10.1016/j.jecm.2011.10.008
- Improgo, M. R. D., Scofield, M. D., Tapper, A. R., & Gardner, P. D. (2010). The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: dual role in nicotine addiction and lung cancer. *Progress in Neurobiology*, 92(2), 212–226. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.05.003
- Improgo, M. R., Tapper, A. R., & Gardner, P. D. (2011). Nicotinic acetylcholine receptormediated mechanisms in lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 1015– 1021. doi:10.1016/j.bcp.2011.05.020
- Inoue, T., Anai, S., Onishi, S., Miyake, M., Tanaka, N., Hirayama, A., Hirao, Y. (2013). Inhibition of COX-2 expression by topical diclofenac enhanced radiation sensitivity via enhancement of TRAIL in human prostate adenocarcinoma xenograft model. *BMC Urology*, *13*, 1. doi:10.1186/1471-2490-13-1
- Jackson, A. L., Zhou, B., & Kim, W. Y. (2010). HIF, hypoxia and the role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*, *14*(10), 1047–1057. doi:10.1517/14728222.2010.511617.HIF
- Jung, Y.-J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., & Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *The FASEB Journal*, *17*(14), 2115–7. doi:10.1096/fj.03-0329fje
- Kaas, Q., Westermann, J. C., & Craik, D. J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon*, *55*(8), 1491–1509. doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.002
- Kaas, Q., Yu, R., Jin, A. H., Dutertre, S., & Craik, D. J. (2012). ConoServer: Updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), 325–330. doi:10.1093/nar/gkr886
- Kale, V. P., Amin, S. G., & Pandey, M. K. (2015). Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*, 1848(10), 2747–2755. doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.034
- Kang, T. S., Vivekanandan, S., Jois, S. D. S., & Kini, R. M. (2005). Effect of C-terminal amidation on folding and disulfide-pairing of alpha-conotoxin ImI. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 44(39), 6333–7. doi:10.1002/anie.200502300

- Khan, K. H., Blanco-Codesido, M., & Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *90*(3), 200–219. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.12.012
- Korbakis, D., & Scorilas, A. (2009). Treatment of gastric cancer cells with 5fluorouracil/leucovorin and irinotecan induces distinct alterations in the mRNA expression of the apoptosis-related genes, including the novel gene BCL2L12. *Tumor Biology*, 30(2), 100–107. doi:10.1159/000218160
- Korbakis, D., & Scorilas, A. (2012). Quantitative expression analysis of the apoptosisrelated genes BCL2, BAX and BCL2L12 in gastric adenocarcinoma cells following treatment with the anticancer drugs cisplatin, etoposide and taxol. *Tumor Biology*, 33(3), 865–875. doi:10.1007/s13277-011-0313-z
- Kroemer, G. (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *304*(3), 433–5. doi:10.1016/S0006-291X(03)00614-4
- Lam, D. C.-L., Girard, L., Ramirez, R., Chau, W.-S., Suen, W., Sheridan, S., Minna, J. D. (2007). Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-smallcell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers. *Cancer Research*, 67(10), 4638–4647. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4628
- Lang, F., Föller, M., Lang, K. S., Lang, P. A., Ritter, M., Gulbins, E., Huber, S. M. (2005). Ion Channels in Cell Proliferation and Apoptotic Cell Death. *Journal of Membrane Biology*, 205(3), 147–157. doi:10.1007/s00232-005-0780-5
- Lau, J. K., Brown, K. C., Thornhill, B. A., Crabtree, C. M., Dom, A. M., Witte, T. R., Dasgupta, P. (2013). Inhibition of cholinergic signaling causes apoptosis in human bronchioalveolar carcinoma. *Cancer Research*, 73(4), 1328–1339. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3190
- Lebbe, E. K. M., Peigneur, S., Maiti, M., Mille, B. G., Devi, P., Ravichandran, S., Tytgat, J. (2014). Discovery of a new subclass of α-conotoxins in the venom of Conus australis. *Toxicon*, *91*, 145–154. doi:10.1016/j.toxicon.2014.08.074
- Lee, C. H., Huang, C. S., Chen, C. S., Tu, S. H., Wang, Y. J., Chang, Y. J., Ho, Y. S. (2010). Overexpression and activation of the ??9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(17), 1322–1335. doi:10.1093/jnci/djq300
- Lee, C.-H., Chang, Y.-C., Chen, C.-S., Tu, S.-H., Wang, Y.-J., Chen, L.-C., Ho, Y.-S. (2011). Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces α9-nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, *129*(2), 331–45. doi:10.1007/s10549-010-1209-0

- Lewis, R. J. (2009). Marine Toxins as Research Tools, *46*. doi:10.1007/978-3-540-87895-7
- Li, F., & Sethi, G. (2010). Targeting transcription factor NF-κB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer*, *1805*(2), 167–180. doi:10.1016/j.bbcan.2010.01.002
- Liu, R., Xu, K. P., & Tan, G. S. (2015). Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed. *European Journal of Pharmacology*, 769, 127–133. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.007
- Liu, W., Lu, M., Liu, B., Huang, Y., & Wang, K. (2012). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-activated Clchannel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma. *Cancer Letters*, 326(1), 41–51. doi:10.1016/j.canlet.2012.07.015
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, A. C., Krieger, M., Scott, P. M., Bretscher, A., Ploegh, H. y Matsudaira, P. 2008. Molecular Cell Biology. 6th Edition. W. H. Freeman and Company. 11: 427-439; 25: 1107-1143
- López-Vera, E., Aguilar, M. B., Schiavon, E., Marinzi, C., Ortiz, E., Restano Cassulini, R., Wanke, E. (2007). Novel α-conotoxins from Conus spurius and the α-conotoxin EI share high-affinity potentiation and low-affinity inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Journal*, *274*(15), 3972–3985. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05931.x
- López-Vera, E., Jacobsen, R. B., Ellison, M., Olivera, B. M., & Teichert, R. W. (2007). A novel alpha conotoxin (alpha-PIB) isolated from C. purpurascens is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(8), 1193–9. doi:10.1016/j.toxicon.2007.02.007
- Ma, X., Jia, Y., Zu, S., Li, R., Jia, Y., Zhao, Y., Wang, Y. (2014). Alpha5 nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced HIF-1α and VEGF expression in non-small cell lung cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(2), 172– 179. doi:10.1016/j.taap.2014.04.023
- Maeng, H. J., Lee, W. J., Jin, Q. R., Chang, J. E., & Shim, W. S. (2014). Upregulation of COX-2 in the lung cancer promotes overexpression of multidrug resistance protein 4 (MRP4) via PGE2-dependent pathway. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 189–196. doi:10.1016/j.ejps.2014.05.023
- Magné, N., Toillon, R. A., Bottero, V., Didelot, C., Houtte, P. Van, Gérard, J. P., & Peyron, J. F. (2006). NF-κB modulation and ionizing radiation: Mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Letters*, 231(2), 158–168. doi:10.1016/j.canlet.2005.01.022
- Malich, G., Markovic, B., & Winder, C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, *124*, 179–192. doi:10.1016/S0300-483X(97)00151-0

- Marshall, J., Kelley, W. P., Rubakhin, S. S., Bingham, J. P., Sweedler, J. V., & Gilly, W. F. (2002). Anatomical correlates of venom production in Conus californicus. *Biological Bulletin*, 203(1), 27–41.
- Medjber, K., Lamine, M., Grelet, S., Lorenzato, M., Maouche, K., Nawrocki-raby, B., Tournier, J. (2015). Lung Cancer Role of nicotinic acetylcholine receptors in cell proliferation and tumour invasion in broncho-pulmonary carcinomas. *Lung Cancer*, 87(3), 258–264. doi:10.1016/j.lungcan.2015.01.001
- Mei, D., Lin, Z., Fu, J., He, B., Gao, W., Ma, L., Zhang, Q. (2015a). Biomaterials The use of α-conotoxin ImI to actualize the targeted delivery of paclitaxel micelles to a 7 nAChR-overexpressing breast cancer. *Biomaterials*, 42, 52–65. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.11.044
- Mei, D., Lin, Z., Fu, J., He, B., Gao, W., Ma, L., Zhang, Q. (2015b). The use of αconotoxin ImI to actualize the targeted delivery of paclitaxel micelles to α7 nAChRoverexpressing breast cancer. *Biomaterials*, 42, 52–65. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.11.044
- Mello de Queiroz, F., Suarez-Kurtz, G., Stühmer, W., & Pardo, L. a. (2006). Ether à gogo potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Molecular Cancer*, *5*, 42. doi:10.1186/1476-4598-5-42
- Millard, E. L., Nevin, S. T., Loughnan, M. L., Nicke, A., Clark, R. J., Alewood, P. F., Daly, N. L. (2009). Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes by alpha-Conotoxin GID and analogues. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 4944–51. doi:10.1074/jbc.M804950200
- Monteiro, A. (2006). The cone collector. The Cone Collector, 1–36.
- Nakada, T., Kiyotani, K., Iwano, S., Uno, T., Yokohira, M., Yamakawa, K., Kamataki, T. (2012). Lung tumorigenesis promoted by anti-apoptotic effects of cotinine, a nicotine metabolite through activation of PI3K/Akt pathway. *The Journal of Toxicological Sciences*, 37(3), 555–563. doi:10.2131/jts.37.555
- Nilius, B., Prenen, J., Vennekens, R., Hoenderop, J. G. J., & Droogmans, G. (2001). Pharmacological modulation of monovalent cation currents through the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel ECaC1. *British Journal of Farmacology*, *2*, 453–462.
- Norton, R. S., & Olivera, B. M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon*, 48(7), 780–798. doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.022
- Oliver, L., & Vallette, F. M. (2005). The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resistance Updates*, 8(3), 163–170. doi:10.1016/j.drup.2005.05.001
- Olivera, B. M. (1999). Conus venom peptides: Correlating chemistry and behavior. Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 185(4), 353–359. doi:10.1007/s003590050394

- 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., & Teichert, R. W. (2007). Diversity of the Neurotoxic Conus Peptides: A Model for Concerted Pharmacological Discovery. *Mol. Interv.*, 7(5), 251–260. doi:10.1124/mi.7.5.7
- Onkal, R., & Djamgoz, M. B. A. (2009). Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. *European Journal of Pharmacology*, 625(1-3), 206–219. doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.040
- Oser, M. G., Niederst, M. J., Sequist, L. V., & Engelman, J. A. (2015). Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: Molecular drivers and cells of origin. *The Lancet Oncology*, *16*(4), e165–e172. doi:10.1016/S1470-2045(14)71180-5
- Ouadid-ahidouch, H., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Ahidouch, A., Joury, N., Prevarskaya, N., Del-, P. (2004). Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression, 125–134.
- Ousingsawat, J., Spitzner, M., Puntheeranurak, S., Ousingsawat, J., Spitzner, M., Puntheeranurak, S., Schreiber, R. (2007). Expression of Voltage-Gated Potassium Channels in Human and Mouse Colonic Carcinoma Expression of Voltage-Gated Potassium Channels in Human and Mouse Colonic Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 824–831. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1940
- Ozören, N., & El-Deiry, W. S. (2003). Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*, *13*, 135–147. doi:10.1016/S1044-579X(02)00131-1
- Paleari, L., Sessa, F., Catassi, A., Servent, D., Mourier, G., Doria-Miglietta, G., Russo, P. (2009). Inhibition of non-neuronal α7-nicotinic receptor reduces tumorigenicity in A549 NSCLC xenografts. *International Journal of Cancer*, 125(1), 199–211. doi:10.1002/ijc.24299
- Pardo, L. A., Camino, D., Alves, F., & Stu, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels. *The EMBO Journal*, *18*(20), 5540–5547.
- Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2008). Eag1: An emerging oncological target. *Cancer Research*, *68*(6), 1611–1613. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5710
- Paul-Samojedny, M., Kokocińska, D., Samojedny, A., Mazurek, U., Partyka, R., Lorenz, Z., & Wilczok, T. (2005). Expression of cell survival/death genes: Bcl-2 and Bax at the rate of colon cancer prognosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis* of Disease, 1741(1-2), 25–29. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.021

- Pellecchia, M., & Reed, J. C. (2004). Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by natural polyphenols: new avenues for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 10(12), 1387–1398. doi:10.2174/1381612043384880
- Peng, C., Tang, S., Pi, C., Liu, J., Wang, F., Wang, L., Xu, A. (2006). Discovery of a novel class of conotoxin from Conus litteratus, lt14a, with a unique cysteine pattern. *Peptides*, 27(9), 2174–81. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.016
- Peng, C., Ye, M., Wang, Y., Shao, X., Yuan, D., Liu, J., Chi, C. (2010). A new subfamily of conotoxins belonging to the A-superfamily. *Peptides*, *31*(11), 2009–16. doi:10.1016/j.peptides.2010.07.011
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 803–815. doi:10.1038/nri2171
- Pore, Milind M. Jeroen N. Hiltermann, F. A. E. K. (2013). Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Letters*, 332, 359–368. doi:10.1016/j.canlet.2010.12.012
- Prashanth, J. R., Lewis, R. J., & Dutertre, S. (2012). Towards an integrated venomics approach for accelerated conopeptide discovery. *Toxicon*, *60*(4), 470–477. doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.340
- Kang, T. S., Radic, Z., & Kini, R. M. (2007). Protein Folding Determinants: Structural Features Determining Alternative. *Biochemistry*, 46(2), 3338–3355. doi:10.1021/bi0619690
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, *157*(5), 1415–30. doi:10.1016/S0002-9440(10)64779-7
- Reina Improgo, M., Soll, L. G., Tapper, A. R., & Gardner, P. D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. *Frontiers in Physiology*, 4 *SEP*(September), 1–6. doi:10.3389/fphys.2013.00251
- Schuller, H. M. (2009). Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors?. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(3), 195–205. doi:10.1038/nrc2590
- Shen, J., Xu, L., Owonikoko, T. K., Sun, S. Y., Khuri, F. R., Curran, W. J., & Deng, X. (2012). NNK promotes migration and invasion of lung cancer cells through activation of c-Src/PKCI/FAK loop. *Cancer Letters*, 318(1), 106–113. doi:10.1016/j.canlet.2011.12.008
- Shih, Y. L., Liu, H. C., Chen, C. S., Hsu, C. H., Pan, M. H., Chang, H. W., Ho, Y. S. (2010). Combination treatment with luteolin and quercetin enhances antiproliferative effects in nicotine-treated MDA-MB-231 cells by down-regulating nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 235– 241. doi:10.1021/jf9031684

- Shioiri, T., Muroi, M., Hatao, F., Nishida, M., Ogawa, T., Mimura, Y., Tanamoto, K.-I. (2009). Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(10), 1011–1018. doi:10.1016/j.bbadis.2009.06.006
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P. M., & Gazdar, A. F. (2003). Apoptosis and lung cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry*, *88*(5), 885–898. doi:10.1002/jcb.10440
- Skrzypski, M. (2008). Quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in translational oncology: lung cancer perspective. Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands), 59(2), 147–54. doi:10.1016/j.lungcan.2007.11.008
- Staal, J., Bekaert, T., & Beyaert, R. (2011). Regulation of NF-κB signaling by caspases and MALT1 paracaspase. *Cell Research*, *21*(1), 40–54. doi:10.1038/cr.2010.168
- Stühmer, W., Alves, F., Hartung, F., Zientkowska, M., & Pardo, L. A. (2006). Potassium channels as tumour markers. *FEBS Letters*, *580*(12), 2850–2852. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.062
- Terlau, H., & Olivera, B. M. (2004). Conus venoms: a rich source of novel ion channeltargeted peptides. *Physiological Reviews*, *84*(1), 41–68. doi:10.3109/15569548509014416
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*, *16*(2), 139–144. doi:10.1016/j.cellsig.2003.08.007
- Tsurutani, J., Castillo, S. S., Brognard, J., Granville, C. a., Zhang, C., Gills, J. J., Dennis, P. a. (2005). Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFκBdependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis*, *26*(7), 1182–1195. doi:10.1093/carcin/bgi072
- Tu, S. H., Ku, C. Y., Ho, C. T., Chen, C. S., Huang, C. S., Lee, C. H., Ho, Y. S. (2011). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine- and estrogeninduced α9-nicotinic acetylcholine receptor upregulation in human breast cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(3), 455–466. doi:10.1002/mnfr.201000254
- Vincler, M., Wittenauer, S., Parker, R., Ellison, M., Olivera, B. M., & McIntosh, J. M. (2006). Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), 17880–17884. doi:10.1073/pnas.0608715103
- Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Lüthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12815–12819. doi:10.1073/pnas.0707715105

- Wang, C., & Chi, C. (2004). Conus Peptides A Rich Pharmaceutical Treasure The Biology of Cone Snails Classification and Nomenclature of Conus Peptides. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 36(11), 713–723.
- Warren, G., & Singh, A. (2013). Nicotine and lung cancer. *Journal of Carcinogenesis*, *12*(1), 1. doi:10.4103/1477-3163.106680
- Warren, G. W., Romano, M. a., Kudrimoti, M. R., Randall, M. E., McGarry, R. C., Singh, A. K., & Rangnekar, V. M. (2012). Nicotinic modulation of therapeutic response *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Cancer*, 131(11), 2519–2527. doi:10.1002/ijc.27556
- Whiteaker, P., Christensen, S., Yoshikami, D., Dowell, C., Watkins, M., Gulyas, J., McIntosh, J. M. (2007). Discovery, synthesis, and structure activity of a highly selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Biochemistry*, 46(22), 6628–6638. doi:10.1021/bi7004202
- Wissenbach, U., Niemeyer, B. A., Fixemer, T., Schneidewind, A., & Trost, C. (2001). Expression of CaT-like, a Novel Calcium-selective Channel, Correlates with the Malignancy of Prostate Cancer\*. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 276(22), 19461–19468. doi:10.1074/jbc.M009895200
- Wolbers, F., Buijtenhuijs, P., Haanen, C., & Vermes, I. (2004). Apoptotic cell death kinetics in vitro depend on the cell types and the inducers used. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 9(3), 385–92. doi:10.1023/B:APPT.0000025816.16399.7a
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *30*(1), 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
- Wu, C., Lee, C., & Ho, Y. (2011). Nicotinic Acetylcholine Receptor-Based Blockade: Applications of Molecular Targets for Cancer Therapy, (15), 3533–3542. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2434
- Xu, L., & Deng, X. (2004). Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of μ- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53683–53690. doi:10.1074/jbc.M409889200
- Yadav, S. S., Prasad, C. B., Prasad, S. B., Pandey, L. K., Singh, S., Pradhan, S., & Narayan, G. (2015). Anti-tumor activity of staurosporine in the tumor microenvironment of cervical cancer: An in vitro study. *Life Sciences*, 133, 21–28. doi:10.1016/j.lfs.2015.04.019
- Zamora-Bustillos, R., Aguilar, M. B., Falcón, A., & Heimer de la Cotera, E. P. (2009). Identification, by RT-PCR, of four novel T-1-superfamily conotoxins from the vermivorous snail Conus spurius from the Gulf of Mexico. *Peptides*, 30(8), 1396– 1404. doi:10.1016/j.peptides.2009.05.003

- Zhang, B., Huang, F., & Du, W. (2012). Solution structure of a novel α-conotoxin with a distinctive loop spacing pattern. *Amino Acids*, *43*(1), 389–96. doi:10.1007/s00726-011-1093-x
- Zhang, H., Zhang, C., & Wu, D. (2015). Activation of insulin-like growth factor 1 receptor regulates the radiation-induced lung cancer cell apoptosis. *Immunobiology*, *220*(10), 1136–1140. doi:10.1016/j.imbio.2015.06.007
- Zhang, W., Zhang, Q., Zhang, M., Zhang, Y., Li, F., & Lei, P. (2015). Analysis for the mechanism between the small cell lung cancer and non-small cell lung cancer combing the miRNA and mRNA expression profiles. *Thoracic Cancer*, 6(1), 70–79. doi:10.1111/1759-7714.12135
- Zheng, L., Lin, X., Wu, N., Liu, M., Zheng, Y., Sheng, J., Sun, M. (2013). Targeting cellular apoptotic pathway with peptides from marine organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1836(1), 42–48. doi:10.1016/j.bbcan.2013.02.006
- Zhou, M., Wang, L., Wu, Y., Liu, J., Sun, D., Zhu, X., Xu, A. (2015). Soluble expression and sodium channel activity of lt16a, a novel framework XVI conotoxin from the Msuperfamily. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 98, 5–11. doi:10.1016/j.toxicon.2015.01.009
- Zhou, M., Wang, L., Wu, Y., Zhu, X., Feng, Y., Chen, Z., Xu, A. (2013). Characterizing the evolution and functions of the M-superfamily conotoxins. *Toxicon*, *76*, 150–159. doi:10.1016/j.toxicon.2013.09.020
- Zia, S., Ndoye, a, Lee, T. X., Webber, R. J., & Grando, S. a. (2000). Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(3), 973–981. doi:VL 293

Organización Mundial de la Salud (2016). Recuperado de: www.who.int

Guía de internet de Hardy's para gastropodos marinos (2016). Recuperado de: <u>www.gastropods.com</u>
### Anexo1

Solución A

Compuesto	Porcentaje en solución
Ácido trifluoracético	0.12
Agua destilada	99.88

Solución B

Compuesto	Porcentaje en solución
Acetonitrilo	99.99
Ácido trifluoracético	0.1

Solución C

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

Compuesto	Concentración (mM)	Cantidad (g)
Nacl	137	80
KCI	2.7	2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12	17
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	1.63

PBS (Solución amortiguadora de fostatos)

TAE 1x

Compuesto	Concentración (mM)
Tris	40
Ácido acético	20
EDTA	1