



Universidad del mar

Campus Puerto Ángel

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE UNA FRACCIÓN MENOR A 1 kDa DEL
VENENO DE *Palythoa caribaeorum* (DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1860) EN
EL CANAL IÓNICO Kv10.1

Tesis

Que para obtener el título profesional de
licenciado en biología marina

Presenta
Noel Fabian Hernández

Director
M. en C. Miguel Cuevas Cruz

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2019

Resumen

El canal iónico Kv10.1 se sobreexpresa en la mayoría de los tumores sólidos humanos (70%) y contribuye a la metástasis y la progresión de la enfermedad. Este canal es un indicador de la agresividad del cáncer, esto hace que sea un objetivo para el adecuado tratamiento del cáncer. Las toxinas de baja masa molecular (péptidos o compuestos orgánicos) son capaces de bloquear el transporte de iones a través de esta puerta.

Hasta ahora, solo 2 toxinas han presentado actividad inhibitoria en el canal Kv10.1. La k-hefutoxina (3034.7 Da) aislada del veneno de *Heterometrus fulvipes* y la APETx4 (4650.99 Da) del veneno *Anthopleura elegantissima*. En este trabajo se purificó una fracción de baja masa molecular (<1 kDa) del veneno del zoantideo *Palythoa caribaeorum*, mediante ultrafiltración y cromatografía de fase reversa (RP-HPLC), la cual mostró una actividad inhibitoria de aproximadamente 60% sobre el canal iónico Kv10.1. Esta fracción contiene componentes con potencial uso farmacológico para el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos.

Palabras clave: Veneno, *Palythoa caribaeorum*, Kv10.1, Inhibición, cáncer.

Abstract

The Kv10.1 ion channel is overexpressed in most human solid tumors (70%) and contributes to the metastasis and progression of the disease. This channel is an indicator of the aggressiveness of cancer, this makes it an objective for the appropriate treatment of cancer. Low molecular mass toxins (peptides or organic compounds) are able to block the transport of ions through this gate.

So far, only 2 toxins have presented inhibitory activity in the Kv10.1 channel. The κ -hefutoxin (3034.7 Da) isolated from the venom of *Heterometrus fulvipes* and the APETx4 (4650.99 Da) from the venom *Anthopleura elegantissima*. In this work was purified a fraction of low molecular mass (<1 kDa) of the venom of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* by ultrafiltration and RP-HPLC, which showed an inhibitory activity of approximately 60% on the Kv10.1 ion channel. This fraction contains components with potential pharmacological use for the treatment of several types of solid tumors.

Keywords: Venom, *Palythoa caribaeorum*, Kv10.1, inhibition, cancer.

A mis padres, que me enseñaron a perseverar y luchar siempre por un sueño, porque el orgullo que sienten hacia mí me ha impulsado a llegar al final de este proyecto, admiro su fortaleza y agradezco la prioridad que me han brindado.

Agradecimientos.

A la Universidad del Mar, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales en ella. A todas las personas que representan a la UMAR, que fueron partícipes de esta etapa en mi vida, mi paso por la universidad.

Al Consejo Nacional de Fomento Educativo por haberme becado económicamente durante toda la carrera.

A todos los involucrados en el desarrollo experimental de este proyecto de tesis:

Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros, responsable del departamento de química de biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM, por abrirme las puertas del laboratorio.

Dr. Sergio Agustín Román González, jefe de la unidad de proteómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y su equipo de trabajo, por permitirme realizar parte de la purificación en sus laboratorios.

Dr. Benjamín Velasco Bejarano, QFB. Martha E. Rodríguez Fermán y QFB. Raymundo Rivero Hernández, del Laboratorio Nacional de Prevención y Control de Dopaje, Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE), por el apoyo en los experimentos de espectrometría de masas.

Dr. Enoch Luis Baltazar y Dr. Arturo Picones Medina del Instituto Nacional de Canalopatías, por el apoyo en los experimentos electrofisiológicos.

Agradecer también a mi director de Tesis el M. en C. Miguel Cuevas Cruz por brindarme su apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto, por brindarme su amistad y sabios consejos. Por el aporte económico durante la estancia del proyecto de tesis, por hacerme partícipe de sus experiencias de vida y ser ejemplo de la pasión en el trabajo, pero sobre todo por el invaluable tiempo invertido al desarrollo del proyecto. Finalmente por enseñarme que las amistades, son de las cosas más valiosas que podemos conservar en la vida.

A los sinodales, Dr. Edson Gómez Robles, Dra. Nieves Trujillo Tapia, M. en C. Alejandra Torres Ariño y al Dr. Sergio Agustín Román González por su valiosa aportación en la presentación de la tesis.

A mis padres por todo su apoyo para mantenerme en este sueño, porque sé de todas las cosas que se tuvieron que privar y el enorme esfuerzo que hicieron para llevar este proyecto a buen término. Por estar ahí celebrando mis triunfos pero sobre todo por su incondicional apoyo para levantarme en los fracasos. Son mi fuente de inspiración y motivación para ser una mejor persona cada día, me han enseñado a vivir la vida un día a la vez, que en la vida hay que luchar por los sueños con pasión y que dar el cien por ciento en ellos no siempre es suficiente. Gracias por ser parte de este sueño, los amo profundamente y me enorgullece tenerlos como padres.

Un agradecimiento especial a la familia Vanegas Reza por patrocinar la estancia durante el desarrollo del proyecto de tesis, y a la familia Ramos que patrocinaron la estancia profesional en donde inició el proyecto de tesis, me han acogido increíblemente, les agradezco profundamente de todo corazón.

Al Dr. Fernando Lazcano Pérez por hacerme ver los errores en la redacción de la tesis con respaldo de toda su experiencia, darme sus consejos y sugerencias para mejorarla. Mil gracias.

Finalmente quiero externar que es un momento muy especial para mí que espero, no solo perdure con el tiempo en la mente de las personas que aquí menciono, sino también en el de las personas que no aparecen pero han sido parte del proceso de que me encuentre en este punto.

Índice

Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
1. Introducción	1
1.1 Arrecifes de coral.....	1
1.1.1 Adaptaciones para alimentación y defensa en cnidarios	2
1.1.2 Cnidocito.....	3
1.2 <i>Palythoa caribaeorum</i>	5
1.2.1 Hábitat.....	6
1.2.2 Mecanismos usados para la alimentación.....	6
1.3 Técnicas electrofisiológicas.....	7
Voltage clamp.....	7
Patch clamp.....	7
1.4 Canales iónicos.....	10
1.4.1 El cáncer y los canales Kv10.1.....	12
1.5 Expresión heteróloga: Principales células usadas	15
1.5.1 Células HEK-293.....	15
1.5.2 Células cromafines.....	16
2. Antecedentes	17
3. Justificación.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos.....	21
6. Material y métodos.....	22
6.1 Área de estudio.....	22
6.2 Métodos	
6.2.1 Separación por ultrafiltración del veneno de <i>P.</i> <i>caribaeorum</i>	23
6.2.2 Separación de la fracción menor 1 kDa.....	23
6.2.3 Cuantificación por gravimetría.....	24
6.2.4 Cuantificación de proteína de las fracciones con ácido bicinconínico.....	25
6.2.5 Ensayos electrofisiológicos.....	26
6.2.6 Determinación de masa molecular.....	26
7 Resultados	27
7.1 Recolecta de organismos y extracción del veneno.....	27
7.2 Ultrafiltración y RP-HPLC.....	27
7.3 Ensayos electrofisiológicos.....	30
7.4 Espectrometría de masas.....	31
8 Discusión.....	32
9 Conclusión.....	35

Referencias bibliográficas.....	36
Anexos	

Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de la clase Anthozoa.....	3
Figura 2. Estructura del nematocisto.....	4
Figura 3. Colonia del zoantideo <i>Palythoa caribaeorum</i>	5
Figura 4-a. Patch clamp configuración cell-attached y whole-cell.....	8
Figura 4-b. Patch clamp configuración outside-out e inside-out.....	9
Figura 5. Estructura general de los canales Kv.....	11
Figura 6. Sistema Arrecifal Veracruzano.....	22
Figura 7. Cromatograma de fase reversa de la fracción <1 kDa.....	24
Figura 8. Cromatograma de la fracción menor a 1 kDa del veneno de <i>P. caibaeorum</i>	27
Figura 9. Cromatograma de la fracción PcFr-11.1.....	29
Figura 10. Registro electrofisiológico de la fracción PcFr-11.1.....	30
Figura 11. Espectro de masa molecular de la fracción PcFr-11.1.....	31

Índice de tablas

Tabla I. Bloqueadores del canal Kv10.1.....	14
Tabla II. Reactivos para la curva de calibración (BCA).....	25
Tabla III. Fracciones presentes en la fracción menor a 1 kDa	28
Tabla IV. Cuantificación de fracciones presentes en PcFr-11.1 por BCA.....	29

Lista de abreviaturas

Na ⁺ v	Canales de sodio dependientes de voltaje
Ca ²⁺ v	Canales de calcio dependientes de voltaje
Cl ⁻ v	Canales de cloro dependientes de voltaje
K ⁺ v	Canales de potasio dependientes de voltaje
VGKCs	Canales de potasio dependientes de voltaje siglas en inglés
p53	Gen supresor de tumores
E2F1	Gen de factor de crecimiento
HEK-293	Línea celular embrionaria de riñón humano
Ad5	Adenovirus tipo 5
Da	Daltons
kDa	Kilo Daltons
Kv10.1	Canal de potasio dependiente de voltaje, primer canal descrito de la décima familia.
OMS	Organización Mundial de la Salud
S1-S6	Segmentos del canal Kv10.1