

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



---

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

---

**Evaluación de la actividad antiproliferativa de  $\alpha$ -conotoxinas  
en células de cáncer cervicouterino**

Tesis

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

Presenta:

**Poulette Carolina Álvarez Rosales**

Ensenada, Baja California, México

2024

Tesis defendida por  
**Poulette Carolina Álvarez Rosales**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro**  
Director de tesis

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**

**Dr. Pierrick Gerard Fournier**

**Dr. Ernesto García Mendoza**



---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Poulette Carolina Álvarez Rosales** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

### **Evaluación de la actividad antiproliferativa de $\alpha$ -conotoxinas en células de cáncer cervicouterino**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
**Director de tesis**

El cáncer se desarrolla debido a la acumulación de mutaciones que desencadenan el aumento en la proliferación y la resistencia a la apoptosis. Estas mutaciones pueden estar vinculadas a la desregulación en la expresión de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en células cancerosas. En consecuencia, ciertas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de antagonistas de nAChR, como las  $\alpha$ -conotoxinas debido a su selectividad hacia los nAChR. En este proyecto, se evaluó la actividad antiproliferativa de doce  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas sobre cuatro líneas celulares de cáncer cervicouterino (Hela, SiHa, C-33A y Ca-Ski) con expresión de distintas subunidades de nAChR. La identificación de los nAChR se realizó mediante la extracción y la retrotranscripción del ARN celular. Una vez obtenido el ADNc, se amplificaron las distintas subunidades de los receptores nAChR. Los resultados mostraron que las cuatro líneas celulares comparten la subunidad  $\alpha 5$ ; mientras que solo la subunidad  $\alpha 9$  y  $\alpha 4$  se expresaron en HeLa y C-33A, respectivamente. Posteriormente, se evaluó el efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas en la viabilidad celular utilizando un ensayo colorimétrico. Los resultados mostraron que para HeLa, SiHa y Ca-Ski, las  $\alpha$ -conotoxinas empleadas no tuvieron un efecto significativo con respecto al control negativo ( $p > 0.05$ ), mientras que en C-33A las  $\alpha$ -conotoxinas xm1b y Vc1.1 disminuyeron el porcentaje de viabilidad un 40% ( $p = 0.0001$ ) y un 15% ( $p = 0.0210$ ), respectivamente, a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . A partir de los efectos observados en xm1b y Vc1.1, se procedió a realizar un ensayo a distintas concentraciones para evaluar la dosis-respuesta en C-33A. A partir de los valores obtenidos en los ensayos posteriores, se seleccionó la concentración de 105  $\mu\text{M}$  para xm1b y 8.8  $\mu\text{M}$  para Vc1.1 debido a su capacidad para disminuir el porcentaje de viabilidad celular ( $p < 0.005$ ). Finalmente, se determinó el tipo de muerte celular mediante microscopía de fluorescencia. Ambas conotoxinas provocaron la activación del marcador caspasas 3/7, lo que sugiere una muerte celular por apoptosis, y la permeabilización del yoduro de propidio, resultado de la pérdida de la integridad membranal. El efecto que induce xm1b y Vc1.1 en C-33A se atribuye a la presencia exclusiva de la subunidad  $\alpha 4$  en C-33A.

**Palabras clave:** cáncer cervicouterino,  $\alpha$ -conotoxinas, receptores nicotínicos de acetilcolina, viabilidad celular, apoptosis

Abstract of the thesis presented by **Poulette Carolina Álvarez Rosales** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

### **Evaluation of the antiproliferative activity of $\alpha$ -conotoxins in cervical cancer cells**

Abstract approved by:

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
**Thesis Director**

Cancer develops through to the accumulation of mutations that trigger increased proliferation and resistance to apoptosis. These mutations may be linked to the dysregulation in the expression of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in cancer cells. Consequently, certain research has focused on the search for nAChR antagonists, such as  $\alpha$ -conotoxins, due to their selectivity towards nAChR. In this project, the antiproliferative activity of twelve synthetic  $\alpha$ -conotoxins on four cervical cancer cell lines (HeLa, SiHa, C-33A, and Ca-Ski) with expression of different nAChR subunits was evaluated. The identification of expressed nAChR was performed through cellular RNA extraction and retrotranscription. Once the cDNA was obtained, the different subunits of the nAChR receptors were amplified. The results showed that the four cell lines shared the  $\alpha 5$  subunit, while only the  $\alpha 9$  and  $\alpha 4$  subunits were expressed in HeLa and C-33A, respectively. Subsequently, the effect of the  $\alpha$ -conotoxins on cell viability was evaluated using a colorimetric assay. Results indicated that for HeLa, SiHa, and Ca-Ski cell lines, the  $\alpha$ -conotoxins used did not have a significant effect compared to the negative control ( $p > 0.05$ ), while in C-33A, the  $\alpha$ -conotoxins xm1b and Vc1.1 decreased cell viability by 40% ( $p = 0.0001$ ) and 15% ( $p = 0.0210$ ), respectively, at a concentration of 50  $\mu\text{M}$ . Following the observed effects of xm1b and Vc1.1, a dose-response assay was performed at different concentrations to evaluate their effect on C-33A. From the obtained values, the concentration of 105  $\mu\text{M}$  for xm1b and 8.8  $\mu\text{M}$  for Vc1.1 was selected for subsequent assays due to their ability to decrease cell viability ( $p < 0.005$ ). Finally, fluorescence microscopy assays were conducted to determine the type of cell death. Both conotoxins induced activation of the caspase 3/7 marker, suggesting cell death by apoptosis, and propidium iodide permeabilization, indicative of loss of membrane integrity. The effect induced by xm1b and Vc1.1 in C-33A is attributed to the exclusive presence of the  $\alpha 4$  subunit in C-33A.

**Keywords:** cervical cancer,  $\alpha$ -conotoxins, nicotinic acetylcholine receptors, cell viability, apoptosis

## Dedicatoria

A todos los biólogos de vocación y de corazón, continúen asombrándose de la naturaleza, permanezcan curiosos y persistan en hacer de este mundo un lugar mejor.

*“Inspire others to inspire themselves”*

- Pontus Alv

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme la oportunidad y el respaldo económico para continuar con mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Departamento de Innovación Biomédica por brindarme la oportunidad de formar parte del posgrado y por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Al Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, por todo el apoyo brindado, por su constante disposición, por las valiosas enseñanzas y por los consejos tanto académicos como profesionales que me ha brindado. Muchas gracias.

A la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, por su dedicación, por su apoyo en el desarrollo experimental y por compartir sus conocimientos en el laboratorio de cultivo celular.

Al Dr. Pierrick Gerard Fournier, por compartir sus conocimientos en la biología del cáncer y por sus valiosas recomendaciones para mejorar la calidad de este trabajo.

Al Dr. Ernesto García Mendoza, por sus valiosos comentarios y por enseñarme acerca de las ficotoxinas.

Al Dr. Jahaziel Gasperin Bulbarela, por su amistad, su paciencia, su constante asistencia y por los ánimos brindados cuando los experimentos no salían como esperábamos. Muchas gracias.

A todas las personas que he conocido durante esta etapa y que ahora considero amigos. En especial al grupo de senderistas de Pelícanos Viajeros. Ha sido un privilegio compartir el sendero con ustedes.

A mis amigos que continúan siendo parte de mi vida. En especial a mis biólogos favoritos Dalila, Ximena, Jesus y María por su valiosa amistad. Mucho éxito siempre, lo tendré y lo tendrán.

Mención especial a Miguel, por su apoyo incondicional y por siempre motivarme a superarme.

A toda mi familia, en especial a mis abuelos, a mi mamá y mis gatitos Tóxica y Quesadilla. Los amo.

## Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes.....	2
1.1.1. Acetilcolina y receptores de acetilcolina (AChR).....	2
1.1.2. Receptores nicotínicos (nAChR) y su relación con cáncer.....	7
1.1.3. Antagonistas de receptores nicotínicos (nAChR) contra el cáncer.....	10
1.1.4. $\alpha$ -conotoxinas.....	11
1.1.4.1 Características y clasificación.....	11
1.1.4.2. $\alpha$ -conotoxinas como antagonistas de los receptores nicotínicos (nAChR).....	12
1.1.4.3. $\alpha$ -conotoxinas contra el cáncer.....	13
1.1.5. Cáncer cervicouterino.....	15
1.2 Justificación.....	20
1.3 Hipótesis.....	20
1.4 Objetivos.....	20
1.4.1. Objetivo general.....	20
1.4.2. Objetivos específicos.....	20
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>21</b>
2.1. Cultivo de líneas celulares.....	21
2.1.1. Medio de cultivo y activación de células.....	22
2.1.2. Mantenimiento celular.....	23
2.1.3. Subcultivo y expansión celular.....	23
2.1.4. Conteo celular.....	23
2.1.5. Criopreservación.....	23



2.2. Identificación de la expresión génica de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) ..	24
2.2.1. Extracción de ARN .....	24
2.2.2. Retrotranscripción.....	25
2.2.3. Amplificación de ADNc .....	25
2.3. Ensayos de viabilidad celular .....	27
2.3.1. Determinación de la confluencia celular .....	27
2.3.2. Porcentaje de dimetilsulfóxido (DMSO) requerido para reducir la viabilidad celular ...	27
2.3.3. Análisis estadísticos en los ensayos de viabilidad celular .....	30
2.4. Ensayos de muerte celular .....	30
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>	<b>32</b>
3.1. Determinación de la expresión de las subunidades de nAChR <i>in vitro</i> .....	32
3.2 Ensayos de viabilidad celular .....	34
3.2.1. Confluencia celular .....	34
3.2.2. Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) en la viabilidad celular .....	36
3.2.3. Efecto de las $\alpha$ -conotoxinas en la viabilidad celular .....	37
3.3 Ensayos de muerte celular .....	40
<b>Capítulo 4. Discusión .....</b>	<b>43</b>
<b>Capítulo 5. Conclusión .....</b>	<b>49</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>50</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Síntesis y liberación del neurotransmisor acetilcolina.....	3
2. Estructura de los receptores de acetilcolina muscarínicos.....	4
3. Estructura de los receptores nicotínicos de acetilcolina.....	5
4. Subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina .....	6
5. Aminoácidos implicados en el sitio de unión en los receptores nicotínicos de acetilcolina .....	7
6. Señalización de progresión tumoral por agonistas en los receptores nicotínicos.....	8
7. Representación estructural del patrón globular de cisteínas en $\alpha$ -conotoxinas .....	12
8. Anatomía general del cuello cervicouterino .....	15
9. Esquema de la morfología de las células epiteliales en el cuello uterino.....	16
10. Representación esquemática de la morfología y del genoma del virus del papiloma humano (HPV) .....	17
11. Morfología de las cuatro líneas celulares de cáncer cervicouterino. ....	21
12. Esquema general del procedimiento empleado en los ensayos de viabilidad celular .....	28
13. Imagen representativa de la orientación de los cuadrantes .....	31
14. Integridad del ARN ribosomal de cada línea celular de cáncer cervicouterino .....	32
15. Amplificación de los los receptores nicotínicos de acetilcolina para cada línea celular de cáncer cervicouterino .....	33
16. Confluencia celular.....	35
17. Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) en la viabilidad celular .....	36
18. Efecto de las $\alpha$ -conotoxinas en la viabilidad celular .....	37
19. Efecto de $\alpha$ -conotoxinas en la línea celular C-33A.....	38
20. Efecto en la viabilidad celular de la conotoxina xm1b y Vc1.1 en C-33A.....	40
21. Ensayo de muerte celular en C-33A.....	41
22. Comparación de secuencias entre $\alpha$ -conotoxinas .....	43
23. Comparación de secuencias entre xm1b y Vc1.1.....	45

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Efecto de las $\alpha$ -conotoxinas sobre distintas líneas de cáncer que sobreexpresan nAChR. ....	14
2. Función de los genes y proteínas del virus del papiloma humano (HPV). .....	18
3. Características de las líneas celulares de cáncer cervicouterino .....	22
4. Cebadores empleados en la identificación de receptores nicotínicos.....	26
5. Características de las $\alpha$ -conotoxinas.....	29
6. Características de los marcadores empleados en los ensayos de muerte celular.....	30
7. Cantidad de ARN total de cada línea celular de cáncer cervicouterino.....	32
8. Comparación de las subunidades de receptores nAChR en las células de cáncer cervicouterino. .....	34
9. Conversión de unidades para cada conotoxina. ....	39
10. Inferencia de la afinidad de las $\alpha$ -conotoxinas sintéticas en los nAChR .....	44

## Capítulo 1. Introducción

---

El cáncer es un conjunto de enfermedades derivado de la acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas que producen un cambio en el fenotipo de las células, favoreciendo el desarrollo de las células cancerosas mediante la activación o inactivación de genes en el genoma (Koutsogiannouli et al., 2013). A nivel mundial, el cáncer corresponde a la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares (Wang et al., 2016), y se estima que la incidencia de cáncer para 2050 será de 35 millones de casos, lo que representa un aumento del 77% en comparación con los 20 millones de casos reportados en 2022 (World Health Organization, 2024).

A partir de los 19.3 millones de casos nuevos de cáncer en 2020, los tres tipos de cáncer con mayor incidencia en todo el mundo para hombres y mujeres corresponde al cáncer de mama (11.7%), seguido por el cáncer de pulmón (11.4%) y en tercer lugar el cáncer colorrectal (10%), siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte en ambos sexos. Sin embargo, al considerar únicamente las estadísticas relacionadas con las mujeres a nivel global, destaca que el cáncer cervicouterino ocupa el cuarto lugar en incidencia y en mortalidad (Sung et al., 2021). En contraste, en México, el cáncer cervicouterino ocupa el segundo lugar en incidencia y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (Muñoz et al., 2022).

Los cambios producidos en las células normales afectan el funcionamiento de múltiples rutas de señalización que facilitan la progresión del cáncer. En consecuencia de la desregulación de las vías celulares, se puede producir la evasión del sistema inmunológico, el aumento de la proliferación celular, la inestabilidad del genoma, la resistencia a la apoptosis, la desregulación del metabolismo y la activación de mecanismos inflamatorios para promover el crecimiento y la diseminación metastásica (Hanahan y Weinberg, 2011; Hanahan, 2021). La metástasis, que implica la diseminación celular desde el tumor primario hacia órganos adyacentes para el desarrollo de un tumor secundario, es responsable del 90% de las muertes relacionadas con cáncer (Guan, 2015).

Entre los cambios que promueven los mecanismos de progresión tumoral se encuentra la desregulación en la expresión de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). Los nAChR son receptores ionotrópicos activados por ligando expresados en la membrana celular de las células cancerosas (Shuller, 2009). En algunos tipos de cáncer se ha reportado que la sobreexpresión de diversos nAChR se encuentran asociados con la desregulación en la proliferación, la angiogénesis, la

inhibición de la apoptosis, la transición epitelial-mesenquimal, la migración, la metástasis y la resistencia a la quimioterapia (Bu et al., 2019). En consecuencia, las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de antagonistas de los receptores nAChR sobreexpresados en las células cancerosas debido a su implicación en la tumorigénesis (Sun et al., 2020).

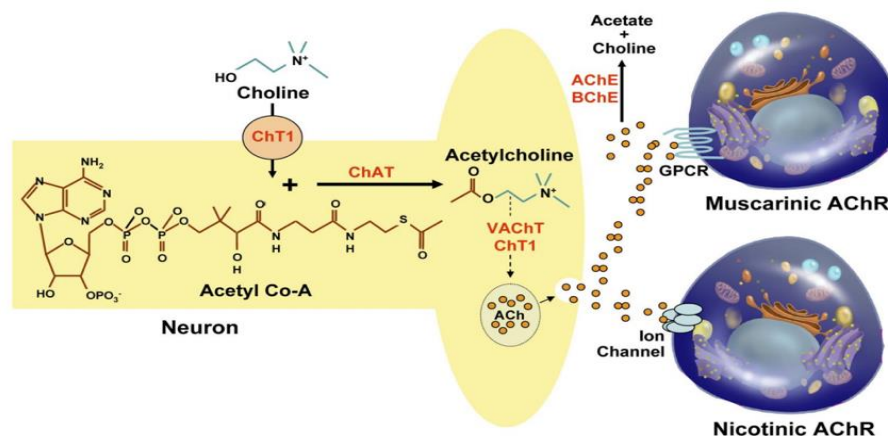
Los antagonistas de especial interés en este proyecto, corresponden a las  $\alpha$ -conotoxinas provenientes de los gasterópodos marinos venenosos debido a la selectividad que presentan hacia los receptores nAChR y a los canales iónicos activados por voltaje y/o ligando (Kumari et al., 2019; Sun et al., 2020). En este proyecto, se pretende determinar el efecto de doce  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas en la viabilidad celular de cuatro líneas cáncer cervicouterino que expresan nAChR con el objetivo de evaluar su potencial como posibles blancos moleculares contra el cáncer.

## **1.1. Antecedentes**

### **1.1.1. Acetilcolina y receptores de acetilcolina (AChR)**

Los AChR son proteínas receptoras de membrana que funcionan como mediadores de la señalización colinérgica en sistemas neuronales y no neuronales. Los sistemas neuronales son los más estudiados debido al descubrimiento del primer neurotransmisor endógeno “vagusstoff” en 1914, conocido hoy como acetilcolina (Tansey, 2006). El descubrimiento de la acetilcolina derivó en estudios que revelaron su actividad moduladora en la sinapsis del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) (Suryanarayanan, 2014). En 1936 se otorgó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a Sir Henry Dale y Otto Loewi por determinar la neurotransmisión química entre las células neuronales a través del neurotransmisor acetilcolina (The Nobel Prize, 2024).

En la neurotransmisión neuronal, la acetilcolina es sintetizada en las neuronas colinérgicas presinápticas a partir del grupo acetil derivado de la acetil-CoA, el cual es donado a la colina mediante la enzima colina acetiltransferasa, y es posteriormente empaquetada en vesículas secretoras hasta su liberación por exocitosis en la hendidura sináptica hacia las neuronas postsinápticas. En las neuronas postsinápticas, la acetilcolina puede interactuar con los receptores muscarínicos metabotrópicos (mAChR) y los nAChR (Figura 1) (Chen et al., 2019).



**Figura 1. Síntesis y liberación del neurotransmisor acetilcolina.** La acetilcolina es sintetizada en las neuronas presinápticas y se forma a partir de la unión entre la colina y la acetil-CoA mediante la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). La liberación de la acetilcolina en la hendidura sináptica puede interactuar con los subtipos de receptores de acetilcolina, los muscarínicos y los nicotínicos (Tomado de Shah et al., 2009).

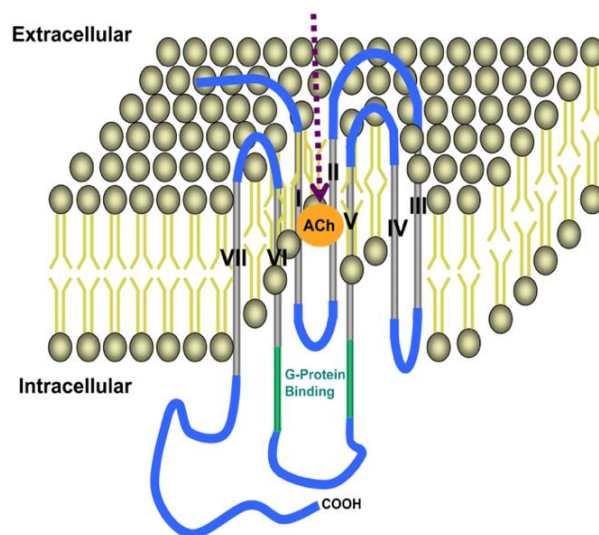
En contraste con la extensa investigación llevada a cabo en los sistemas colinérgicos neuronales, se prestó una atención limitada a los sistemas colinérgicos no neuronales. Incluso, no existía un término para definir el sistema no neuronal hasta que fue introducido por primera vez en 1978 por Sastry y Sadavongvivad (Sastry y Sadavongvivad, 1978). Además, en contraste con la información sobre la liberación de acetilcolina por exocitosis, el mecanismo de liberación de acetilcolina en el sistema no neuronal es escaso (Wessler y Kirkpatrick, 2008).

En la actualidad se conoce que la acetilcolina ha estado presente a lo largo de la evolución en organismos unicelulares y multicelulares. La síntesis de acetilcolina se ha detectado en bacterias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, además de estar presente en algas, levaduras, hongos, protistas, plantas, invertebrados como esponjas, corales y erizos de mar, y mamíferos como ratas y humanos (Wessler y Kirkpatrick, 2008; Grando et al., 2020). Incluso, se infiere que la acetilcolina se ha expresado desde el origen de la vida, funcionando como una molécula de señalización entre células no neuronales hace aproximadamente tres mil millones de años, 2.5 millones de años antes de que se desarrollara el primer sistema neuronal (Wessler et al., 2001; Reichrath et al., 2016; Horiuchi et al., 2002). De igual manera que en el sistema neuronal, la acetilcolina puede interactuar con los receptores mAChR y los receptores nAChR presentes en células no neuronales (Beckmann et al., 2014; Chen et al., 2019). Entre las células no neuronales se encuentran las células epiteliales, células endoteliales, células del sistema inmunológico, células mesoteliales y células mesenquimales (Wessler y Kirkpatrick, 2008).

En los sistemas no neuronales, la acetilcolina modula la señalización celular en respuesta a estímulos internos o externos. Entre los principales procesos fisiológicos en los que se encuentra involucrado es la proliferación, diferenciación, migración y el intercambio de iones (Wessler y Kirkpatrick, 2008). El funcionamiento incorrecto de los receptores pueden causar condiciones fisiopatológicas, incluidos cambios en la respuesta inmunológica e inflamatoria, el desarrollo y la progresión del cáncer, así como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, respiratorias y digestivas (Mashimo et al., 2021).

### 1.1.2. Receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR)

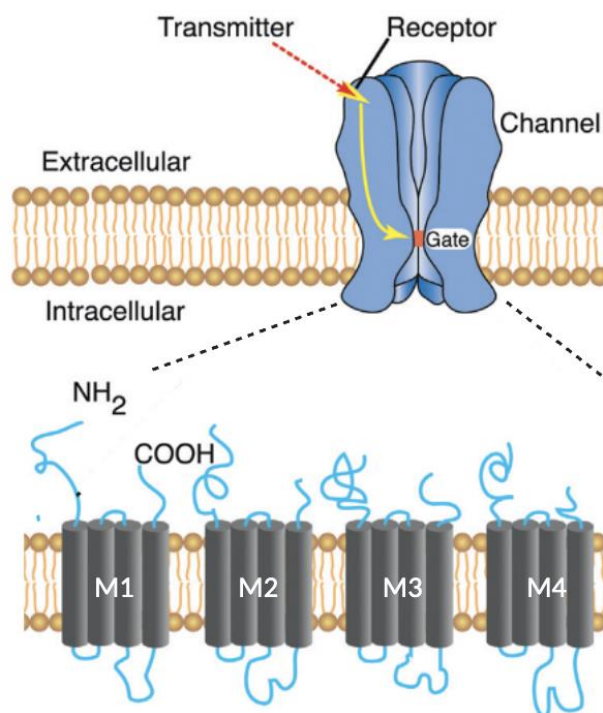
Los mAChR son proteínas compuestas por siete dominios helicoidales transmembrana acopladas a proteínas G y se encuentran conectados por tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares (Figura 2). Existen cinco subtipos de mAChR denominados M1-M5, expresados principalmente en las uniones neuromusculares, y su activación involucra la señalización de segundos mensajeros (Dang et al., 2016). Los mAChR impares M1, M3 y M5, activan a la fosfolipasa C y la señalización del fosfatidilinositol trifosfato, que actúan como activadoras del sistema. Los mAChR pares, M2 y M4, inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, por lo que actúan como inhibidoras (Shah et al., 2009).



**Figura 2. Estructura de los receptores de acetilcolina muscarínicos.** Las proteínas tienen siete dominios transmembranales (I-VII) conectados por tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares (azul). Presentan un sitio de unión a proteínas G (verde) para llevar a cabo su función mediante la liberación de segundos mensajeros en presencia de la unión de la acetilcolina (anaranjado) (Tomado de Shah et al., 2009).

### 1.1.3. Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)

Los nAChR son canales iónicos activados por ligando presentes en la membrana celular compuestos por cuatro dominios transmembranales ( $M_1$ - $M_4$ ). Los dominios conforman las cinco subunidades de los nAChR y se encuentran dispuestas alrededor de un poro central (Figura 3). Los receptores nAChR se dividen en tres secciones, (1) una porción extracelular hidrofílica  $NH_2$  que contiene los sitios de unión del neurotransmisor, (2) una región transmembranal que forman las paredes del canal, y (3) una sección citoplasmática donde tienen lugar las reacciones de fosforilación (Arias, 2000).

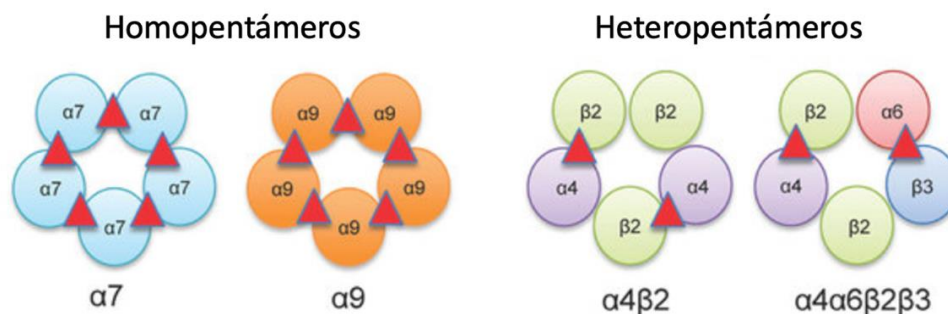


**Figura 3. Estructura de los receptores nicotínicos de acetilcolina.** Los receptores se componen de cinco subunidades y están conformados por tres secciones, una región extracelular, una región transmembranal y una región citoplasmática. En color rojo se muestra la unión de la acetilcolina (Modificado de Waxham, 2014).

En la actualidad, se han descrito diecisiete subunidades de las cuales se puede formar un nAChR (Paleari et al., 2008). La estructura y función de las subunidades depende de la conformación de los nAChR, los cuales se pueden dividir en receptores neuronales que comprenden de doce subunidades ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ ) y receptores musculares que comprenden de cinco subunidades ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) (Karlin et al., 2002). Las cinco subunidades del receptor nAChR pueden formar homopentámeros o heteropentámeros (Figura 4). En humanos, únicamente se encuentran expresados las subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ . Las subunidades  $\alpha 7$ , y  $\alpha 9$  pueden ensamblarse como homopentámeros, aunque



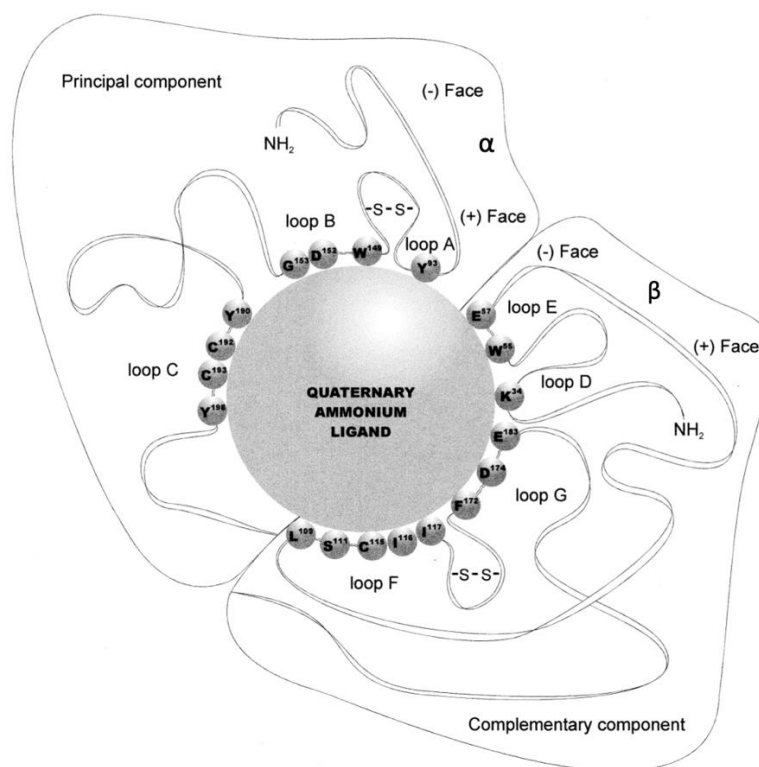
$\alpha 9$  también puede incorporar  $\alpha 10$ . El resto de las subunidades requieren formar heteropentámeros obligados entre las distintas subunidades alfa y beta (Gharpure et al., 2020).



**Figura 4. Subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina.** Los receptores se componen de cinco subunidades que pueden estar compuestas de las mismas subunidades (homopentámeros) o distintas subunidades (heteropentámeros) dispuestos alrededor en un poro central. Los triángulos de color rojo representan los sitios de unión de la acetilcolina (Tomado de Hendrickson, 2013).

En las subunidades homopentaméricas, la acetilcolina induce el nivel máximo de activación a partir de un solo sitio de unión en los receptores nAChR, mientras que en las subunidades heteropentaméricas, es necesario que la acetilcolina se una a dos sitios de unión (Scholze y Huck, 2020). Las subunidades alfa en los nAChR contienen el sitio de unión primario del agonista, mientras que las subunidades beta contienen los componentes complementarios que estabilizan la unión del ligando (Gharpure et al., 2020). No obstante, la subunidad  $\alpha 5$  presenta una excepción, ya que no contiene un componente complementario al sitio de unión del agonista y por lo tanto se le denomina unidad accesoria. Sin embargo, su presencia en subunidades heteropentaméricas modifica las propiedades funcionales entre el receptor y el canal (Dani, 2015).

Los agonistas y los antagonistas competitivos comparten el mismo sitio de unión a los nAChR. El sitio de unión se encuentra entre la subunidad alfa (+) y la subunidad complementaria (-), y se encuentran conformados por seis bucles denominados A-F. Los bucles A, B y C pertenecen a la subunidad alfa, mientras que los bucles D, E y F pertenecen a la subunidad complementaria (Gharpure et al., 2020). En la Figura 5 se muestran los aminoácidos involucrados en el reconocimiento y la unión de los agonistas y antagonistas competitivos. El aminoácido principal corresponde al  $Y^{93}$ , situado en el bucle A, debido a que es el principal responsable de la unión de la acetilcolina. En el bucle B se encuentran los aminoácidos  $W^{149}$ ,  $Y^{152}$  y  $G^{153}$  y participan en la estabilidad del sitio de unión. Los aminoácidos  $Y^{190}$ ,  $C^{192}$ ,  $C^{193}$  e  $Y^{198}$ , ubicados en el bucle C, contribuyen a la estabilización de unión entre la acetilcolina y el sitio de unión a través de interacciones aromáticas e hidrofóbicas (Arias, 2000; Karlin et al., 2002).



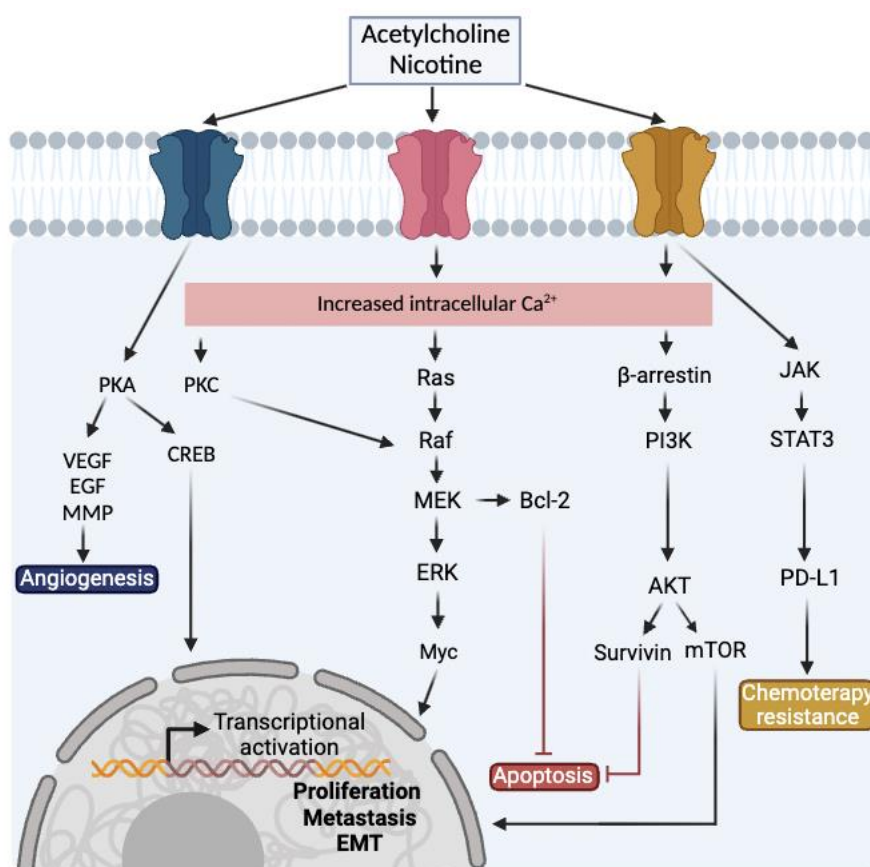
**Figura 5. Aminoácidos implicados en el sitio de unión en los receptores nicotínicos de acetilcolina.** La subunidad alfa es el componente principal del sitio de unión de agonistas y antagonistas competitivos. Está conformado por tres bucles denominados A, B y C que contienen aminoácidos involucrados en estabilizar la unión de acetilcolina con los receptores nicotínicos (Arias, 2000).

### 1.1.2. Receptores nicotínicos (nAChR) y su relación con cáncer

La unión de la acetilcolina a los nAChR induce el intercambio de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> presentes en el medio extracelular hacia el medio intracelular de la célula, liberando K<sup>+</sup> y produciendo la despolarización de la célula (Zoli et al., 2018). El efecto que desencadena la despolarización está determinado por la ubicación y las subunidades que componen el nAChR; e incluso las vías de señalización difieren entre células normales y las células cancerosas (Wu et al., 2011). Los nAChR se encuentran sobreexpresados en algunas células cancerosas y están asociados a diversos procesos de progresión tumoral, incluyendo la desregulación en la proliferación, la angiogénesis, la inhibición de la apoptosis, la transición epitelial-mesenquimal, la migración, metástasis y la resistencia a la quimioterapia (Bu et al., 2019).

La información sobre las vías de señalización que inducen los nAChR en los procesos de progresión tumoral se ha obtenido principalmente a través del estudio de los receptores heteroméricos  $\alpha 4\beta 2$  y los receptores homoméricos  $\alpha 7$ . Estos nAChR además de ser evolutivamente más antiguos, son los

receptores a los cuales los derivados del tabaco como la nicotina y las nitrosaminas como 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) y N-nitrosornicotina (NNN) actúan como agonistas (Zhao et al., 2016). El constante consumo de tabaco se encuentra relacionado con el desarrollo de cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga y cáncer de riñón (Chernyavsky et al., 2015). Las principales rutas de señalización que inducen los agonistas sobre los nAChR se describen en la Figura 6.



**Figura 6. Señalización de progresión tumoral por agonistas en los receptores nicotínicos.** La unión de los agonistas como acetilcolina o nicotina sobre los receptores nAChR inducen mecanismos de progresión tumoral como la angiogénesis, el aumento de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la resistencia a la quimioterapia, la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la metástasis. Los nAChR se muestran de diferentes colores para ejemplificar las distintas subunidades – homopentaméricas o heteropentaméricas – que lo componen. PKA: proteína cinasa A, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico, MMP: metaloproteinasas de matriz, CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico, PKC: proteína cinasa C, PD-L1: Ligando 1 de Muerte Programada (Modificada de Bele et al., 2023).

La angiogénesis, un proceso que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proporciona a las células cancerosas el suministro necesario de nutrientes y oxígeno

(Gupta y Qin, 2003; Nishida et al., 2006). La estimulación de la angiogénesis inicia a partir de la unión de la acetilcolina sobre los nAChR, e induce la activación de la proteína cinasa A (PKA), la cual lleva a cabo la fosforilación de diversas proteínas y la liberación de los factores de crecimiento VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y EGF (factor de crecimiento epidérmico), así como las MMP (metaloproteinasas de matriz). La PKA también tiene la capacidad de activar el factor de transcripción CREB (proteína de unión a elementos reguladores de AMPc) mediante procesos de fosforilación. CREB regula la expresión genética de oncogenes como c-Jun y ciclina D1, fomentando así la proliferación celular (Sakamoto y Frank, 2009; Zhang et al., 2020; He et al., 2022).

Los mecanismos que promueven el aumento de la proliferación celular mediante la unión de la acetilcolina a los nAChR implican la activación de varias vías de señalización. Entre ellas, se encuentra la vía RAF/MEK/ERK activada mediante CaMKII (proteína cinasa II dependiente de calmodulina) y PKC, así como mediante la activación independiente de  $Ca^{2+}$  mediante la proteína Ras. Ambas vías pueden activar la oncoproteína Myc, la cual a su vez activa factores de transcripción involucrados en la proliferación y la replicación del ADN (Gabay et al., 2014; Madden et al., 2021). Además, las vías CaMKII y PKC también pueden activar mecanismos de resistencia a la muerte celular mediante la activación de la proteína antiapoptótica Bcl-2, asociada con la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Qian et al., 2022). A través de otra vía que implica la señalización de la proteína  $\beta$ -arrestina mediante la vía Rb-Raf y la ruta de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)/proteína cinasa B (AKT), se activa la proteína Survivin involucrada en la inhibición de la apoptosis mediante el bloqueo de las caspasas (Chen et al., 2016). La vía AKT también se encuentra asociada con la activación de mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos), involucrado en la proliferación y crecimiento celular (Sabatini, 2006; Zou et al., 2020).

Aunado a lo anterior, existe evidencia que indica que las células cancerosas desarrollan resistencia a la quimioterapia con la activación de PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) mediante la activación de STAT3 dependiente de JAK. El PD-L1 es un ligando presente en las células cancerosas que le permite unirse al receptor PD-1 (proteína de muerte celular programada) presente en las células T. La unión entre el ligando PD-L1 y el receptor PD-1 contribuye al agotamiento de los linfocitos T, lo que conduce a una disminución en su respuesta inmunológica y permite que las células cancerosas escapen de la inmunovigilancia (Cha et al., 2019). La resistencia a la quimioterapia representa uno de los principales desafíos en la terapia contra el cáncer, comprometiendo la eficacia del tratamiento y la recuperación del paciente (Nour et al., 2021).

### **1.1.3. Antagonistas de receptores nicotínicos (nAChR) contra el cáncer**

Los tratamientos utilizados contra el cáncer consisten en la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia y sus combinaciones (Wargo et al., 2015). La quimioterapia y radioterapia son los tratamientos más utilizados para tratar a los pacientes, los cuales tienen como objetivo principal la reducción del tamaño tumoral y la prevención de la diseminación (Xie et al., 2020). El inconveniente de estos tratamientos es que el 90% fracasan debido a la citotoxicidad que afecta de manera proporcional a las células normales y a las células cancerosas, así como la resistencia adquirida de las células cancerosas a las terapias (Mansoori et al., 2017).

El fracaso de los tratamientos contra el cáncer es un fenómeno multifactorial en el que la eficacia se determina por la combinación de las características del huésped y del tumor. El factor principal que impacta la respuesta al tratamiento en el huésped es la resistencia farmacocinética, la cual impide que la actividad del fármaco alcance su objetivo (Alfarouk et al., 2015). En contraste, la resistencia de los fármacos en los tumores se debe principalmente a la resistencia adquirida, la cual les permite modificar su metabolismo para evitar y/o facilitar la eliminación de los fármacos, y así reducir su acumulación intracelular (Chu, 2015). En consecuencia, se emplea la terapia combinada con dos o más agentes terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. La combinación de terapias mejora la eficacia en comparación con la monoterapia ya que actúan de manera sinérgica para disminuir la prevalencia del cáncer. Esta estrategia reduce la resistencia a los medicamentos y permite el uso de dosis más bajas de agentes quimioterapéuticos que previene la toxicidad asociada (Mokhtari et al., 2017).

Los enfoques para el tratamiento del cáncer es el uso de fármacos que bloquean o inhiben los procesos involucradas con la supervivencia celular, ya sean específicos o inespecíficos del ciclo celular (Chu, 2015). Las terapias basadas en antagonistas de nAChR en combinación con quimioterapias convencionales presentan un enfoque prometedor, especialmente en tumores que sobreexpresan nAChR (Osipov et al., 2020). Los antagonistas de los nAChR son de particular interés, ya que inhiben la unión de la nicotina y otros agonistas, reduciendo sus efectos y mitigando los mecanismos de progresión tumoral (Bele et al., 2023). Entre los inhibidores naturales de los nAChR, se encuentran compuestos derivados de plantas y toxinas animales. Sin embargo, el estudio del veneno en animales ha resaltado debido a la diversidad de proteínas y péptidos que actúan de manera antagónica sobre los nAChR. Entre las toxinas animales más destacadas se encuentran las  $\alpha$ -neurotoxinas presentes en el veneno de serpientes y las  $\alpha$ -conotoxinas derivadas del veneno de caracoles marinos (Kasheverov et al., 2022; Bele et al., 2023).

Las  $\alpha$ -conotoxinas presentan una ventaja con respecto a las  $\alpha$ -neurotoxinas debido a que son péptidos pequeños, generalmente de 12 a 19 aminoácidos de longitud (Azam y McIntosh, 2009), mientras que las  $\alpha$ -neurotoxinas están compuestas por 60 a 75 aminoácidos (Nys et al., 2022). Además, las  $\alpha$ -conotoxinas proporcionan la mayor diversidad de péptidos, con estimaciones de que existen un millón de conotoxinas bioactivas diferentes, con una selectividad y especificidad superior para diversas subunidades de nAChR. Es por ello que persiste el estudio sobre  $\alpha$ -conotoxinas para el desarrollo de posibles fármacos peptídicos (Dutertre et al., 2017; Jin et al., 2019).

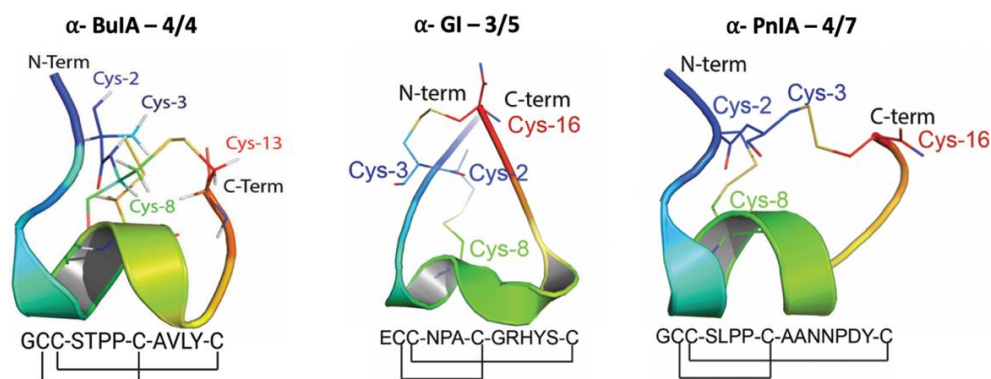
#### **1.1.4. $\alpha$ -conotoxinas**

##### **1.1.4.1 Características y clasificación**

Las  $\alpha$ -conotoxinas se sintetizan a partir de la traducción de precursores propéptidos codificados por un mRNA, con una longitud de alrededor de 70-120 aminoácidos. Esta secuencia se divide en una secuencia señal en la región N-terminal (altamente conservado), una región pro intermedia (sitio de unión) y la toxina madura en la región C-terminal (hipervariable) (Olivera y Cruz, 2001; Phuong y Mahardika, 2018). La obtención de la toxina madura involucra la escisión de las regiones N- y C-terminal, así como la formación de modificaciones postraduccionales que proporcionan estabilidad tridimensional a la proteína (Blass, 2015; Kumar et al., 2015).

Existen un total de 29 superfamilias de conotoxinas que se clasifican con base en i) la secuencia señal de los precursores que determina la superfamilia de genes, ii) su patrón de cisteínas y iii) su actividad farmacológica. Dentro de la clasificación de las superfamilias, se identifican cinco superfamilias que incluyen a la familia farmacológica  $\alpha$  (A, D, J, L y M) que actúan como antagonistas sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Muttenthaler et al., 2011; Li et al., 2020). Las conotoxinas sintéticas empleadas también se clasifican en la familia farmacológica  $\alpha$ , pero no es posible clasificarlas dentro de una superfamilia debido a que solo se dispone de la secuencia del péptido maduro, excluyendo la secuencia que incorpora el péptido señal (Pulliandre et al., 2010). No obstante, con base a la similitud que presentan con los patrones de cisteínas de la superfamilia A (CC-C-C) y J (C-C-C-C) y su conectividad (I-III y II-IV), sugieren la posibilidad de que las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas empleadas puedan pertenecer a dichas superfamilias (Robinson y Norton, 2014; Prashanth et al., 2017).

La conectividad del patrón de cisteínas forma una estructura globular característica de las conotoxinas naturales, aunque también pueden presentar conectividades de tipo "ribbon" (I-IV, II-III) y "beads" (I-II, III-IV) en conotoxinas sintéticas (Lebbe et al., 2014). El número de aminoácidos presentes entre el patrón de cisteínas determina la subfamilia de la  $\alpha$ -conotoxina, clasificándose en 3/4, 3/5, 4/3, 4/4, 4/6 o 4/7 (Figura 7). La clasificación de la subfamilia determina la especificidad sobre las subunidades de nAChR, donde 3/4 presenta afinidad hacia receptores  $\alpha$ -homoméricos, 3/5 hacia receptores musculares y 4/3, 4/4, 4/6 y 4/7 hacia receptores neuronales (Kaas et al., 2010; Giribaldi y Dutertre, 2017).



**Figura 7. Representación estructural del patrón globular de cisteínas en  $\alpha$ -conotoxinas.** La  $\alpha$ -BuIA proviene de *Conus bullatus*,  $\alpha$ -GI de *Conus geographus*, y  $\alpha$ -PnIA de *Conus pennaceus* (Modificado de Kaas et al., 2010).

#### 1.1.4.2. $\alpha$ -conotoxinas como antagonistas de los receptores nicotínicos (nAChR)

Las  $\alpha$ -conotoxinas exhiben una afinidad hacia los nAChR y tienen la capacidad de distinguir entre los receptores musculares y diversos subtipos de receptores neuronales basada en la subdivisión adicional de distintas subfamilias estructurales  $m/n$  (3/5, 4/3, 4/4, 4/5, 4/6 y 4/7). Las subfamilias presentan residuos conservados de serina (S) y prolina (P) en el primer bucle ( $m$ ), mientras que en el segundo bucle ( $n$ ) existe una variación de secuencia que proporciona la selectividad hacia los subtipos de nAChR (Akondi et al., 2014). El residuo de prolina (P) en el bucle  $m$  es particularmente crucial porque es el responsable de inducir el motivo de giro helicoidal que orienta los residuos expuestos hacia el sitio de unión de los nAChR. Las sustituciones de prolina (P) por otro aminoácido resulta en la pérdida de actividad sobre los nAChR (Terlau y Olivera, 2004; Kang et al., 2007).

Los aminoácidos conservados desempeñan un papel determinante en la unión receptor-conotoxina. Sin embargo, además de los residuos conservados en las  $\alpha$ -conotoxinas, existen otras características bioquímicas que influyen en la afinidad de unión a los nAChR y se encuentran determinadas por las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas de las mismas (Turner et al., 2019). En los nAChR musculares se han identificado que los aminoácidos serina (S), arginina (R) y tirosina (Y) estabilizan la interacción entre ambos complejos (Quiram et al., 2000). En los nAChR neuronales, existen múltiples aminoácidos involucrados en la unión de los receptores, y la afinidad hacia las  $\alpha$ -conotoxinas está influenciada por la combinación específica de las subunidades que conforman el receptor nAChR. Aunque existen receptores  $\alpha$ -homoméricos como  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$ , son poco comunes, y la mayoría de los nAChR están formados por una combinación pentamérica de doce subunidades  $(\alpha)_2(\beta)_3$  y  $(\alpha)_3(\beta)_2$ . La diversidad de las múltiples combinaciones que pueden asumir las subunidades de nAChR, dificulta la identificación de los aminoácidos responsables de la afinidad en la unión receptor-conotoxina (Nicke et al., 2004; Janes, 2005). Un ejemplo de ello son las secuencias que presentan las  $\alpha$ -conotoxinas Pn1a y Pn1B, en donde solo difieren de un aminoácido en la posición 10, pero la selectividad por el nAChR cambia dramáticamente de  $\alpha 3\beta 2$  a  $\alpha 7$ , respectivamente. En este caso, la preferencia por  $\alpha 7$  está determinado por la leucina (L). No obstante, a pesar de la variabilidad en la afinidad observada según la secuencia, es importante mencionar que la mayoría de las  $\alpha$ -conotoxinas presentan un sitio conservado hidrofóbico y un sitio complementario con carga positiva. Esta configuración proporciona una afinidad hacia los nAChR, considerando que la subunidad  $\alpha$  del receptor es hidrofóbica y el lado complementario tiene carga negativa (Akondi et al., 2014).

#### **1.1.4.3. $\alpha$ -conotoxinas contra el cáncer**

A pesar de la extensa investigación sobre el efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas en células neuronales y musculares, los estudios en células no neuronales, específicamente en el contexto del cáncer, ha sido escasa. Sin embargo, se han identificado que las subunidades reportadas para los subtipos de nAChR en células neuronales coinciden con la selectividad que presentan hacia los subtipos de nAChR expresados en células cancerosas. La sobreexpresión de nAChR es una característica distintiva en diversos tipos de cáncer y se encuentra relacionado con el incremento en la proliferación y los mecanismos de resistencia celular que favorecen la progresión tumoral (Osipov et al., 2020). En consecuencia, la actividad antagonista de diferentes  $\alpha$ -conotoxinas en los nAChR ha sido empleada en diversas líneas de cáncer para evaluar los mecanismos de inhibición tumoral (Tae y Adams, 2023).



En la Tabla 1 se mencionan algunos ejemplos de  $\alpha$ -conotoxinas como ArIB e lml, que corresponden a la subfamilia 4/7 y 4/3 respectivamente, en donde se ha reportado que presentan afinidad por los receptores  $\alpha$ -homoméricos en los receptores neuronales  $\alpha 7$ , así como los subtipos  $\alpha 3\beta 2$ . Un ejemplo adicional es la  $\alpha$ -AulB de la subfamilia 4/6 que se ha demostrado actividad sobre los subtipos  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 4$  en los receptores neuronales (Peng et al., 2010; Armishaw, 2010). Las tres  $\alpha$ -conotoxinas coinciden con la afinidad hacia los subtipos de nAChR reportados en las células no neuronales y se han asociado con la disminución de la proliferación celular en líneas de cáncer de mama y pulmón (Improgo et al., 2013; Mei et al., 2015; Mucchietto et al., 2017).

**Tabla 1. Efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas sobre distintas líneas de cáncer que sobreexpresan nAChR.**

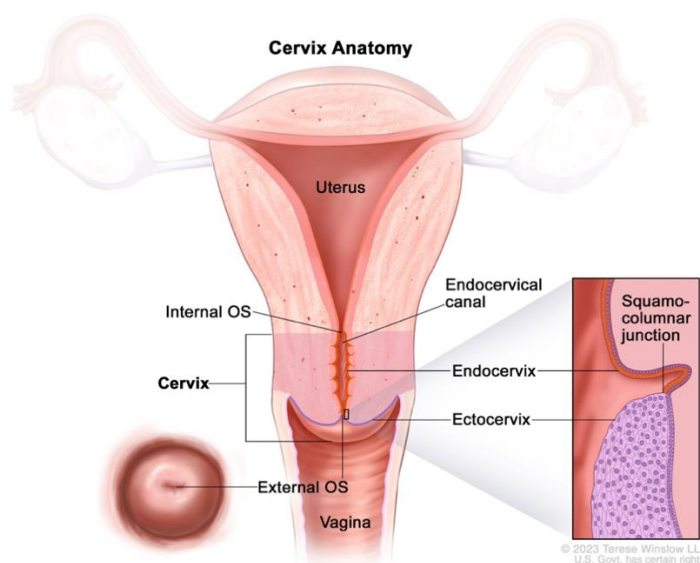
nAChR	$\alpha$ -conotoxina	Especie	Cáncer	Línea celular	Efecto	Referencia
$\alpha 9\alpha 10$	GeXIVA	<i>Conus generalis</i>	Mama	MDA-MB-157	↓ Proliferación ↓ Migración ↑ Apoptosis	Sun et al., 2020
			Cervix	HTB-35 CRL-1550	↓ Proliferación	Liu et al., 2019
$\alpha 3\beta 4$	TxID	<i>Conus textile</i>	Pulmón	A549 NCI-H1299	↓ Proliferación	Qian et al., 2019
			Cervix	HTB-35	↓ Proliferación	Liu et al., 2019
	AulB	<i>Conus aulicus</i>	Pulmón	DMS-53	↓ Viabilidad	Improgo et al., 2013
$\alpha 7$	lml	<i>Conus imperialis</i>	Mama	MCF-7	↓ Proliferación	Mei et al., 2015
	ArIB	<i>Conus arenatus</i>	Pulmón	A549	↓ Proliferación	Mucchietto et al., 2017
N/R	xm1 a, b y c cal 14.1 a, b y c	<i>Conasprella ximenes</i> <i>Californiconus californicus</i>	Páncreas	PANC-1 CAPAN-2 BxPC-3	↓ Proliferación	Escárrega, 2019
	xm1b cal14.1 a y b	<i>Conasprella ximenes</i> y <i>Californiconus californicus</i>	Pulmón	H1299 H1975 H661	↓ Viabilidad ↑ Apoptosis	Oroz et al., 2016

N/R= no reportado, ↓= disminuye, ↑=aumenta.

La acción antagonista de las  $\alpha$ -conotoxinas sobre los receptores de nAChR han mostrado una inhibición en la proliferación y la inducción de apoptosis en el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y cáncer cervicouterino. En este proyecto, se pretende determinar la expresión de las subunidades de los receptores nAChR presentes en el cáncer cervicouterino, con el objetivo de evaluar el efecto regulador de  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas y su uso como posibles blancos moleculares.

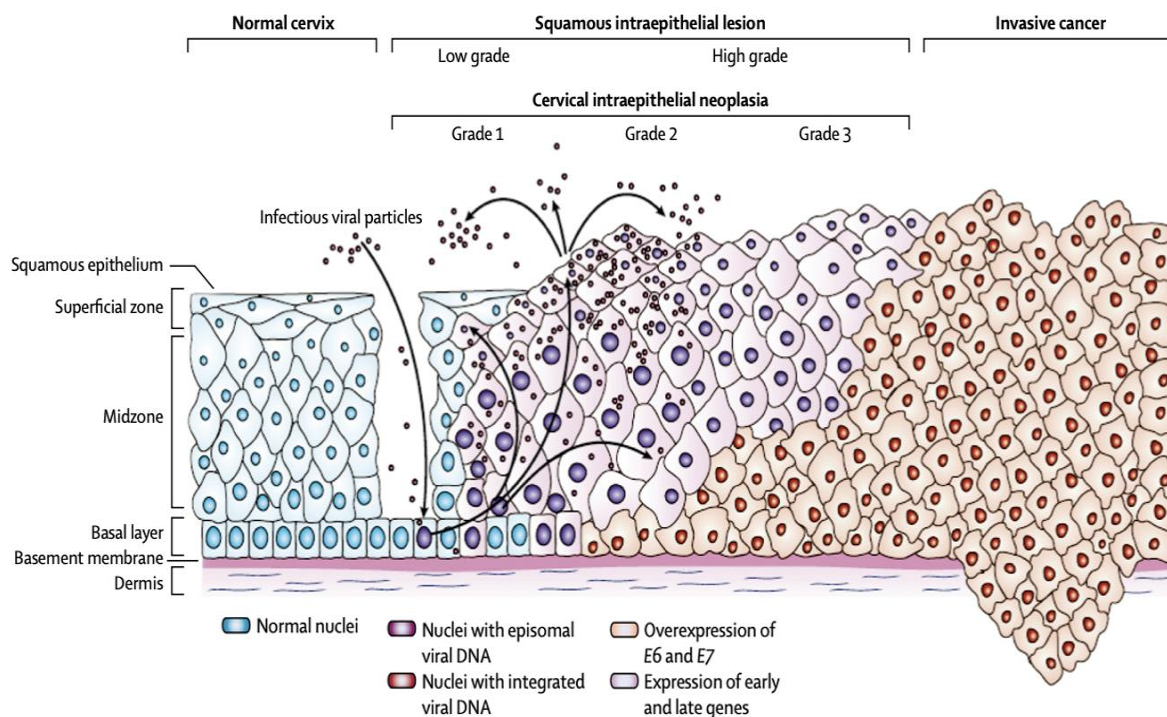
### 1.1.5. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino se origina en el cuello uterino del aparato reproductor femenino, el cual se encuentra ubicado en la parte inferior del útero y en la parte superior de la vagina, y se encarga de conectar a ambos extremos del aparato reproductor mediante el canal endocervical. El canal endocervical se compone de células epiteliales cilíndricas en la parte interior del cuello uterino (endocervix) y de células epiteliales escamosas estratificadas en la parte exterior del cuello uterino (ectocervix). La zona de transición entre los dos tipos de células epiteliales se denomina unión escamocolumnar (Figura 8) (Balasubramaniam et al., 2019).



**Figura 8. Anatomía general del cuello cervicouterino.** El cuello uterino se encuentra en la parte inferior del útero y en la parte superior de la vagina, conectando a ambos extremos por el canal endocervical. El canal endocervical se compone de dos tipos de células epiteliales que componen el endocervix (células cilíndricas) y el ectocervix (células escamosas estratificadas).

Las células epiteliales escamosas estratificadas se subdividen en distintas capas celulares en relación con su proceso de maduración y se clasifican en células basales, parabasales, intermedias y superficiales. A medida que las células maduran, se mueven gradualmente desde la capa basal hacia la superficie epitelial y cambian a su vez su morfología, haciéndose gradualmente más aplanadas, con una reducción del tamaño nuclear pero con un aumento del volumen celular (Walker et al., 2003). La importancia del estudio de las distintas células epiteliales escamosas estratificadas radica en que es el sitio donde ocurre la pérdida de diferenciación celular y el aumento en la proliferación de células anormales que pueden promover el desarrollo del cáncer cervicouterino. Los cambios morfológicos que ocurren en el epitelio cervical se denominan neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y se clasifican en tres grados distintos con base al grado de neoplasia y a la pérdida de diferenciación celular (Figura 9) (Balasubramaniam et al., 2019).

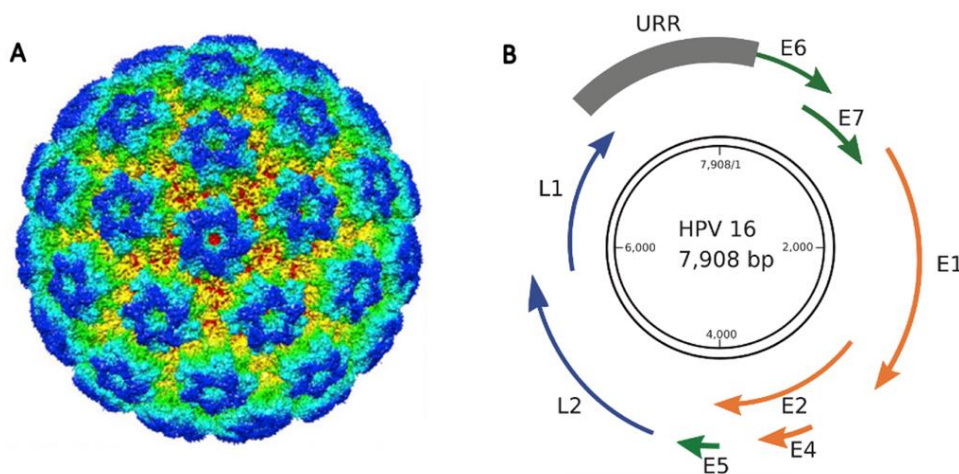


**Figura 9. Esquema de la morfología de las células epiteliales en el cuello uterino.** La distribución y estratificación de las células epiteliales en condiciones normales se observan de color azul. El cambio en la morfología celular inducido por las lesiones causadas por el virus del papiloma humano (HPV) se observan de diversos colores, los cuales se diferencian en el grado de neoplasia (1, 2 o 3), que representa la integración del HPV a las células (color morado); hasta alcanzar la progresión del cáncer que indica la sobreexpresión de proteínas derivadas del HPV involucradas en la progresión del cáncer (color rojo) (Modificado de Cohen et al., 2019).

La CIN de grado 1 (CIN1) es una lesión que ocurre en las células escamosas, donde el tercio inferior del epitelio muestra neoplasia de bajo grado. En el 70-80% de las personas que presentan CIN1, las

lesiones pueden regresar al estado fisiológico normal sin la aplicación de tratamiento, o en caso contrario, pueden permanecer desapercibidas y contribuir a la progresión de neoplasia (Chan et al., 2019). La CIN2 y CIN3 se consideran lesiones con altos niveles de neoplasia, y la principal diferencia entre ambos es el nivel de afectación en las células epiteliales, donde CIN2 afecta dos tercios del epitelio mientras que CIN3 afecta a más de dos tercios del epitelio (Balasubramaniam et al., 2019). Además, la CIN3 se considera un estado en el que las células del cuello uterino tienen el potencial de progresar a cáncer invasivo (Chan et al., 2019).

En la mayoría de los casos, el desarrollo del cáncer cervicouterino es consecuencia de la infección por el virus del papiloma humano (HPV) en el epitelio mucoso. El HPV pertenece a la familia Papillomaviridae y se caracteriza por ser un virus icosaédrico sin envoltura, con ADN circular de doble cadena con un tamaño aproximado de 8,000pb (Figura 10A) (Boda et al., 2018). El genoma de los HPV se compone de tres regiones conservadas: (i) una región reguladora río arriba (URR) que contiene un promotor y un elemento regulador involucrado en la replicación y la transcripción del ADN; (ii) una región temprana que codifica para las proteínas involucradas en la expresión genética del virus, e incluye a las proteínas E1, E2, E4, E5, E6, E7; y (iii) una región tardía que codifica para las proteínas estructurales de la cápside, e incluye a las proteínas L1 y L2 (Figura 10B) (Gheit, 2019).



**Figura 10. Representación esquemática de la morfología y del genoma del virus del papiloma humano (HPV).** A) Superficie del HPV16 (Tomada de Guan et al., 2017). B) ADN de HPV16. En color gris se muestra la región conservada (URR), en color verde y naranja se representan las proteínas de la región temprana, y en color azul se indica la región tardía (Tomada de Bravo y Féliz, 2015).

La infección del HPV inicia con la entrada del virus dentro de las células escamosas del cuello uterino a través de microheridas. El genoma viral se incorpora en el núcleo una vez que las células completan la mitosis, y a partir de la expresión de las proteínas E1, E2 y E4, inicia la replicación del ADN viral.

Posteriormente, las proteínas E5, E6 y E7 promueven la proliferación celular, inhiben los mecanismos de la apoptosis y evitan la detección del sistema inmunológico con la finalidad de amplificar el número de copias virales a miles de copias por célula. Finalmente, las copias virales se autoensamblan en viriones que encapsulan el genoma mediante las proteínas L1 y L2. En la Tabla 2, se proporciona una descripción detallada de las funciones ejecutadas por las proteínas (Bravo y Félez, 2015).

**Tabla 2. Función de los genes y proteínas del virus del papiloma humano (HPV).**

<b>Locus</b>	<b>Función</b>
<b>URR</b>	-Involucrado en la replicación y transcripción del ADN -Controla la expresión genética
<b>E6</b>	-Inmortalización celular por degradación de p53. -Modifica la adhesión, desregula el ciclo celular e inhibe la apoptosis por degradación de TAp63 y p73.
<b>E7</b>	-Desregulación del ciclo celular por degradación de pRB. -Induce inestabilidad cromosómica.
<b>E5</b>	-Induce proliferación celular e inhibe la apoptosis -Disminuye la expresión del MHC
<b>E1</b>	-Actividad de ADN helicasa dependiente de ATP -Replicación del ADN viral
<b>E2</b>	-Replicación del ADN viral y segregación del genoma viral. - Suprime proteínas E6 y E7
<b>E4</b>	- Modifica la estructura del citoesqueleto
<b>L2</b>	-Proteína de la cápside menor -Recluta proteína L1 para el ensamblaje del virus
<b>L1</b>	-Proteína principal de la cápside -Ensamblaje del genoma viral

Color gris= región conservada (URR), color verde y naranja= región temprana, color azul= región tardía.

En el transcurso de la replicación del genoma viral, el HPV induce la acumulación de alteraciones en las vías de señalización de las células del cuello uterino, específicamente mediante la activación de oncogenes y la supresión de genes supresores de tumores (Olusola et al., 2019). Los cambios en el genoma de la célula hospedera y la predisposición del desarrollo de cáncer cervicouterino depende del genotipo del virus, el cual se puede clasificar en alto riesgo o en bajo riesgo con base a su virulencia. Los HPV de alto riesgo corresponden al genotipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, y 59; siendo el HPV 16 y 18 los genotipos más agresivos debido a que causan alrededor del 70% de la incidencia y progresión del cáncer cervicouterino de naturaleza invasiva (Chan et al., 2019).

La progresión de las células epiteliales infectadas por HPV a cáncer invasivo es un proceso que requiere en promedio de 20 años para su desarrollo; y aunque la mayoría de las mujeres sexualmente activas adquieren una infección por HPV, el 90% de las infecciones cervicales son resueltas en 1 o 2 años por el sistema inmunológico de las células hospederas (de Freitas et al., 2012). Sin embargo, en algunos casos, las infecciones se vuelven persistentes y aumentan el riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino. Las infecciones persistentes pueden ser consecuencia de diversos factores, entre los que se incluye el consumo de alcohol, el consumo de tabaco, la predisposición genética y un sistema inmunológico débil (Gheit, 2019).

Existen tres estrategias de prevención contra el desarrollo del cáncer cervicouterino y se pueden clasificar con base a la etapa de infección por el HPV, denominadas prevención primaria, secundaria y terciaria. La prevención primaria implica la disminución de los factores de riesgo que aumentan la predisposición de la enfermedad mediante la educación sexual y campañas de vacunación contra el virus del papiloma humano (HPV) (Cohen et al., 2019). La primera vacuna contra el HPV fue Gardasil (Merck, Pensilvania) en 2006 que protege contra el HPV 6, 11, 16 y 18, mientras que la segunda vacuna llamada Cervarix (Glaxo Smith Klein, Bélgica) autorizada en 2009 protege contra el HPV 16 y 18. La tercera y última vacuna aprobada hasta el momento corresponde a Gardasil 9 en 2014, y previene la infección del HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (Lehtinen et al, 2017). La prevención secundaria incluye el diagnóstico en pacientes asintomáticos y la detección temprana en pacientes sintomáticos de la enfermedad para prevenir el desarrollo del cáncer. El principal método de detección utilizado es la citología cervical o papanicolau debido a su especificidad del 95-99% y por reducir la incidencia de cáncer cervicouterino hasta un 80%. La prevención terciaria pretende disminuir las limitantes causadas por el cáncer (Aggarwal, 2014).

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino se encuentra en la cuarta posición en incidencia y mortalidad en mujeres (Sung et al., 2021). En contraste, en México, este tipo de cáncer es el segundo más común y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, siendo el HPV16 y el HPV18, los responsables del 70% de los casos. A pesar de la implementación del programa de vacunación en 2012, dirigido a niñas de once años que incluye dos dosis de la vacuna tetravalente, la incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino sigue en aumento. Hasta la fecha, aún no se han realizado estudios para evaluar la cobertura de la vacunación y la eficacia de las vacunas contra el virus del papiloma en México (Instituto Nacional de Salud Pública, 2021; Muñoz et al., 2022).

## 1.2 Justificación

La expresión de los nAChR en las células cancerosas inhiben los procesos de apoptosis y promueven las vías de señalización involucradas en procesos de proliferación y angiogénesis. En consecuencia, la investigación de compuestos que actúan como reguladores sobre los receptores nAChR es importante para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Las  $\alpha$ -conotoxinas son candidatas terapéuticas de interés debido a su acción reguladora sobre los nAChR.

## 1.3 Hipótesis

La exposición de  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas sobre las líneas de cáncer cervicouterino (Ca-Ski, SiHa, C-33 A y HeLa) afectarán los mecanismos de división celular, causando una disminución en la viabilidad celular.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1. Objetivo general

Determinar el efecto que inducen las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas en la viabilidad celular sobre cuatro líneas celulares de cáncer cervicouterino (Ca-Ski, SiHa, C-33 A, HeLa).

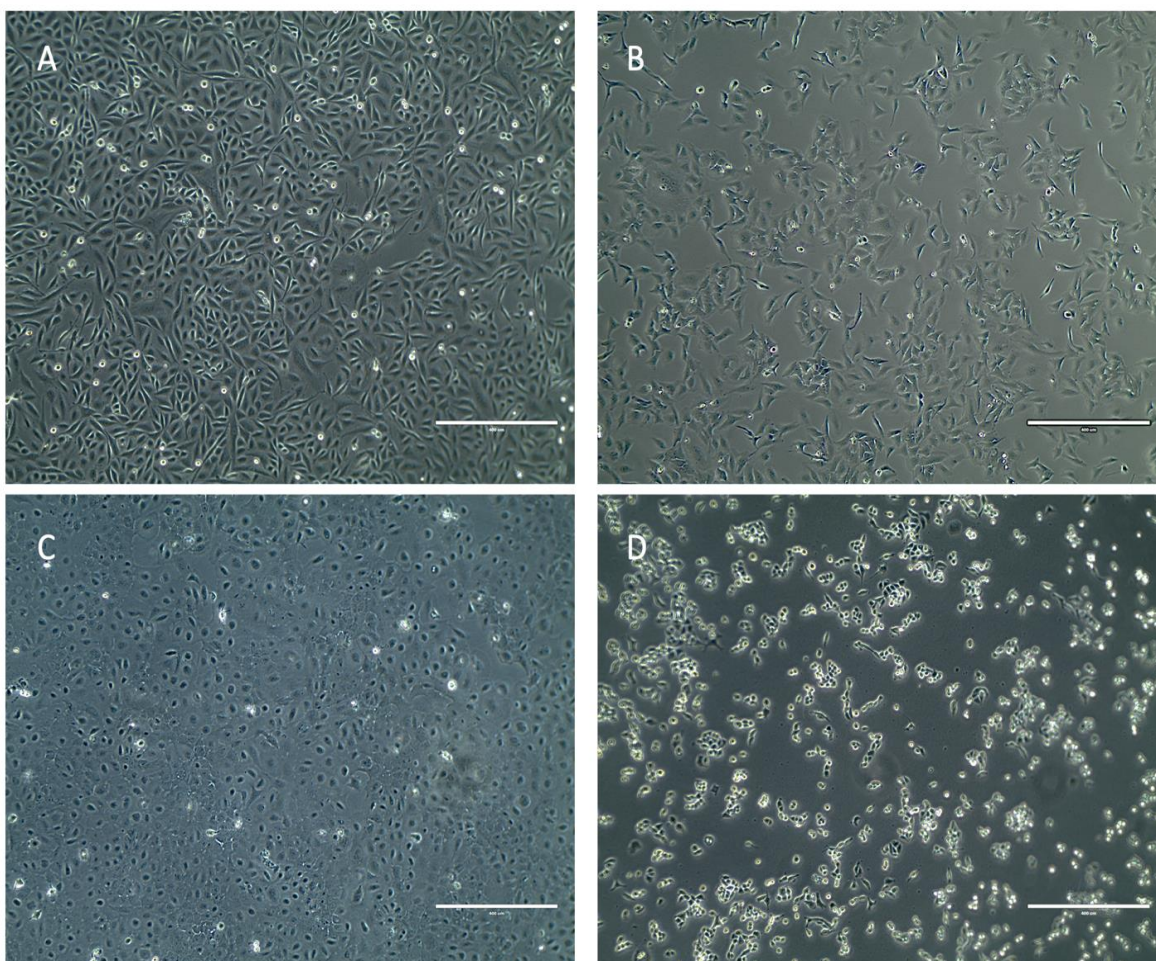
### 1.4.2. Objetivos específicos

1. Identificar la expresión de las subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, SiHa, C-33 A y HeLa.
2. Evaluar el efecto que inducen las  $\alpha$ -conotoxinas sobre las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, SiHa, C-33 A y HeLa.
3. Determinar la vía de señalización de muerte celular que inducen las  $\alpha$ -conotoxinas con efecto modulador en las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, SiHa, C-33 A y HeLa.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1. Cultivo de líneas celulares

Las cuatro líneas celulares de cáncer cervicouterino empleadas se caracterizan por ser células adherentes y por presentar una morfología epitelial (Figura 11). La preparación de cada procedimiento experimental para cada línea celular, tal como se describe a continuación, se realizó dentro de una campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, LABCONCO) utilizando reactivos estériles y materiales previamente desinfectados con etanol al 70%. El volumen final de cada placa de cultivo de 100 mm con medio completo es de 8 mL.



**Figura 11. Morfología de las cuatro líneas celulares de cáncer cervicouterino.** A) SiHa. B) HeLa. C) Ca-Ski. D) C-33A. Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido con un objetivo de 4x y 10x. Las barras blancas en cada imagen representan una escala de tamaño de 400  $\mu\text{m}$ .



### 2.1.1. Medio de cultivo y activación de células

El medio de cultivo para cada línea celular se muestra en la Tabla 3, y fueron suplementados con 1% de antibióticos y antimicóticos (Penicilina 10,000 U/mL, Estreptomina 10 µg/mL y Anfotericina-B 5 µg/mL; Sigma Aldrich) y 10 % suero fetal bovino (Corning) para obtener el medio de cultivo completo.

**Tabla 3. Características de las líneas celulares de cáncer cervicouterino**

Línea celular	Enfermedad	HPV	Características particulares	Medio de cultivo
Ca-Ski (ATCC® CRM-CRL-1550™)	Carcinoma	16	Sin especificar	RPMI
SiHa (ATCC® HTB-35™)	Carcinoma de células escamosas	16	Expresión p53+ y pRB+	EMEM
C-33A (ATCC® HTB-31™)	Carcinoma	Negativo	Expresión de p53+ elevada. Mutación puntual en el codón 273 (Arg->Cys)	EMEM
HeLa (ATCC® CCL-2™)	Adenocarcinoma	18	Sin especificar	EMEM

RPMI= RPMI-1640 Medium, EMEM= Eagle's Minimum Essential Medium

Las líneas celulares se encontraban criopreservadas en crioviales con que contenían un volumen de 1 mL compuestos por 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 95% de medio completo. Para su activación, se procedió a descongelar los crioviales en un baño maría a 37 °C. El contenido del criovial se suspendió en un tubo Corning de 15 mL que contenía 9 mL de solución salina con fosfato (PBS), y después se centrifugó a 150 g durante 5 minutos.

Posteriormente, se eliminó el sobrenadante con una micropipeta y se resuspendió el botón de células en 1 mL de medio completo. El contenido se homogenizó con una micropipeta y se colocó en una placa de cultivo celular de 100 mm previamente adicionada con 7 mL de medio completo. Finalmente, las placas de cultivo celular se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y se monitoreó de manera constante la confluencia celular utilizando un microscopio invertido en 4x (Life Technologies, EVOS).

### 2.1.2. Mantenimiento celular

Para llevar a cabo el mantenimiento celular se removió el medio completo de la placa de cultivo celular mediante una bomba de vacío y una jeringa de succión. Posteriormente, se enjuagó con 6 mL de PBS y se adicionaron 8 mL de medio completo. El mantenimiento celular se realizó tres veces cada semana hasta obtener una confluencia de 80 a 90%.

### 2.1.3. Subcultivo y expansión celular

Para realizar el subcultivo celular se removió el medio completo del cultivo celular y se enjuagó con 6 mL de PBS. Posteriormente, se añadió 1 mL de la enzima tripsina para desprender a las células de la base y se procedió a incubar a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 min. Finalmente, se agregaron 4 mL de medio completo para inactivar la tripsina. A partir del volumen final de 5 mL, se emplearon distintas diluciones dependiendo del crecimiento de cada línea celular.

### 2.1.4. Conteo celular

A partir de los 5 mL de volumen final del medio de cultivo de la sección 2.1.3., se tomó un volumen de 40 µl previamente homogenizado de la placa de cultivo y se transfirió a un tubo de microcentrífuga para realizar el conteo celular. El contenido restante se transfirió a un tubo Corning de 15 mL para su posterior uso (sección 2.1.5). Posteriormente, las células fueron teñidas con azul de tripano (Trypan Blue Stain 0.4 % GIBCO®; dilución en 1:10 de PBS 1X). Se agregaron 20 µl de muestra en cada pozo de la cámara de Neubauer y se procedió a contar las células dispuestas en los cuadrantes. El número de células se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

### 2.1.5. Criopreservación

La suspensión celular restante de la sección 2.1.4 se centrifugó a 150 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento resultante se resuspendió y se homogenizó en 1 mL con 5% de DMSO y

95% de medio completo. Posteriormente, el contenido se transfirió a un crioval y se colocó en el recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Scientific™) para su almacenamiento a -80 °C.

## **2.2. Identificación de la expresión génica de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)**

### **2.2.1. Extracción de ARN**

Se empleó el kit y protocolo de TRIzol™ Reagent (Invitrogen) para realizar la extracción de ARN celular. El procedimiento se realizó a temperatura ambiente (24 °C), utilizando materiales previamente esterilizados y superficies desinfectadas con etanol al 70% y con RNAsa away. Posteriormente, se procedió a eliminar el medio de cultivo de la placa de 12 pocillos y se realizó un lavado con PBS, el cual después se retiró para añadir 1 mL de TRIzol™ por cada 10 cm<sup>2</sup> de superficie.

El contenido de los pozos se homogenizó, se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añadió 0.2 mL de 1-bromo-3-cloropentano (BCP, 99%, ACROS Organics™) por cada 1 mL de TRIzol™ a cada tubo y se agitó con vórtex durante 30 s. El contenido se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C para obtener la separación del ARN (capa acuosa superior) del ADN y proteínas (capa orgánica inferior). La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, se adicionaron 0.5 mL de isopropanol por cada 1 mL de TRIzol™ y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Subsecuentemente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C y se decantó el isopropanol. El contenido del tubo se resuspendió en 1 mL de etanol al 75% por cada 1 mL de TRIzol™, después se agitó con vórtex durante 30 s y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C. Finalmente, se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente y el ARN se resuspendió en 20 µl de agua estéril previamente tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC ≥ 97 %, Sigma Aldrich) al 0.1 % para inactivar las RNAsas.

A partir del volumen final, se realizó una dilución 1:5 y se determinó la pureza y concentración de ARN mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) a una absorbancia de A260/A280 nm. La integridad del ARN se visualizó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% durante cuarenta minutos con una tensión de 100 V. Las muestras de ARN con una relación de A260/A280 ≥ 1.9 y ≤ 2.0 se utilizaron para la síntesis de ADN complementario (ADNc).

### 2.2.2. Retrotranscripción

Se empleó el protocolo de SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, número de catálogo 18080-400) para realizar la retrotranscripción del ARN. Para ello, en un tubo de 200 µl se mezclaron 0.5 µl de primer dT (50 µM), 0.5 µl de hexámeros aleatorios (50 ng/µL), 1 µl de solución amortiguadora (annealing buffer), n µl de ARN necesarios para obtener una cantidad de 5 µg y n µl de agua libre de Rnasas/Dnasas. Se obtuvo un volumen final de 8 µl. Posteriormente, la muestra se incubó a 65 °C durante 5 minutos, y después se dejó reposar en hielo durante 1 min.

Después de la incubación, se procedió a añadir 10 µl del reactivo 2X first strand MIX (10 mM MgCl<sub>2</sub> y 1mM para cada dNTP) y 2 µl de la enzima SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix para obtener 20 µl de volumen final. La muestra se homogenizó mediante el uso de un mezclador de vórtice y se centrifugó durante 30s para después introducir la muestra al termociclador (Vertiri, Applied Biosystems) para la obtención de ADNc. La primera temperatura de incubación se realizó a 25 °C durante 10 min, para después aumentar la temperatura de reacción a 50 °C por 50 min, seguido de una temperatura de 85°C durante 5min y finalizar con 4°C.

### 2.2.3. Amplificación de ADNc

Se utilizó como referencia el protocolo de GoTaq® DNA polymerase (Promega) para amplificar las distintas subunidades de los receptores nAChR presentes en las líneas celulares. Se emplearon los reactivos mencionados en el protocolo, sin embargo se modificaron las concentraciones y el volumen a utilizar en cada tubo de reacción.

El primer paso consistió en mezclar los reactivos para el número de reacciones a obtener con base al número de cebadores a amplificar. En una reacción (1X), en un microtubo de 600 µl se agregaron 10 µl de buffer 5X green, 6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 nM), 1 µl de dNTPs (2.5 mM cada uno), 30.75 µl de agua libre de nucleasas y 0.25 µl de la enzima GoTaq Flexi, obteniendo un volumen final de 48 µl. En este caso, la concentración a utilizar es de 10X, que corresponde a cada cebador y una reacción adicional; obteniendo un volumen final de 480 µl. En la Tabla 4 se muestran las características de los cebadores utilizados para la reacción de amplificación.

Tabla 4. Cebadores empleados en la identificación de receptores nicotínicos

Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Pb	Genbank ID
$\beta$ -actina	S: GCGAGAAGATGACCCAGATC A: CCAGTGGTACGGCCAGAGG	S: 57.85 A: 62.02	103	NM_001101
$\alpha$ 3-nAChR	S: CTGGTGAAGGTGGATGAAGT A: CTCGCAGCAGTTGTACTIONTGA	S: 57.13 A: 58.22	465	NM_001166694.1
$\alpha$ 4-nAChR	S: GGATGAGAAGAACCAGATGA A: CTCGTACTIONTCTGGTGTGT	S: 56.75 A: 56.50	463	NM_001256573.2
$\alpha$ 5-nAChR	S: TCAACACATAATGCCATGGC A: CCTCACGGACATCATIONTTCC	S: 56.75 A: 56.60	220	NM_000745.4
$\alpha$ 7-nAChR	S: GCCAATGACTCGCAACCACTIONC A: CCAGCGTACATCGATGTAGCA	S: 62.13 A: 60.27	336	NM_000746.6
$\alpha$ 9-nAChR	S: GACTGAGAGCTGCAGAGACG A: AATCTGCAGGGTCACATIONTCA	S: 60.18 A: 57.11	131	NM_017581.3
$\alpha$ 10-nAChR	S: AGCTGTTCCGTGACCTCTTT A: TGTCGATGATCTGGGACAGT	S: 59.24 A: 58.15	111	NM_020402.2
$\beta$ 2-nAChR	S: ATGACCAGAGCGTGAGTGAG A: AAGAGAGGCTGCAGGAACAT	S: 59.47 A: 59.01	121	NM_000748.2
$\beta$ 4-nAChR	S: TGTGCAGGAGGCATIONTAGAAG A: GACGCACACAAACATGAACA	S: 57.59 A: 57.53	145	NM_000750.3

S: sentido; A: antisentido; Pb: pares de bases; Tm: melting temperature (por sus siglas en inglés)

Una vez preparado la mezcla de reacción en el microtubo, se procedió a colocar 48  $\mu$ l a cada tubo de PCR. Después, se adicionó 1  $\mu$ l de los cebadores antisentido (10  $\mu$ M) y 1  $\mu$ l de los cebadores sentido (10  $\mu$ M) a cada tubo, obteniendo un volumen final de 50  $\mu$ l. A partir de los 50  $\mu$ l obtenidos, se dividió el volumen en dos tubos de PCR, con 25  $\mu$ l para el control negativo y 25  $\mu$ l. Una vez dividido el volumen de la mezcla, se adicionó 2  $\mu$ l del ADNc obtenido para el tubo que tendrá la muestra.

Una vez preparadas las muestras se procedió a colocar las muestras en el termociclador (Vertiri, Applied Biosystems) para su incubación. La temperatura inicial de desnaturalización se realizó a 95°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 s, seguido de la disminución a 60 °C por 30 s, hasta alcanzar los 72 °C por 30 s. En el tercer ciclo, se mantuvo la temperatura a 72 °C por 10 min y posteriormente se culminó con un cuarto ciclo a 4 °C. La visualización de la amplificación para cada cebador se visualizó mediante la electroforesis de gel de agarosa al 2% utilizando 10  $\mu$ l de la reacción. Las muestras de ADNc migraron durante cuarenta minutos con una tensión de 100 V.

## **2.3. Ensayos de viabilidad celular**

### **2.3.1. Determinación de la confluencia celular**

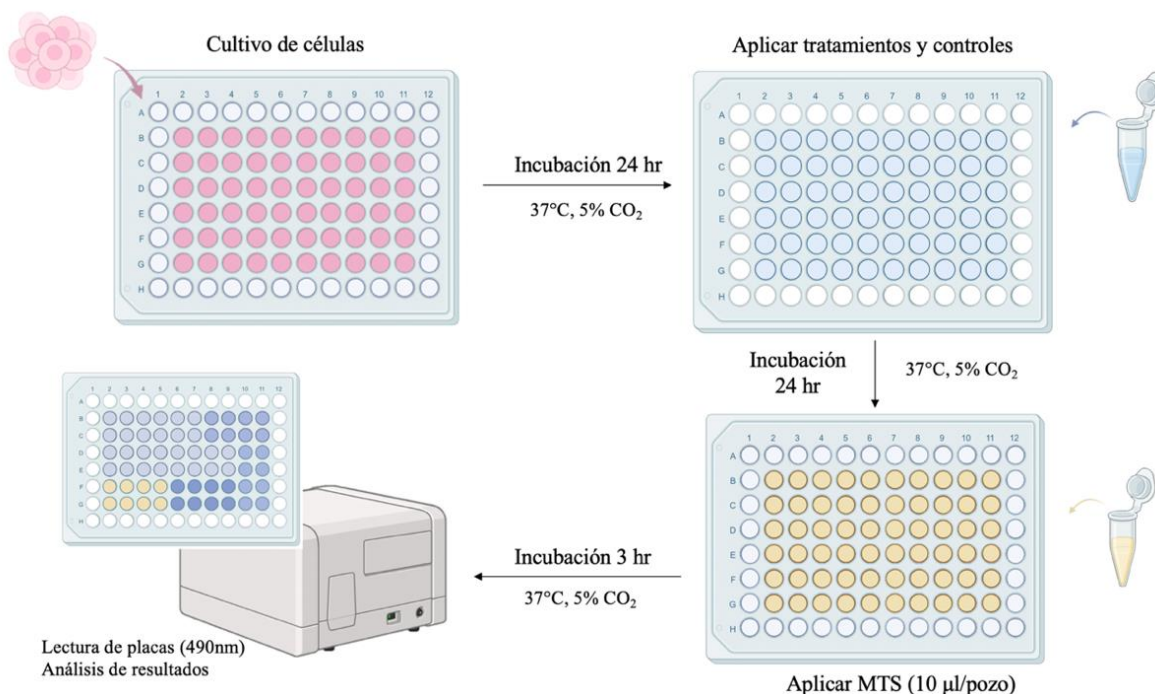
Debido a que la morfología y el tamaño de las líneas celulares SiHa, Hela, C-33A y Ca-Ski presentan diferencias, se realizó un ensayo para determinar la confluencia celular por pozo utilizando una microplaca de 96 pozos. Para ello, se siguió la metodología anteriormente mencionada para realizar el conteo celular (Sección 2.1.4) y comparar la confluencia utilizando 5,000, 7,500 y 10,000 células por pozo en cada línea celular. El ensayo se realizó por triplicado utilizando un volumen final de 100  $\mu$ l por pozo y se utilizó el medio de cultivo específico para cada línea celular como control negativo. Los resultados se observaron después de 24 horas de incubación a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.3.2. Porcentaje de dimetilsulfóxido (DMSO) requerido para reducir la viabilidad celular**

Se seleccionó DMSO (Sigma) como control positivo en cada ensayo de viabilidad celular debido a los efectos citotóxicos que induce en las células. Sin embargo, el porcentaje de DMSO requerido para reducir la viabilidad de manera significativa con respecto al control es diferente para cada línea celular. Por esta razón, se estandarizó el porcentaje de DMSO a utilizar en cada una de las líneas celulares, comparando el efecto de la disminución de la supervivencia celular con 1, 5, 7.5 y 10% (v/v) de DMSO. Para ello, cada línea celular se cultivó en una placa de 96 pozos con el número de células determinado en el apartado de resultados (3.2.1.).

Después de 24 horas de incubación a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, se aplicaron las distintas concentraciones de DMSO a los pozos por triplicado en un volumen final de 100  $\mu$ l por pozo. Se utilizó el cultivo de células sin tratamiento como control negativo y además se agregaron pozos con medio de cultivo para eliminar el fondo de placa. La placa de cultivo se mantuvo en incubación a 37 °C y con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Posteriormente, para determinar la disminución en la viabilidad celular se utilizó el método colorimétrico llamado CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), que utiliza un compuesto de tetrazolio (MTS – color amarillo) que al aplicarse a los pozos con células metabólicamente activas reducen el compuesto a formazán (color morado) mediante la enzima NADPH o NADH deshidrogenasa. La cantidad de formazán es proporcional al número de células viables. Los ensayos se realizaron agregando una proporción 1:10 de MTS en un volumen de 100  $\mu$ l por pozo

directamente a los pozos de la placa celular. Se incubó durante 3 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> para su posterior lectura a una absorbancia de 490 nm. En la Figura 12 se muestra un esquema general de la metodología empleada.



**Figura 12. Esquema general del procedimiento empleado en los ensayos de viabilidad celular.** El ensayo consistió en tres días. El primer día consistió en cultivar el número de células necesarias para obtener una confluencia aproximada del 80% en una placa de 96 pozos. Después de 24 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, se aplicaron los tratamientos y controles seleccionados. Seguido de una segunda incubación durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, se aplicó el compuesto MTS y se mantuvo en incubación durante un período de 3 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizó la lectura a una absorbancia de 490 nm. Se utilizó el cultivo de células sin tratamiento como control negativo y además se agregaron pozos con medio de cultivo para eliminar el fondo de placa. Volumen final de cada pozo: 100µl.

Una vez obtenidos los datos de las absorbancias se procedió a determinar el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \left[ \frac{(ABSTratamiento - ABSFondo \text{ de placa})}{(ABSBlanco - ABSFondo \text{ de placa})} \right] * 100 \quad (2)$$

El fondo de placa hace referencia a los pozos con medio de cultivo, mientras que el blanco se refiere al control negativo que contiene células sin tratamiento.

### 2.3.3. Efecto de las $\alpha$ -conotoxinas en la viabilidad celular

Una vez estandarizado el número de células por pozo y la concentración de DMSO a utilizar, se procedió a determinar el efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas para cada línea celular. En la Tabla 5 se muestran las características generales de las  $\alpha$ -conotoxinas empleadas.

**Tabla 5. Características de las  $\alpha$ -conotoxinas.**

Conotoxina	Secuencia	Masa molecular (g/mol)	Longitud (aa)	Modificación postraduccional	Conectividad
cal14.1b	GDCPPWCVGARCAGKC	1775.1	17	No	Globular 1-3, 2-4
cal14.2c	RDCPPWCPTSHCNAGTC	1844.07	17	No	Globular 1-3, 2-4
cal14b	RQCPPWCSGEPCKRGTC	1904.22	17	No	Globular 1-3, 2-4
xm1b*	XXCCRXXXCXXCX	1519.6	14	Amidación C-terminal	1-3, 2-4
xm1c*	a: XXCCR b: XXXCXXCX	1523.61	14	No	aC1-bC1 aC2-bC2
lm1b	a: GCCS b: DPRCAWRC	1369.63	12	Amidación C-terminal	1-3, 2-4
Vc1.1	GCCSDPRCNYDHPEIC	1807.03	16	Amidación C-terminal	1-3, 2-4
cal14.2b	RECPRCPTSHCNAGTC	1828.07	17	No	Globular 1-3, 2-4
xm1a*	XXCCRXXXCXXCX	1519.60	14	No	1-3, 2-4
xm1d*	a: XXCCRXXX b: CXXCX	1523.61	14	Amidación C-terminal	aC1-bC1 aC2-bC2
lm1	GCCSDPRCAWRC	1355.50	12	Amidación C-terminal	1-3, 2-4
Vc1.1b	a: GCCS b: DPRCNYDHPEIC	1810.65	16	Amidación C-terminal	1-3, 2-4

\*En cumplimiento de los protocolos de confidencialidad, se ha decidido omitir la secuencia completa

En los ensayos iniciales, se empleó una concentración de 50  $\mu$ M para cada conotoxina. El porcentaje de viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico llamado CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) y los resultados de las absorbancias se calcularon con la fórmula (2), como se describe en la sección 2.3.2. A partir de los resultados obtenidos, en los cuales se observó que el efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas era estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), se procedió a realizar una cinética a distintas concentraciones para evaluar la respuesta dosis-respuesta en la línea celular.



### 2.3.3. Análisis estadísticos en los ensayos de viabilidad celular

A partir de los datos obtenidos con la fórmula (1) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una comparación múltiple de Dunnett. El análisis de ANOVA determina si existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las medias de los grupos y el control, sin embargo, no indica que grupos muestran dichas diferencias. Por lo tanto, se utilizó la prueba de Dunnett, que identifica las medias de los grupos con diferencias significativas. Los análisis y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism® (Versión 9.0.1).

### 2.4. Ensayos de muerte celular

Para identificar las vías de señalización de muerte celular, es decir, apoptosis o necrosis, se llevaron a cabo ensayos de microscopía de fluorescencia. La metodología utilizada es similar a la descrita en la Figura 12 en lo que respecta al primer y segundo día, que involucran el cultivo de células y la aplicación de los tratamientos y los controles, respectivamente. Los tratamientos incluyeron a las  $\alpha$ -conotoxinas que disminuyeron de manera significativa el porcentaje de viabilidad celular en los ensayos dosis-respuesta en las líneas de cáncer cervicouterino. Los controles positivos empleados fueron DMSO al 5% (v/v) y el fármaco cisplatino (cis-Diammineplatinum II dichloride, Sigma) a 50  $\mu$ M debido a su capacidad de inducir apoptosis. Se utilizó el cultivo de células sin tratamiento como control negativo y además se agregaron pozos con medio de cultivo para eliminar el fondo de placa. A partir del tercer día, se añadieron los marcadores descritos en la Tabla 6.

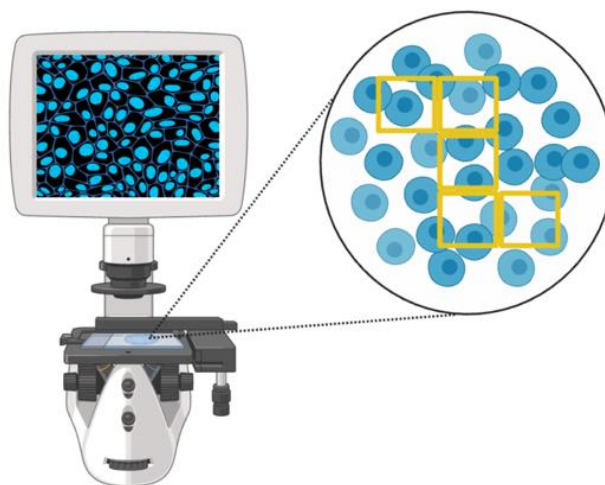
**Tabla 6. Características de los marcadores empleados en los ensayos de muerte celular.**

Marcador	Tinción	Fluorescencia	Interpretación	Emisión/Excitación	Concentración
Hoechst 33342, H1399 (Invitrogen)	ADN, selectivo a bases AT	Azul	Células totales	461/350	1 $\mu$ g/ml
CellEvent™ Caspase-3/7 C10423 (Invitrogen)	ADN, activado por C-3 y C-7* que escinden péptido DEVD	Verde	Apoptosis	530/502	10 $\mu$ M
Yoduro de propidio P4170 (Sigma)	ADN, células con membranas dañadas	Rojo	Necrosis	615/535	2 $\mu$ g/ml

\*C-3\*: caspasa-3, C-7: caspasa-7

Los ensayos se realizaron agregando la concentración de los tres marcadores en un volumen de 100  $\mu$ l por pozo en una placa de 96 y se incubó durante 30 minutos a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> para su posterior

visualización en el microscopio invertido (EVOS FLoid™, Life Technologies). Se capturaron cinco cuadrantes representativos para cada pozo, como se muestra en la Figura 13 para su posterior análisis.



**Figura 13. Imagen representativa de la orientación de los cuadrantes.** Los cuadrantes se capturaron para cada pozo utilizando los marcadores de tinción de la viabilidad celular que incluyen a Hoechst, Caspase e IP.

#### 2.4.1. Análisis estadístico en ensayos de microscopía de fluorescencia

A partir de las imágenes capturadas en el microscopio invertido, se registraron las células positivas para cada uno de los marcadores mediante el programa ImageJ (Fiji 2.14.0/1.54f). En la sección “analyze” se seleccionó la opción “set measurements” y se seleccionaron los parámetros “area, mean grey value and display label”. Posteriormente, se analizaron en conjunto las imágenes obtenidas de los cuadrantes para cada marcador en la sección “process”, seguido por la opción de “batch” y “measure” para obtener los promedios de cada imagen y determinar el porcentaje de activación celular. Una vez obtenidos los datos se procedió a calcular la media y la desviación estándar de cada pozo mediante (3) siguientes fórmulas:

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

$$\% \text{ de células positivas a caspasas 3/7} = \left( \frac{\text{células positivas a caspasas 3/7}}{\text{células positivas a Hoechst}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Las fórmulas se determinaron con base a las células marcadas con Hoechst que representan el total de células. Los resultados se graficaron en el programa GraphPad Prism® (Versión 9.0.1).

## Capítulo 3. Resultados

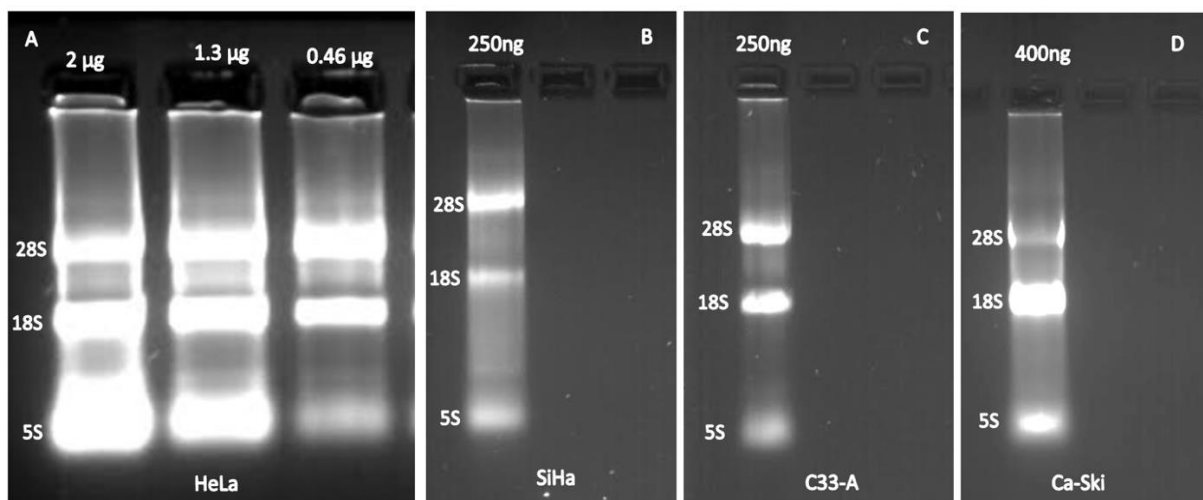
### 3.1. Determinación de la expresión de las subunidades de nAChR *in vitro*

La cantidad obtenida de ARN total para cada línea celular se especifica en la Tabla 7.

**Tabla 7. Cantidad de ARN total de cada línea celular de cáncer cervicouterino.** Los datos se obtuvieron mediante un espectrofotómetro a una absorbancia de A260/A280 nm.

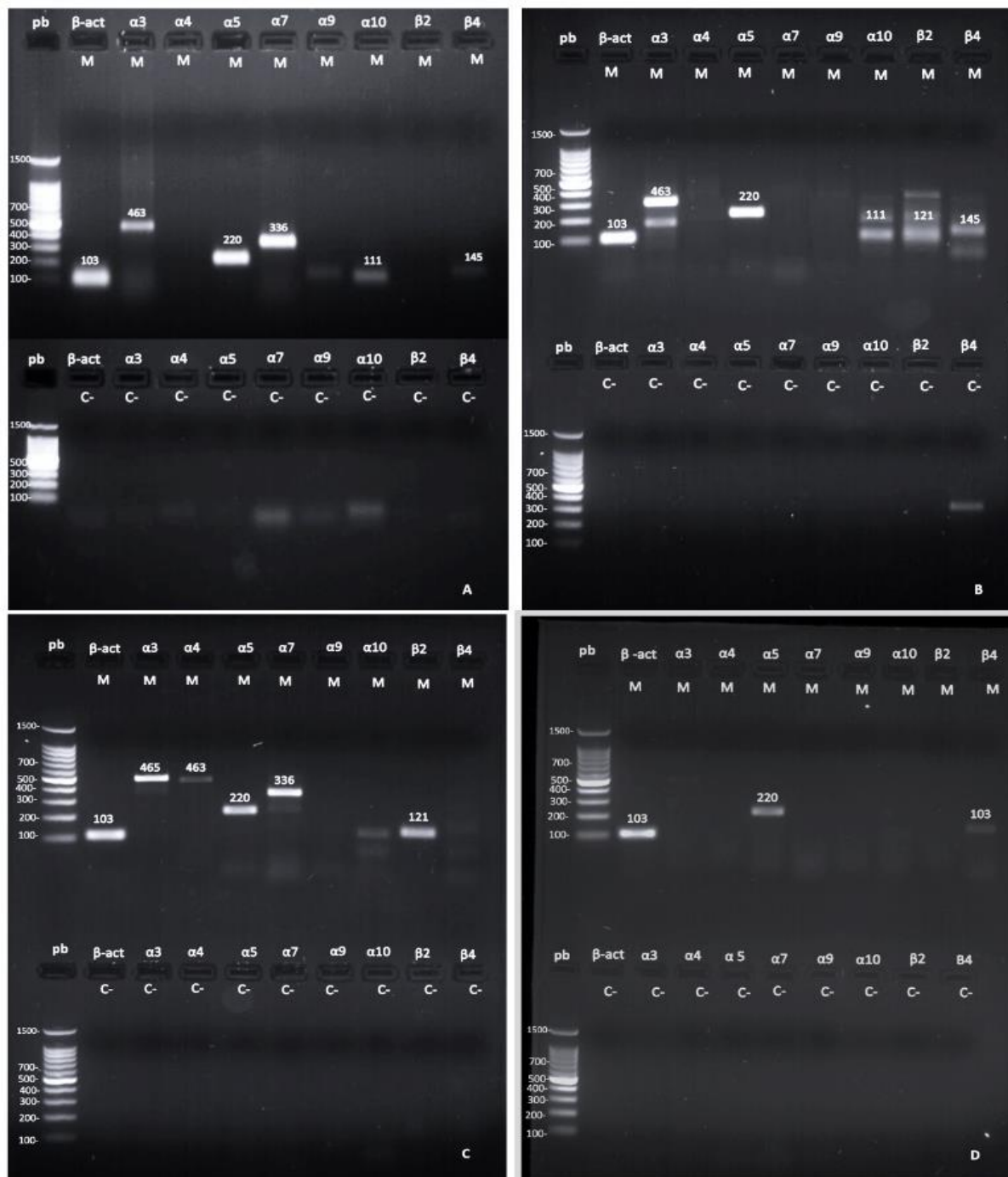
Línea celular	Número de células	Relación A260/280	Cantidad ARN total (ng)
HeLa	$3.8 \times 10^6$	1.95	2,277
SiHa	$1.1 \times 10^6$	1.95	2,760
C-33A	$4.4 \times 10^6$	1.97	9,267
Ca-Ski	$3.7 \times 10^6$	1.95	2,620

A partir de los datos obtenidos se procedió a visualizar la integridad del ARN ribosomal (Figura 14). En el inciso A, que corresponde a la línea celular HeLa, se emplearon distintas cantidades de ARN con el objetivo de determinar la cantidad mínima necesaria para observar las tres subunidades (5S, 18S y 28S) que componen al ARN ribosomal. Con base a la intensidad obtenida del ARN para la línea celular HeLa, se determinó utilizar  $\leq 400$  ng para visualizar la integridad del ARN del resto de las líneas celulares (SiHa, C-33A y Ca-Ski).



**Figura 14. Integridad del ARN ribosomal de cada línea celular de cáncer cervicouterino.** La integridad del ARN se visualizó mediante la electroforesis de gel de agarosa al 1.5%. Las muestras durante un período de cuarenta minutos con una tensión de cien voltios.

Una vez confirmada la integridad del ARN se procedió a realizar la retrotranscripción para obtener el ADNc (ADN complementario). Posteriormente, el ADNc se utilizó para identificar los receptores nicotínicos de acetilcolina a partir de la amplificación de los cebadores mostrados en la Tabla 4. Los resultados de la amplificación cada línea celular se observan en la Figura 15.



**Figura 15. Amplificación de los los receptores nicotínicos de acetilcolina para cada línea celular de cáncer cervicouterino. A) HeLa. B) SiHa. C) C-33A. D) Ca-Ski.** La amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando 10  $\mu$ l de reacción. Las muestras (M) y los controles negativos (C-) migraron a través del gel durante un período de cuarenta minutos con una tensión de 100 V.

La amplificación de las bandas obtenidas se consideraron como válidas si se observaban claramente definidas y si su tamaño molecular coincidía con el valor reportado en la base de datos (Tabla 4). Es importante destacar que, en algunos casos, como se muestra en la Figura 15B se observa la amplificación de regiones inespecíficas y la presencia de una banda que corresponde al peso molecular esperado. Además, en la Figura 15C, aunque las bandas estaban definidas, los tamaños moleculares no coincidían con los esperados. No obstante, se consideraron como amplificaciones válidas, ya que se consideró que solo necesitaban un tiempo de migración más prolongado en el gel de agarosa.

Los resultados de la amplificación muestran que las cuatro líneas celulares empleadas comparten la subunidad  $\alpha 5$ . En contraste, se observó que en la línea HeLa estaba presente de manera exclusiva la subunidad  $\alpha 9$ ; de la misma manera que la subunidad  $\alpha 4$  estaba presente solo en la línea C-33A. En la Tabla 8 se muestra la comparación entre la ausencia o la presencia de las subunidades de los receptores nAChR de las cuatro líneas celulares con base a los resultados de amplificación.

**Tabla 8. Comparación de las subunidades de receptores nAChR en las células de cáncer cervicouterino.**

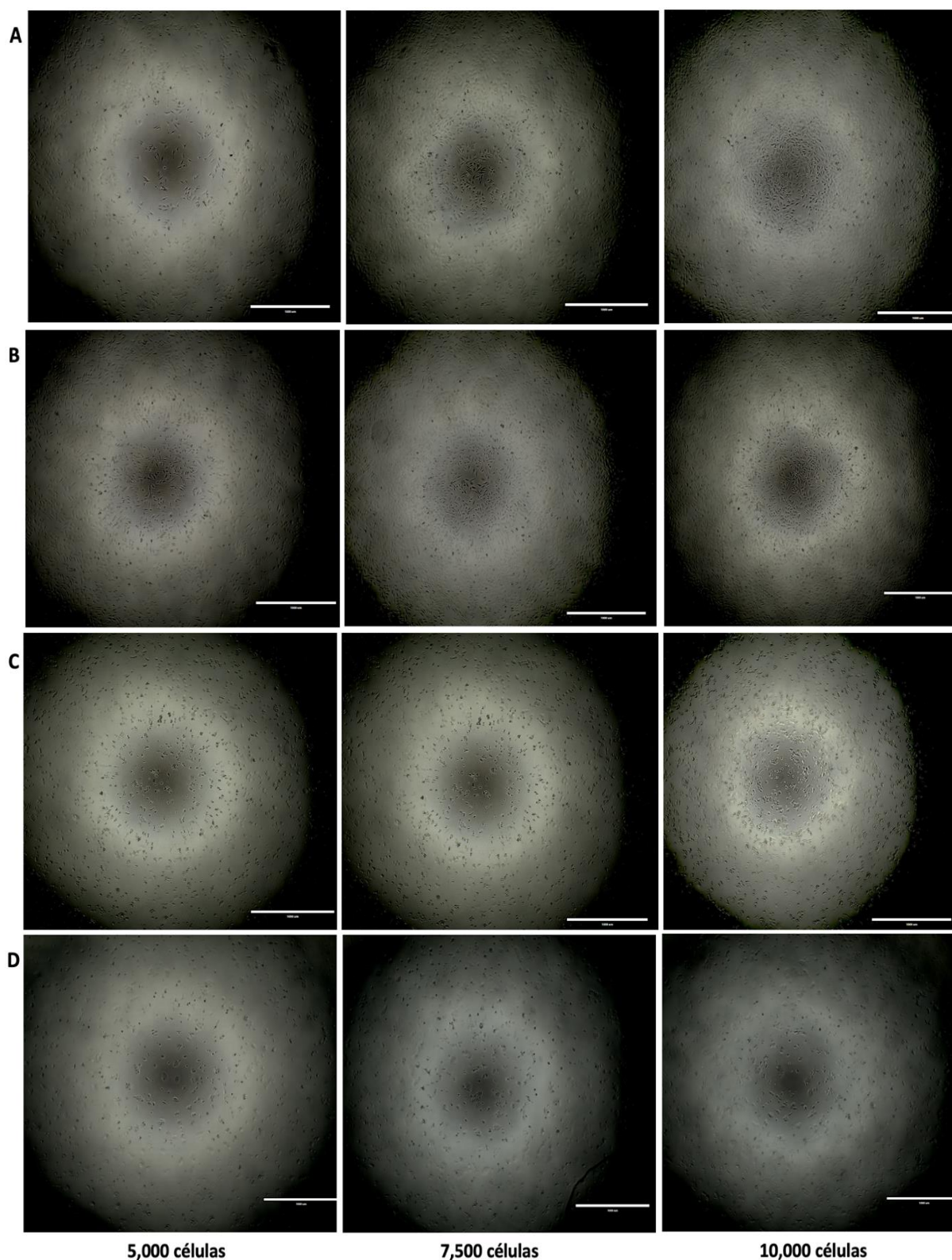
	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 7$	$\alpha 9$	$\alpha 10$	$\beta 2$	$\beta 4$
<b>HeLa</b>	*	-	*	*	*	*	-	*
<b>SiHa</b>	*	-	*	*	-	*	*	*
<b>Ca-Ski</b>	-	-	*	-	-	-	-	*
<b>C-33A</b>	*	*	*	*	-	-	*	-

\*presencia, -ausencia

## 3.2 Ensayos de viabilidad celular

### 3.2.1. Confluencia celular

Una vez confirmada la expresión de los receptores nAChR en las líneas celulares se procedió a realizar ensayos de viabilidad celular empleando distintas  $\alpha$ -conotoxinas. Para ello, se realizaron ensayos de estandarización para establecer la confluencia óptima por pozo para cada línea celular. En la Figura 16 se observan los resultados.

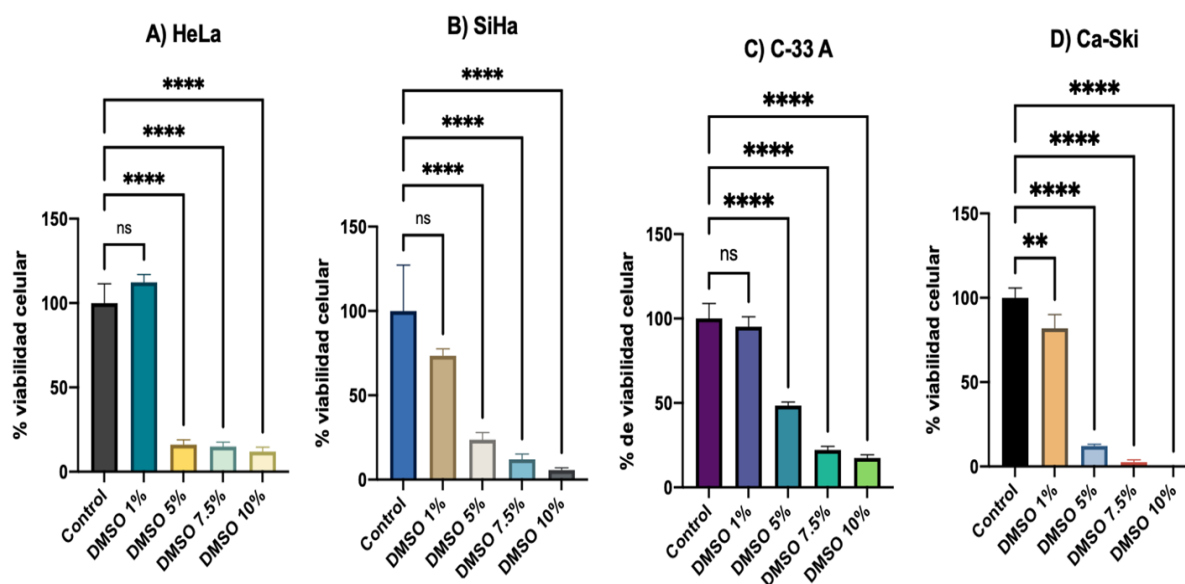


**Figura 16. Confluencia celular.** A) HeLa. B) SiHa. C) C-33A. D) Ca-Ski. Ensayo realizado por triplicado de cada número de células (5000, 7500 y 10000) en una placa de 96 pozos. Las imágenes son representativas de un solo pozo. Las imágenes se adquirieron después de 24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El control negativo es medio completo sin células (figura no presentada). Volumen final de cada pozo: 100µl.

A partir de la confluencia observada en la Figura 16, se determinó el número de células por pozo a utilizar en los ensayos posteriores para cada línea celular, siendo de 5000 células para SiHa, 7500 células para HeLa y Ca-Ski, y 10000 células para C-33A.

### 3.2.2. Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) en la viabilidad celular

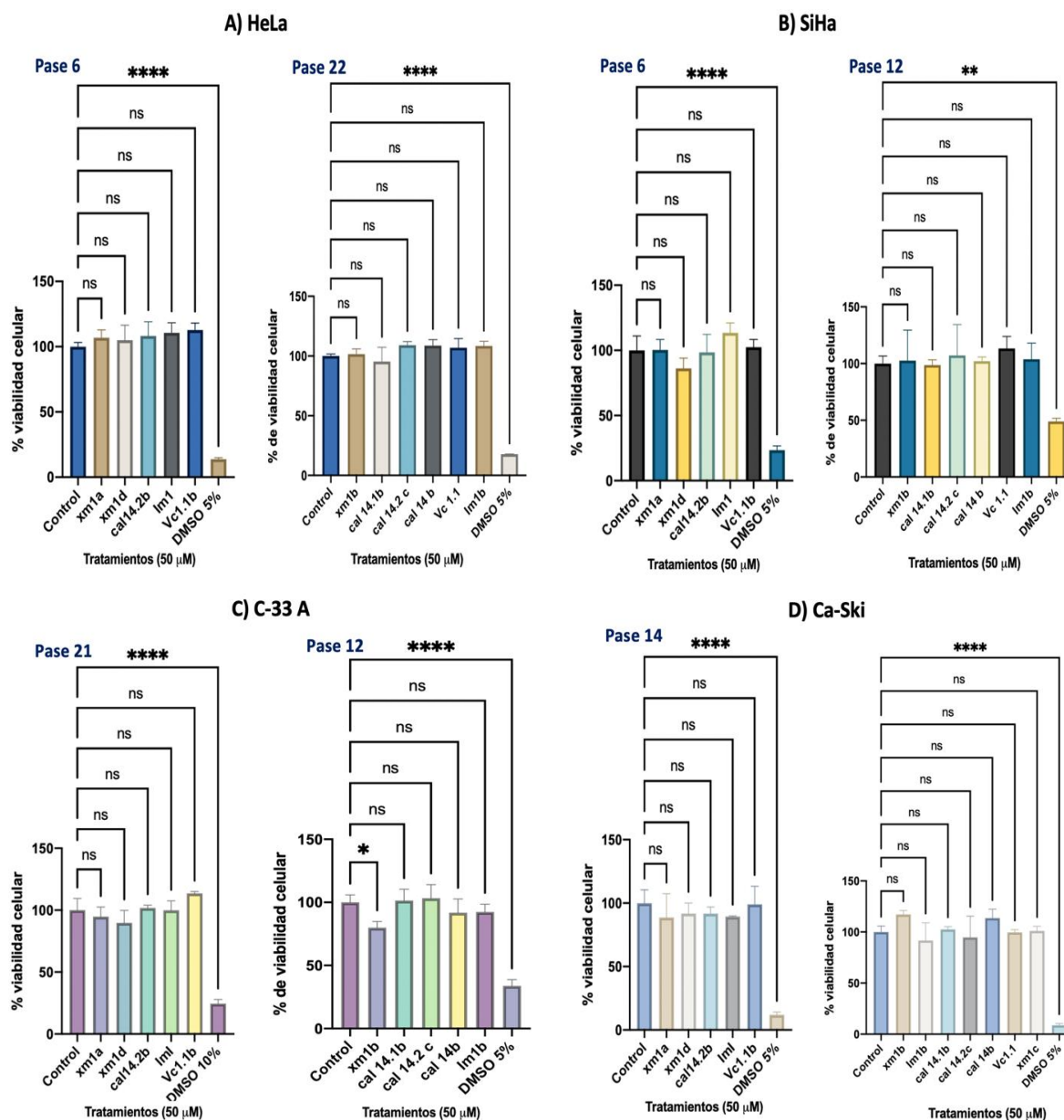
Una vez establecido el número de células por pozo con base a la confluencia, se realizaron ensayos para determinar el porcentaje de DMSO necesario para reducir el porcentaje de viabilidad celular para cada línea celular. Los resultados indican que el DMSO al 1% no presenta un efecto significativo en las líneas celulares HeLa, SiHa y C-33A con respecto al control. Sin embargo, en la línea celular Ca-Ski se observa una disminución del 18% en el porcentaje de viabilidad ( $p=0.002$ ). En contraste, las concentraciones de DMSO del 5%, 7.5% y 10% muestran una disminución significativa ( $p=0.001$ ) con respecto al control para las cuatro líneas celulares (Figura 17). A partir de los resultados obtenidos se decidió utilizar una concentración de 5% de DMSO como control positivo para las cuatro líneas celulares en los ensayos posteriores.



**Figura 17. Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) en la viabilidad celular.** A) HeLa. B) SiHa. C) C-33A. D) Ca-Ski. Las gráficas representan la media $\pm$ SD del porcentaje de viabilidad celular normalizado, mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía seguido de la comparación múltiple de Dunnett. Los resultados significativos se muestran con asteriscos (\*\*\*\*,  $p < 0.05$ ). Se utilizó el cultivo de células sin tratamiento como control negativo. Los resultados fueron normalizados utilizando el control negativo y eliminando el fondo de placa. Los resultados se graficaron en el programa GraphPad Prism® (Versión 9.0.1).

### 3.2.3. Efecto de las $\alpha$ -conotoxinas en la viabilidad celular

Una vez recopilados los datos que incluyen la confluencia celular y el porcentaje de DMSO a utilizar como control positivo, se procedió a analizar el efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas en la viabilidad celular de las cuatro líneas de cáncer cervicouterino utilizando una concentración de 50  $\mu$ M (Figura 18).

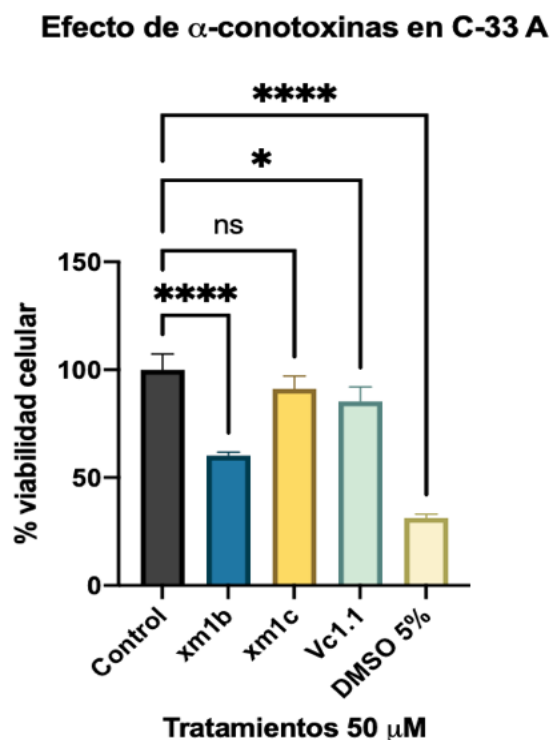


**Figura 18. Efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas en la viabilidad celular.** A) HeLa. B) SiHa. C) C-33A D) Ca-Ski. Las gráficas representan la media  $\pm$ SD del porcentaje de viabilidad celular normalizado, mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía seguido de la comparación múltiple de Dunnett. Los resultados significativos se muestran con asteriscos (\*\*\*\*,  $p < 0.05$ ). Se utilizó el cultivo de células sin tratamiento como control negativo. Los resultados fueron normalizados utilizando el control negativo y eliminando el fondo de placa. Los resultados se graficaron en el programa GraphPad Prism® (Versión 9.0.1).



Las gráficas muestran que para las líneas celulares HeLa, SiHa y Ca-Ski las  $\alpha$ -conotoxinas empleadas no tuvieron un efecto significativo con respecto al control negativo ( $p > 0.05$ ), a diferencia del control positivo que sí mostró un efecto significativo en la disminución en el porcentaje de viabilidad celular ( $p = 0.001$ ). En la línea celular C-33A, en donde la mayoría de las  $\alpha$ -conotoxinas no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control, se observó que la conotoxina xm1b disminuyó el porcentaje de viabilidad celular un 20% ( $p < 0.05$ ) (Figura 18C).

Con base a los resultados obtenidos, se efectuó un segundo ensayo de viabilidad celular para verificar los efectos de la conotoxina xm1b, incorporando las  $\alpha$ -conotoxinas xm1c y Vc1.1, las cuales no habían sido previamente evaluadas en dicha línea celular (Figura 19). Los resultados indican que la conotoxina xm1b disminuyó el porcentaje de viabilidad celular un 40% ( $p = 0.0001$ ), seguida de la conotoxina Vc1.1, que disminuyó la viabilidad celular en un 15% ( $p = 0.0210$ ). En contraste, para la conotoxina xm1c no se observó un efecto significativo con respecto al control negativo ( $p = 0.1898$ ).



**Figura 19. Efecto de  $\alpha$ -conotoxinas en la línea celular C-33A.** La gráfica representa la media  $\pm$  SD del porcentaje de viabilidad celular normalizado, mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía seguido de la comparación múltiple de Dunnett. Los resultados significativos se muestran con asteriscos (\*\*\*\*,  $p < 0.05$ ). Se utilizó el cultivo de células sin tratamiento como control negativo. Los resultados fueron normalizados utilizando el control negativo y eliminando el fondo de placa. Los resultados se graficaron en el programa GraphPad Prism® (Versión 9.0.1).

A partir de los efectos observados de las conotoxinas xm1b y Vc1.1 se procedió a realizar un ensayo utilizando distintas concentraciones para evaluar la dosis-respuesta en la línea celular C-33A. Las concentraciones utilizadas abarcan dos valores superiores y dos valores inferiores a la mitad del logaritmo, tomando como valor de referencia 50  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de los valores obtenidos, se realizaron conversiones a unidades de micromolar ( $\mu\text{M}$ ) utilizando el peso molecular de cada conotoxina como se observa en la Tabla 9.

**Tabla 9. Conversión de unidades para cada conotoxina.**

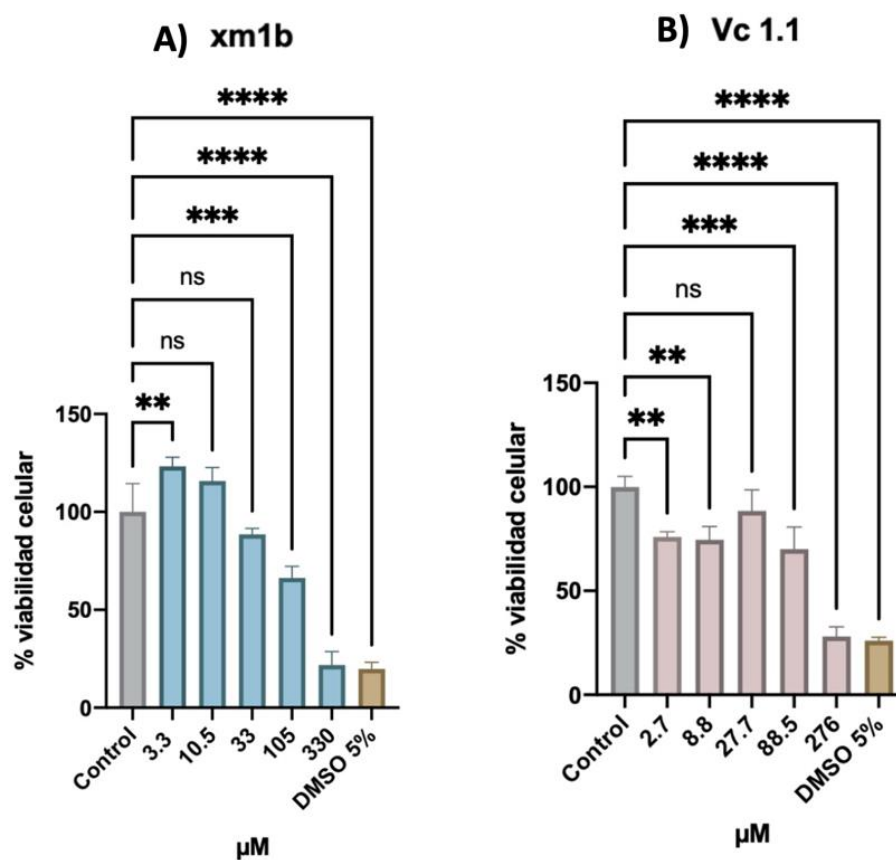
$\mu\text{g/mL}$	xm1b - $\mu\text{M}$ (1519.6 g/mol)	Vc1.1 - $\mu\text{M}$ (1897.03 g/mol)
5	3.3	2.7
16	10.5	8.8
50	33	27.7
160	105	88.5
500	330	276

A partir de las concentraciones calculadas, se realizaron los experimentos de viabilidad celular para cada conotoxina en la línea celular C-33A. Los resultados se muestran en la Figura 20. En las gráficas se puede observar que ambas conotoxinas inducen una disminución de la viabilidad en concentraciones menores tanto como mayores a 50  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 33  $\mu\text{M}$  en xm1b y 27.7  $\mu\text{M}$  en Vc1.1), pero no a la concentración exacta de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

En el caso de la conotoxina xm1b (Figura 20A) se observa un aumento del 23% ( $p=0.0078$ ) en la viabilidad celular a la menor concentración empleada, que corresponde a 3.3  $\mu\text{M}$ . A partir de las dos siguientes concentraciones, que corresponden a 10.5 y 33  $\mu\text{M}$ , el porcentaje de viabilidad disminuye, pero de una manera no significativa en comparación con el grupo control ( $p>0.05$ ). No obstante, se observa que a partir de la concentración de 105 y 330  $\mu\text{M}$ , se incrementa el valor de significancia ( $p=0.0003$  y  $p<0.001$ , respectivamente) y el porcentaje de viabilidad celular disminuye en un 33 y 78%, respectivamente. Además, para la concentración más alta que equivale a 330  $\mu\text{M}$ , el porcentaje de viabilidad celular disminuye de manera similar al control positivo, que disminuye en un 80% la viabilidad celular ( $p<0.001$ ).

En el caso de la conotoxina Vc1.1 (Figura 20B), la reducción de la viabilidad celular experimenta fluctuaciones, donde disminuye o aumenta el porcentaje de viabilidad dependiendo de la

concentración utilizada. A una concentración de 2.7 y 8.8  $\mu\text{M}$  se observa una disminución en la viabilidad celular de 24 y 25% respectivamente, con valores significativos a ambas concentraciones ( $p=0.0028$  y  $p=0.0018$ ). No obstante, a una concentración de 27.7  $\mu\text{M}$  el porcentaje en la disminución en la viabilidad celular solo es de 11.5%, lo que no resulta estadísticamente significativo. A partir de una concentración de 88.5 y 276  $\mu\text{M}$ , disminuye el porcentaje de viabilidad celular en un 30 y 72%, con un aumento en el valor de significancia ( $p=0.0004$  y  $p<0.0001$ ). De forma similar a lo que ocurre con xm1b, se observa que la concentración más alta de la conotoxina, equivalente a 276  $\mu\text{M}$ , disminuye la viabilidad celular similar al control positivo, que disminuye en un 74% la viabilidad celular ( $p<0.001$ ).

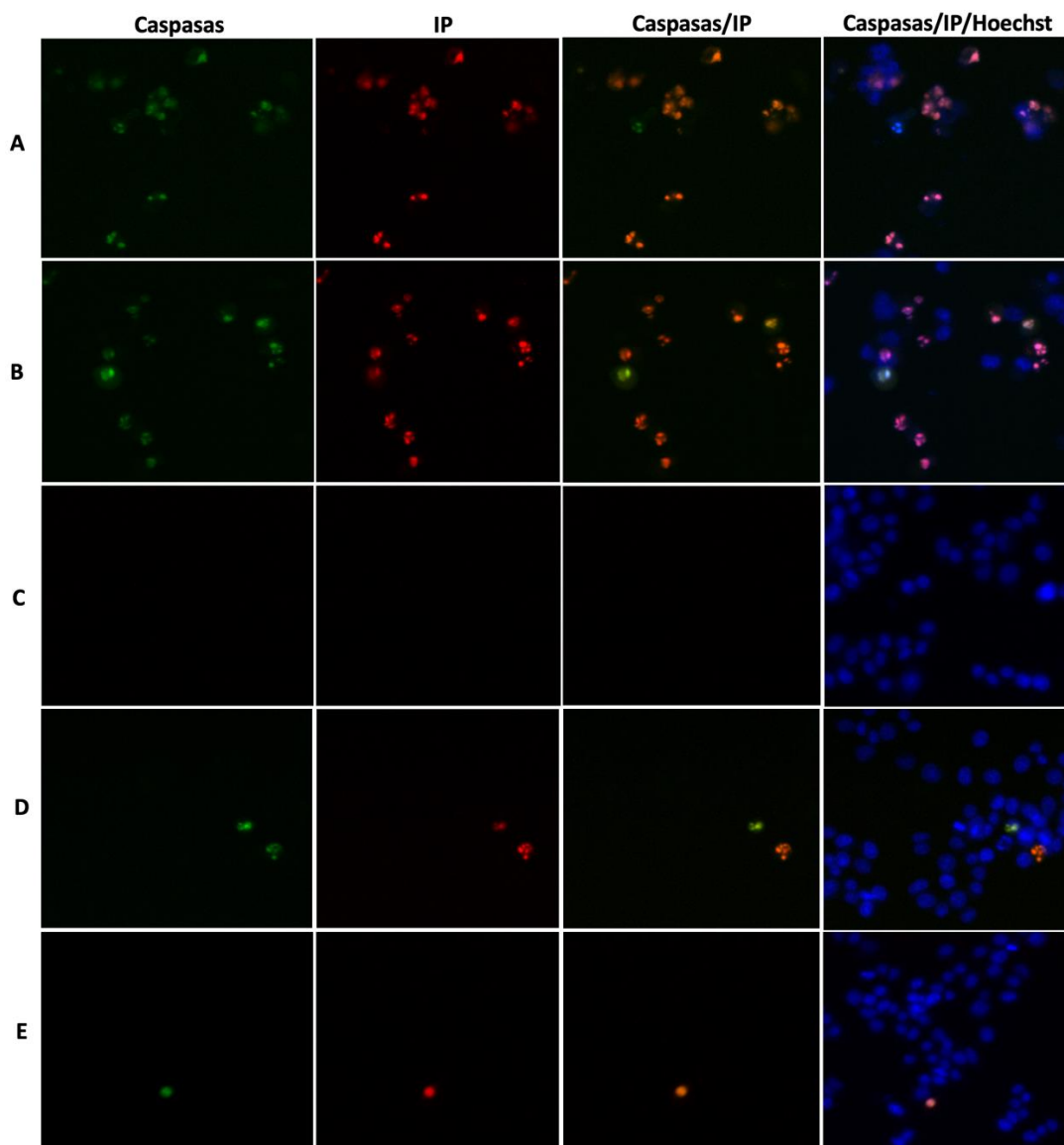


**Figura 20. Efecto en la viabilidad celular de la conotoxina xm1b y Vc1.1 en C-33A.** A) xm1b. B) Vc1.1. La gráfica representa la media $\pm$ SD del del porcentaje de viabilidad celular normalizado mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía seguido de la comparación múltiple de Dunnett. Los resultados significativos se muestran con asteriscos (\*\*\*\*,  $p<0.05$ ). Se utilizó el cultivo de células sin tratamiento como control negativo. Los resultados fueron normalizados utilizando el control negativo y eliminando el fondo de placa. Los resultados se graficaron en el programa GraphPad Prism® (Versión 9.0.1).

### 3.3 Ensayos de muerte celular

Con base a los resultados obtenidos en la Figura 20, se procedió a determinar el tipo de muerte celular que inducen las conotoxinas xm1b y Vc1.1 en la línea celular C-33A. Para ello, se seleccionó únicamente

una concentración de conotoxina, 105  $\mu\text{M}$  para xm1b y 8.8  $\mu\text{M}$  para Vc1.1. La selección de la concentración específica de cada conotoxina se basó en su capacidad para inducir una disminución en el porcentaje de viabilidad celular de manera significativa ( $p < 0.005$ ). Los ensayos se realizaron a las 24 horas después de la exposición a cada conotoxina (Figura 21).



**Figura 21. Ensayo de muerte celular en C-33A.** A) DMSO 5%. B) Cisplatino a 50  $\mu\text{M}$ . C) Control negativo. D) xm1b a 105  $\mu\text{M}$ . E) Vc1.1 a 8.8  $\mu\text{M}$ . Se muestra un cuadrante ampliado representativo para cada tratamiento. Las imágenes se adquirieron después de 24 horas de la exposición a los tratamientos durante la incubación a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  utilizando Hoechst (células totales), Caspase (apoptosis) e IP (necrosis).

En la Figura 21A y 21B se observan los controles positivos empleados, DMSO al 5% y cisplatino a 50  $\mu\text{M}$  respectivamente. En ambos controles se puede observar un mayor número de células positivas a caspasas 3/7 e yoduro de propidio (IP) con respecto a ambas conotoxinas. En promedio, el porcentaje

de células positivas a caspasas con DMSO fue del 25%, que representa una diferencia de -1.97% y de -1.26% con respecto a las conotoxinas Vc1.1 y xm1b. En el caso de las células positivas a IP con DMSO se registró un porcentaje del 12%, en comparación con los valores de -0.21% y 0.12% para Vc1.1 y xm1b. Además, al observar la combinación de los filtros verde y rojo, es posible distinguir que la mayoría de las células son de color naranja, lo que indica la activación de las caspasas 3/7 y la internalización del IP. No obstante, existen células únicamente con fluorescencia de color verde y rojo, lo cual indica que solo son específicas para cada marcador. Con respecto al cisplatino, se registró un porcentaje de células positivas del 27.7% para caspasas 3/7, lo que indica una disminución del 2.6% con respecto a DMSO, y una disminución del 4.62% y 3.91% para las conotoxinas Vc1.1 y xm1b. En el caso del marcador IP, el porcentaje de las células positivas fue del 12.3%, lo que indica una disminución del 0.3% para DMSO, y una disminución del 2.16% y 2.25% para Vc1.1 y xm1b.

En la Figura 21C se muestra el control negativo, donde no se aprecia fluorescencia para caspasas 3/7 e IP en el filtro verde y rojo, respectivamente, así como en su combinación. Esto sugiere que las células no han experimentado muerte celular por apoptosis o necrosis, y esta suposición se puede confirmar debido a la presencia de fluorescencia en el canal azul, lo cual indica viabilidad celular según la contra-tinción de Hoechst. Este resultado sugiere que el ensayo es adecuado para realizar comparaciones con respecto a los controles positivos y las conotoxinas empleadas.

En la Figura 21D y 21E, que corresponde a xm1b y Vc1.1., respectivamente, se puede observar que las células muestran fluorescencia para caspasas 3/7 e IP. La combinación de ambos filtros indica las células de color naranja que son positivas para ambos marcadores. En el caso de la conotoxina xm1b, todas las células positivas para caspasas 3/7 también lo son para IP. No obstante, en Vc1.1 es posible distinguir que no todas las células son positivas a ambos marcadores, ya que existen células únicamente marcadas de color verde, lo cual indica que solo son positivas a caspasas. En particular, en xm1b, se observó un porcentaje del 23.82% de células positivas para caspasas y del 10.12% para IP. Para la conotoxina Vc1.1, el porcentaje de células positivas a caspasas fue del 23.1% del 10.2% para IP.

## Capítulo 4. Discusión

Las secuencias de las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas empleadas se compararon con las  $\alpha$ -conotoxinas mencionadas en la Tabla 1, donde se presentan diversas  $\alpha$ -conotoxinas con función de antagonistas para distintas subunidades de nAChR (Figura 22). El análisis se realizó para inferir la posible afinidad de las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas hacia las subunidades de nAChR expresadas en las cuatro líneas de cáncer cervicouterino. La comparación de secuencias muestra que todas comparten el patrón de cuatro residuos de cisteína dispuestos en CC-C-C y C-C-C-C y los aminoácidos conservados de prolina (P) y serina (S) en el primer bucle. Sin embargo, se observan variaciones en el resto de los aminoácidos entre las secuencias. Específicamente, las  $\alpha$ -cal ubicadas en la posición 1-4 presentan similitudes entre los aminoácidos de las columnas 1, 4, 5, 6, 14 y 18 que corresponden a arginina (R), prolina (P), triptófano (W), glicina (G) y treonina (T). El resto de las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas empleadas que van desde la posición 9-11 tienen aminoácidos conservados en las columnas 2, 9, 10 y 11 que corresponden a glicina (G), aspartato (D), prolina (P) y arginina (R).

Species/Abbrv	1	2	*	4	5	6	*	8	9	10	11	*	12	13	14	15	16	17	18	*	20	21	22
1. cal14.1b	G	D	C	P	P	W	C	V	G	A	R	C	R	A	G	-	-	-	K	C	-	-	-
2. cal14.2c	R	D	C	P	P	W	C	P	T	S	H	C	N	A	G	-	-	-	T	C	-	-	-
3. cal14b	R	Q	C	P	P	W	C	S	G	E	P	C	R	K	G	-	-	-	T	C	-	-	-
4. cal14.2b	R	E	C	P	P	R	C	P	T	S	H	C	N	A	G	-	-	-	T	C	-	-	-
5. Ar1B	D	E	C	-	-	C	S	N	P	A	C	R	L	N	N	P	H	D	C	R	R	R	R
6. Tx1D	-	G	C	-	-	C	S	H	P	V	C	S	A	M	S	P	-	I	C	-	-	-	-
7. Au1B	-	G	C	-	-	C	S	Y	P	P	C	F	A	T	N	P	-	D	C	-	-	-	-
8. Im1	-	G	C	-	-	C	S	D	P	R	C	A	W	R	-	-	-	-	C	-	-	-	-
9. Im1b	-	G	C	-	-	C	S	D	P	R	C	A	W	R	-	-	-	-	C	-	-	-	-
10. Vc1.1b	-	G	C	-	-	C	S	D	P	R	C	N	Y	D	H	P	E	I	C	-	-	-	-
11. Vc1.1	-	G	C	-	-	C	S	D	P	R	C	N	Y	D	H	P	E	I	C	-	-	-	-

**Figura 22. Comparación de secuencias entre  $\alpha$ -conotoxinas.** Las  $\alpha$ -conotoxinas reportadas corresponden a Ar1B (5), Tx1D (6), Au1B (7) e Im1 (8). Las restantes pertenecen a las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas empleadas en el estudio. Los asteriscos (\*) indican residuos conservados en las secuencias. En cumplimiento de los protocolos de confidencialidad, se ha decidido omitir la secuencia de las  $\alpha$ -conotoxinas xm1a, xm1b, xm1c y xm1b en el documento. Los colores son ilustrativos para referencias cada aminoácido. El análisis se obtuvo utilizando el algoritmo MUSCLE con el programa MEGA X (Versión 10.2.6).

Con base a la homología de secuencia y las características de las  $\alpha$ -conotoxinas reportadas en la Tabla 10, se muestra la posible afinidad hacia los nAChR de cada  $\alpha$ -conotoxina sintética empleada. Específicamente, se infiere que las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas pueden exhibir una mayor afinidad sobre los receptores homoméricos  $\alpha 7$  y/o los receptores heteroméricos  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 3\beta 2$  presentes en las líneas

celulares de cervicouterino (Tabla 8). No obstante, ninguna de las doce  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas empleadas presentaron una disminución significativa en la viabilidad celular de HeLa y SiHa, las cuales comparten la expresión de  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  (Figura 18A, B y D). En contraste, la línea celular C-33A, que no expresa  $\beta 4$  pero sí  $\alpha 3$  y  $\beta 2$ , las  $\alpha$ -conotoxinas xm1b y Vc1.1 mostraron un efecto en la disminución de la viabilidad celular (Figura 18C y Figura 19). Sin embargo, la interpretación del efecto observado se complica al considerar que SiHa también comparte la expresión de las mismas subunidades, por lo que no es posible concluir que el efecto observado haya sido por la interacción entre  $\alpha 3$  y/o  $\beta 2$  en C-33A. A pesar de lo anterior, es relevante mencionar que únicamente en la línea celular C-33A se expresa la subunidad  $\alpha 4$  en comparación con las demás líneas celulares que carecen de esta subunidad, sugiriendo así un posible efecto de las  $\alpha$ -conotoxinas xm1b y Vc1.1 hacia dicha subunidad.

**Tabla 10. Inferencia de la afinidad de las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas en los nAChR**

$\alpha$ -conotoxinas	Secuencia	Afinidad nAChR
cal14.1b	GDCPPWCVGARCAGKC	Receptores heteroméricos
cal14.2c	RDCPPWCPTSHCNAGTC	
cal14b	RQCPPWCSGEPCKRGTC	
cal14.2b	RECPPRCPTSHCNAGTC	
xm1b*	XXCCRXXXCXXXCX	Receptores $\alpha$ - homoméricos
xm1c*	XXCCRXXXCXXXCX	
lm1b	GCCSDPRCAWRC	
xm1a*	XXCCRXXXCXXXCX	
xm1d*	XXCCRXXXCXXXCX	
lm1	GCCSDPRCAWRC	
Vc1.1	GCCSDPRCNYDHPEIC	Receptores heteroméricos
Vc1.1b	GCCSDPRCNYDHPEIC	

\*En cumplimiento de los protocolos de confidencialidad, se ha decidido omitir la secuencia completa en el escrito

Al observar únicamente un efecto en la disminución de la viabilidad celular con las conotoxinas xm1b y Vc1.1 en la línea celular C-33A, se compararon sus secuencias para intentar inferir la causa de este efecto en la viabilidad celular con base en sus similitudes o diferencias (Figura 23). En el análisis se observa que Vc1.1 presenta cuatro aminoácidos adicionales en comparación con xm1b. No obstante,

a pesar de contar con más aminoácidos, es importante recordar que a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , xm1b mostró un mayor porcentaje de disminución en la viabilidad celular en comparación con Vc1.1, alcanzando un porcentaje de 40% ( $p=0.0001$ ) y 15% ( $p=0.0210$ ) respectivamente. La disparidad en el porcentaje podría atribuirse distintos factores, entre ellos, la presencia arginina (R) en la posición 5. Esto se debe a que los aminoácidos hidrofóbicos, específicamente los que se encuentran en el bucle *m*, contribuyen a la afinidad de interacción con los nAChR (Lewis et al., 2012). Además, la región N-terminal podría influir en la actividad hacia los nAChR. Se ha reportado que la presencia de aminoácidos en dicha región es indispensable para la actividad sobre receptores específicos, como en el caso de  $\alpha$ -GID para la actividad en el subtipo  $\alpha 4\beta 2$ , pero no en  $\alpha 3\beta 2$  o  $\alpha 7$  (Nicke et al., 2003).

Species/Abbrv	1	2	*	*	5	6	7	8	*	10	11	12	13	14	15	16	*	18
1. xm1b	X	X	C	C	R	X	X	X	C	X	X	X	-	-	-	-	C	X
2. Vc1.1	-	G	C	C	S	D	P	R	C	N	Y	D	H	P	E	I	C	-

**Figura 23. Comparación de secuencias entre xm1b y Vc1.1.** Los asteriscos (\*) indican residuos conservados en las secuencias. En cumplimiento de los protocolos de confidencialidad, se ha decidido omitir la secuencia completa de xm1b. Los colores son ilustrativos para referencias cada aminoácido. El análisis se obtuvo utilizando el algoritmo MUSCLE con el programa MEGA X (Versión 10.2.6).

Además de lo mencionado anteriormente y teniendo en cuenta las características de las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas utilizadas (Tabla 5), a pesar de la similitud en las secuencias entre Vc1.1 y Vc1.1b, así como xm1a, xm1b, xm1c y xm1d, solamente Vc1.1 y xm1b mostraron efectos en C-33A. Las principales diferencias entre los péptidos radican en la fragmentación, las modificaciones postraduccionales y la conectividad que presentan Vc1.1b, xm1c y xm1d. En el caso de xm1a, aunque no está fragmentada, carece de la amidación C-terminal. Esto sugiere que las modificaciones postraduccionales que incluyen la formación y la conectividad de los enlaces disulfuro, así como la amidación C-terminal, son indispensables para la actividad de las  $\alpha$ -conotoxinas Vc1.1 y xm1b.

Se ha reportado que la formación de enlaces disulfuro y la amidación C-terminal se encuentran entre las principales modificaciones postraduccionales presentes en las conotoxinas nativas (Marx et al., 2006; Kaas et al., 2010). Existen otras diez modificaciones, como la hidroxilación de la prolina (P) o lisina (K), la  $\gamma$ -carboxilación del ácido glutámico (E), la glicosilación de la serina (S) o treonina (T), entre otras. No obstante, la función de estas modificaciones aún no se comprende completamente. Sin embargo, se sugiere que contribuyen al plegamiento y estabilización de la conformación



tridimensional de las  $\alpha$ -conotoxinas, aumentando la afinidad sobre los nAChR (Han et al., 2008; Ho et al., 2021). Esto podría sugerir la posible causa del efecto observado de xm1b y Vc1.1 en C-33A en comparación con el resto de las secuencias sintéticas utilizadas.

Es importante considerar que la inferencia sobre la actividad de xm1b y Vc1.1 se basa en la comparación de secuencias con  $\alpha$ -conotoxinas de actividad conocida. A pesar de que este método se utiliza para asignar posibles funciones, la similitud entre los alineamientos no es suficiente para determinar una función (Hannenhalli y Russell, 2000; Sinha et al., 2018). Además, también es importante considerar la heterogeneidad en la expresión de los nAChR entre las líneas celulares de cáncer cervicouterino. Un ejemplo de lo anterior, es que diversos autores que han estudiado las mismas líneas celulares utilizadas en este proyecto, como es el caso de SiHa y Ca-Ski, han identificado la expresión de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Liu et al., 2019; Li et al., 2020). En comparación, en este estudio solo se observa la expresión de  $\alpha 10$  en SiHa. Asimismo, agregando complejidad sobre el estudio de los nAChR, cada receptor heteromérico puede exhibir diferentes estequiometrías, determinadas por la proporción de subunidades  $\alpha:\beta$ , lo que resulta en modificaciones en la afinidad del ligando y su funcionalidad en la respuesta fisiológica (Marks et al., 2010; Mitra et al., 2020).

Entre las subunidades de mayor interés se encuentra  $\alpha 5$ , la cual se encuentra presente en las cuatro líneas de cáncer cervicouterino. Aunque  $\alpha 5$  es considerada una subunidad accesoria, su importancia en el cáncer se destaca debido a que su expresión se encuentra relacionada con la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la migración celular en el 65% de los cánceres, incluyendo el cáncer cervicouterino (Bele et al., 2023). Además, los efectos a nivel celular que induce la presencia de la subunidad  $\alpha 5$ , específicamente sobre las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 4$ , incluyen alteraciones en la potencia y eficacia de los ligandos, así como modificaciones en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  que modulan la señalización de la célula (Scholze y Huck, 2020).

Además de la expresión de las subunidades nAChR, es importante considerar las características distintivas de las líneas celulares. Entre ellas destaca que C-33A presenta un serotipo HPV negativo en comparación con las células Ca-Ski y SiHa, que presentan el serotipo HPV16, y HeLa, que contiene el serotipo HPV18 (Tabla 3). Los serotipos HPV16 y HPV18 expresan los oncogenes E6 y E7 que promueven la degradación de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB, respectivamente (Yin et al., 2017). La degradación de ambas proteínas induce la desregulación del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis que promueven la proliferación de las células cancerosas (Zacapala et al., 2016).

En un principio, se podría explicar que las características derivadas de la integración del genoma viral HPV16 o HPV18 en las tres líneas celulares podría haber afectado la ausencia de actividad de las  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas. Esto se infiere debido a que en condiciones fisiológicas normales, p53 actúa como un inhibidor del crecimiento celular al inducir un arresto del ciclo celular en la fase G1/S o G2. Asimismo, activa la transcripción de genes implicados en la reparación del ADN, e inducen la apoptosis en situaciones de daño celular significativo (Bowlus, 2014; Mahesh et al., 2024). Sin embargo, cuando p53 es degradado por el proteosoma 26S mediante la unión del complejo E6/p53/E6AP (proteína asociada a E6), se produce la desregulación del ciclo celular. En consecuencia, se observa un incremento en la proliferación celular y una mayor resistencia a la apoptosis, lo que conduce a la transformación de células cancerosas (Hadami et al., 2021). No obstante, a pesar de que C-33A es HPV negativo, presenta una elevada expresión de p53 similar a SiHa con HPV16. Lo anterior podría indicar que la actividad antiproliferativa observada en C-33A a partir de la exposición de las  $\alpha$ -conotoxinas xm1b y Vc1.1 es independiente de p53, y posiblemente se encuentre más relacionado con la expresión exclusiva de la subunidad  $\alpha$ 4 en la línea celular C-33A.

La actividad antiproliferativa de xm1b y Vc1.1 parece estar mediada a través de la activación de caspasas, las cuales inducen la muerte celular por apoptosis en C-33A (Figura 21 A y B). Sin embargo, en la Figura 21E, que corresponde al control negativo, se observan células positivas al marcador de caspasas, sugiriendo la posible implicación de un estímulo adicional en el proceso de apoptosis en C-33A, especialmente relacionado con el estrés oxidativo. Esta inferencia se hace debido a que durante los procesos metabólicos normales de las células, aproximadamente del 1% al 4% del oxígeno que participa en la cadena respiratoria genera radicales superóxido, generando un entorno más oxidante que puede modular de manera directa o indirecta la actividad de las caspasas (Kannan y Jain, 2000; Sen y Roy, 2001).

Los ensayos realizados para determinar las vías de señalización de muerte celular se realizaron a distintos tiempos, que corresponden a 3, 6 y 24 horas. Los distintos intervalos de tiempo se tomaron como referencia debido a las variaciones en la duración de la apoptosis. En células *in vitro*, la duración máxima es de 3 horas, mientras que en las células *in vivo*, puede extenderse hasta las 24 horas. Además, el tiempo necesario para que ocurran los cambios morfológicos asociados con la apoptosis, como la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, depende de la duración de la exposición a la toxina y la concentración empleada. En consecuencia del proceso asincrónico, podría originarse un resultado falso negativo si el ensayo se efectúa prematuramente o tardíamente (Saraste y Pulkki, 2000; Elmore, 2007). Por esta razón, se decidió emplear los distintos intervalos de tiempos

mencionados anteriormente. Al llevar a cabo los ensayos para evaluar la activación de los marcadores celulares, en el ensayo de 3 horas de exposición, se registró una fluorescencia menor en los controles positivos en comparación con los ensayos realizados a las 6 y 24 horas de exposición de las  $\alpha$ -conotoxinas (resultados no mostrados). A partir de los resultados obtenidos, se decidió utilizar las imágenes después de 6 horas de exposición a los distintos tratamientos y controles en C-33A.

Los tratamientos con xm1b, Vc1.1 y DMSO mostraron células positivas para ambos marcadores de caspasas 3/7 e IP (Figura 21A-C). Ambos marcadores se utilizan para diferenciar a las células apoptóticas y necróticas a través de las diferencias en la integridad y permeabilidad de la membrana. En la necrosis, se produce la ruptura de la membrana plasmática en las células y, en consecuencia, el contenido intracelular es liberado al medio circundante, desencadenando procesos de inflamación y muerte de las células adyacentes (Liu et al., 2023). En cambio, en la apoptosis, la membrana plasmática mantiene su integridad mediante la formación de cuerpos apoptóticos (Sharma y Dutta, 2023). Sin embargo, las células apoptóticas tempranas pueden convertirse en células apoptóticas tardías, también conocidas como células necróticas secundarias, las cuales experimentan la permeabilización de la membrana (Poon et al., 2010). La disminución de la integridad membranal en las células apoptóticas tardías podría justificar la presencia del doble positivo, ya que el IP tiene la capacidad de atravesar las membranas e intercalarse en el ADN (Rieger et al., 2011).

## Capítulo 5. Conclusión

---

Las 12  $\alpha$ -conotoxinas sintéticas utilizadas no afectaron la viabilidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino SiHa, HeLa y Ca-Ski. No obstante, las  $\alpha$ -conotoxinas xm1b y Vc1.1 disminuyeron la viabilidad en C-33A en un 40% y un 15%, respectivamente, a una concentración de 50  $\mu$ M. El efecto observado podría atribuirse a la presencia exclusiva de la subunidad  $\alpha$ 4 en C-33A, la cual no está presente en ninguna de las otras líneas celulares. Esto sugiere la posibilidad de un efecto específico de las  $\alpha$ -conotoxinas xm1b y Vc1.1 hacia dicha subunidad. Los ensayos de muerte celular por microscopía de fluorescencia indican que ambas  $\alpha$ -conotoxinas promueven la permeabilización del marcador de caspasas 3/7, indicando que el tipo de muerte celular que inducen es la apoptosis. Sin embargo, algunas de las células apoptóticas marcadas con caspasas 3/7 muestran una permeabilización adicional al IP. Esto sugiere que existe una pérdida de la integridad membranal que permite la entrada del IP en las células, convirtiéndolas en células apoptóticas tardías o células necróticas secundarias.

## Literatura citada

- Aggarwal, P. (2014). Cervical cancer: can it be prevented? *World Journal of Oncology*, 5(4), 775-780. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.775>
- 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 Review*, 114(11), 5815-47. <https://doi.org/10.1021/cr400401e>
- Alfarouk, K.O., Stock, CM., Taylor, S. et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International*, 15, 71. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>
- Arias, H.R. (2000). Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochemistry International*, 36(7), 595-645. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(99\)00154-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(99)00154-0)
- Armishaw, C. (2010). Synthetic  $\alpha$ -Conotoxin Mutants as Probes for Studying Nicotinic Acetylcholine Receptors and in the Development of Novel Drug Leads. *Toxins*, 2(6): 1471–1499. <https://doi.org/10.3390/toxins2061471>
- Azam, L., McIntosh, M.J. (2009). Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(6), 771-783. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.47>
- Chu, E. (2018). Cancer Chemotherapy. Katzung, B. (Ed.), *Basic & Clinical Pharmacology* (949-952), Mc. Graw Hill Education.
- Balasubramaniam, S., Balakrishnan, V., Oon, C., Kaur, G. (2019). Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina*, 55(384). <https://doi.org/10.3390/medicina55070384>
- Beckmann, J., Schubert, J., Morhenn, H.G., Grau, V., Schnettler, R., Lips, K.S. (2014). Expression of choline and acetylcholine transporters in synovial tissue and cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cell Tissue Research*, 359(2), 465–477. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2036-0>
- Bele, T., Rurk, T., Križaj, I. (2023). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: Limitations and prospects. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1870(9), 166875. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166875>
- Blass, D., Violette, A., Hulo, N., Lisacek, F., Favreau, P., Stöcklin, R. (2015). Uncovering Intense Protein Diversification in a Cone Snail Venom Gland Using an Integrative Venomics Approach. *Journal of Proteome Research*, 14(2), 628–638. <https://doi.org/10.1021/pr500583u>
- Boda, D., Docea, A., Calina, D., Ilie, M., Caruntu, C., Zurac, S., Neagu, M., Constantin, C., Branisteanu, D., Voiculescu, V., Mamoulakis, C., Tzanakakis, G., Spandidos, D., Drakoulis, N., Tsatskakis, A. (2018). Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). *International Journal of Oncology*, 52, 637-655. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4256>

- Bowlus, C. (2014). p53 Autoantibodies. In: Shoenfeld, Y., Meroni, P., Gershwin (Eds.), *Autoantibodies*, Third Edition, (pp. 289-294). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68545-2>
- Bravo, I., Féllez, M. (2015). Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 32-51. <https://doi.org/10.1093/emph/eov003>
- Cha, J.H., Chan, L.C., Li, C.W., Hsu, J., Hung, M.C. (2019). Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer. *Molecular Cell*, 76(3), 359-370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.030>
- Chan, C., Aimagambetova, G., Ukybassova, T., Kongrtay, K., Azizan, A. (2019). Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives. *Journal of Oncology*, 2019, 3257939. <https://doi.org/10.1155/2019/3257939>
- Chen, J., Cheuk, I., Shin, V., Kwong, A. (2019). Acetylcholine receptors: Key players in cancer development. *Surgical Oncology*, 31, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2019.09.003>
- Chen, X., Duan, N., Zhang, C., Zhang, W. (2016). Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Journal of Cancer*, 7(3), 314–323. <https://doi.org/10.7150/jca.13332>
- Chernyavsky, A., Shchepotin, I., Galitovkiy, V., Grando, S. (2015). Mechanisms of tumor-promoting activities of nicotine in lung cancer: synergistic effects of cell membrane and mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors. *BMC Cancer*, 15, 152. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1158-4>
- Cohen, P., Jhingran, A., Oaknin, A., Denny, L. (2019). Cervical cancer. *Lancet*, 393, 169-182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- Dang, N., Meng, X., Song, H. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors and cancer (Review). *Biomedical Reports*, 4, 515-518. <https://doi.org/10.3892/br.2016.625>
- Dani, J. (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *International Review of Neurobiology*, 124, 3–19. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.07.001>
- De Freitas, A., Diniz, A., Simas, B., Campos, E., Medeiros, C. (2012). Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecologic oncology*, 126, 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.03.047>
- Dutertre, S., Nicke, A., Tsetlin, V. (2017). Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms. *Neuropharmacology*, 127, 196-223. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.011>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Escárrega, E.A. (2019). Evaluación del efecto inhibitorio en la proliferación de líneas celulares de cáncer pancreático, usando componentes proteicos de caracoles de la familia Conidae. [Tesis de Maestría en Ciencias]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3011>

- Gabay, M., Li, Y., Felsher, D.W. (2014). MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Perspectives in Medicine*, 4(6), a014241. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014241>
- Gharpure, A., Noviello, C., Hibbs, R. (2020). Progress in nicotinic receptor structural biology. *Neuropharmacology*, 171, 108086. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108086>
- Gheit, T. (2019). Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Frontiers in Oncology*, 9, 355. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>
- Giribaldi, J., Dutertre, S. (2017).  $\alpha$ -Conotoxins to explore the molecular, physiological and pathophysiological functions of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience Letters*, 0304-3940. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.063>
- Grando, S.A., Kawashima, K., Wessler, I. (2020). A historic perspective on the current progress in elucidation of the biologic significance of non-neuronal acetylcholine. *International Immunopharmacology*, 81, 106289. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106289>
- Guan, J., Bywaters, S.M., Brendle, S.A., Ashley, R.E., Makhov, A.M., Conway, J.F., Christensen, N.D., Hafenstein, S. (2017). Cryoelectron Microscopy Maps of Human Papillomavirus 16 Reveal L2 Densities and Heparin Binding Site. *Structure*, 25, 253–263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2016.12.001>
- Guan, X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 5(5), 402–418. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.005>
- Gupta, M.K., Qin, R.Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 9(6), 1144-1155. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i6.1144>
- Hadami, K., Saby, C., Dakka, N., Collin, G., Attaleb, M., Khyatti, M., Filali-Maltouf, A., Morjani, H., El Mzibri, M. (2021). Degradation of p53 by HPV16-E6 variants isolated from cervical cancer specimens of Moroccan women. *Gene*, 791, 145709. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145709>
- Hammond, W., Swaika, A., Mody, K. (2015). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, Vol. 8(1) 57–84.
- Han, Y., Huang, F., Jiang, H., Liu, L., Wang, Q., Wang, Y., Shao, X., Chi, C., Du, W., Wang, C. (2008). Purification and structural characterization of a d-amino acid-containing conopeptide, conomarphin, from *Conus marmoreus*. *The FEBS Journal*, 275(9), 1976-1987. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06352.x>
- Hanahan, D. (2021). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hannenhalli, S., Russell, R. (2000). Analysis and prediction of functional sub-types from protein sequence alignments. *Journal of Molecular Biology*, 30(1), 61-76. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4036>

- He, S., Li, Q., Huang, Q., Cheng, J. (2022). Targeting Protein Kinase C for Cancer Therapy. *Cancers*, 14(5), 1104. <https://doi.org/10.3390/cancers14051104>
- Hendrickson, L. M., Guildford, M. J., & Tapper, A. R. (2013). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Common Molecular Substrates of Nicotine and Alcohol Dependence. *Frontiers in Psychiatry*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00029>
- Ho, T., Lee, H.S., Swaminathan, S., Goodwin, L., Rai, N., Ushay, B., Lewis, R.J., Rosengren, K.J., Conibear, A.C. (2021). Posttranslational modifications of  $\alpha$ -conotoxins: sulfotyrosine and C-terminal amidation stabilize structures and increase acetylcholine receptor binding. *RSC Medical Chemistry*, 12(9), 1574-1584. <https://doi.org/10.1039/d1md00182e>
- Horiuchi, Y., Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., Seki, M., Endo, T., Kato, T., Kawashima, K. (2002). Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sciences*, 72, 1745-1756. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02478-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02478-5)
- Hou, L., Liu, K., Li, Y., Ma, S., Ji, X., Liu, L. (2016). Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *Journal of Cell Science*, 129, 3084-3090. <https://doi.org/10.1242/jcs.184374>
- Improgo, M.R., Soll, L.G., Gardner, T.P. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. *Frontiers in Physiology*, 17(4), 251. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00251>
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2021). *Prevención y control del cáncer cervical en México*. Síntesis sobre políticas de salud. [https://insp.mx/assets/documents/webinars/2021/CISP\\_Cancer\\_Cervical.pdf](https://insp.mx/assets/documents/webinars/2021/CISP_Cancer_Cervical.pdf)
- Janes, R. (2005).  $\alpha$ -Conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses. *Current Opinion in Pharmacology*, 5:280–292. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.01.013>
- Jin, A.H., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Himaya, S. W. A., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R.J., Alewood, P. F. (2019). Conotoxins: Chemistry and Biology. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b0020>
- Kaas, Q., Westermann, J.C., Craik, D.J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon*, 55, 1491-1509. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.002>
- Karlin, A. (2002). Emerging structure of the Nicotinic Acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 102-114. <https://doi.org/10.1038/nrn731>
- Kang T.S., Radic Z., Talley T.T., Jois S.D.S., Taylor P., Kini R.M. (2007). Protein folding determinants: Structural features determining alternative disulfide pairing in  $\alpha$ - and  $\chi/\lambda$ -Conotoxins. *Biochemistry*, 46(11):3338-55. <https://doi.org/10.1021/bi061969o>
- Kannan, K., Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3), 153–163. [https://doi.org/10.1016/s0928-4680\(00\)00053-5](https://doi.org/10.1016/s0928-4680(00)00053-5)
- Kasheverov, I., Kudryavtsev, D., Shelukhina, I., Nikolaev, G., Utkin, Y., Tstelin, V. (2022). Marine Origin Ligands of Nicotinic Receptors: Low Molecular Compounds, Peptides and Proteins for



- Fundamental Research and Practical Applications. *Biomolecules*, 12(2), 189. <https://doi.org/10.3390/biom12020189>
- Koutsogiannouli, E., Papavassiliou, A., Papanikolao, N. (2013). Complexity in cancer biology: is systems biology the answer? *Cancer medicine*, 2(2), 164–177. <https://doi.org/10.1002/cam4.62>
- Kumar, P. S., Kumar, D. S., Umamaheswari, S. (2015). A perspective on toxicology of *Conus* venom peptides. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(5):337–351. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(14\)60342-4](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(14)60342-4)
- Kumari, A., Ameri, S., Ravikrishna, P., Dhayalan, A., Kamala, S., Selvankumar, T., Govearthanan, M. (2020). Isolation and Characterization of Conotoxin Protein from *Conus inscriptus* and Its Potential Anticancer Activity Against Cervical Cancer (HeLa-HPV 16 Associated) Cell Lines. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 1051–1059. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09907-2>
- Lebbe, E., Peigneur, S., Wijesekara, I., Tytgat, J. (2014). Conotoxins Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors: An Overview. *Marine Drugs*, 12, 2970-3004. <https://doi.org/10.3390/md12052970>
- Lehtinen, T., Söderlund, A., Petäjä, T., Eriksson, T., Jokiranta, S., Natunen, K., Dillner, J., Lehtinen, M. (2017). Human Papillomavirus (HPV) Prevalence in Male Adolescents 4 Years After HPV-16/18 Vaccination. *Journal of Infectious Diseases*, 216, 966–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix415>
- Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I., Christie, M. J. (2012). *Conus* Venom Peptide Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 64(2), 259–298. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005322>
- Li, X., Chen, W., Zhangsun, D., Luo, S. (2020). Diversity of Conopeptides and Their Precursor Genes of *Conus Litteratus*. *Marine drugs*, 18(9), 464. <https://doi.org/10.3390/md18090464>
- Li, X., Tae, H.-S., Chu, Y., Jiang, T., Adams, D. J., Yu, R. (2020). Medicinal chemistry, pharmacology, and therapeutic potential of  $\alpha$ -conotoxins antagonizing the  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor. *Pharmacology & Therapeutics*, 222, 107792. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020>
- Linnekamp, J., Wang, X., Medema, J., Vermeulen, L. (2015). Colorectal Cancer Heterogeneity and Targeted Therapy: A Case for Molecular Disease Subtypes. *Cancer research*, 75 (2), 245-249. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2240>
- Liu, L., Gong, F., Jiang, F. (2023). Epigenetic regulation of necrosis and pyknosis. In: Boosani, C., Goswami, R., (Eds.), *Epigenetics in Organ Specific Disorders* (p. 51-62). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-01009-1>
- Liu, Y., Qian, J., Sun, Z., Zhangsun, D., Luo, S. (2019). Cervical Cancer Correlates with the Differential Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptors and Reveals Therapeutic Targets. *Marine drugs*, 17, 256. <https://doi.org/10.3390/md17050256>
- Madden, S., Araujo, A.D., Gerhardt, M., Fairlie, D.P., Mason, J.M. (2021). Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Molecular cancer*, 20, 3. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01291-6>

- Mahesh, A., Bathia, K., Bhatt, S. (2024). Cell cycle. In: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*, Fourth Edition (pp. 667-674). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00256-6>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), 339-348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- Marks, M., Meinerz, N., Brown, R., Collins, A. (2010).  $^{86}\text{Rb}^+$  efflux mediated by  $\alpha 4\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholine receptors with high and low-sensitivity to stimulation by acetylcholine display similar agonist-induced desensitization. *Biochemical Pharmacology*, 80(8), 1238-1251. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.040>
- Marx, U., Daly, N., Craik, D. (2006). NMR of conotoxins: structural features and an analysis of chemical shifts of post-translationally modified amino acids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44, 41–50. <https://doi.org/10.1002/mrc.1821>
- Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Fujii, T. (2021). Regulation of Immune Functions by Non-Neuronal Acetylcholine (ACh) via Muscarinic and Nicotinic ACh Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 6818. <https://doi.org/10.3390/ijms22136818>
- Mei, D., Lin, Z., Fu, J., He, B., Gao, W., Ma, L., Dai, M., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., Lu, W., Zhou, D., Zhang, Q. (2015). The use of  $\alpha$ -conotoxin Iml to actualize the targeted delivery of paclitaxel micelles to  $\alpha 7$  nAChR-overexpressing breast cancer. *Biomaterials*, 42, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.044>
- Mitra, S., Khatri, S., Maulik, M., Bult-Ito, A., Schulte, M. (2020). Allosterism of Nicotinic Acetylcholine Receptors: Therapeutic Potential for Neuroinflammation Underlying Brain Trauma and Degenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4918. <https://doi.org/10.3390/ijms21144918>
- Mucchietto, V., Fasoli, F., Pucci, S., et al. (2017).  $\alpha 9$ - and  $\alpha 7$ -containing receptors mediate the proliferative effects of nicotine in the A549 adenocarcinoma cell line. *British Journal of Pharmacology*, 175(11), 1957–1972. <https://doi.org/10.1111/bph.13954>
- Muñoz, O., Carrillo, A., Lizano, M. (2022). Epidemiology and Molecular Biology of HPV Variants in Cervical Cancer: The State of the Art in Mexico. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8566. <https://doi.org/10.3390/ijms23158566>
- Muttenthaler, M., Akondi, K., Alewood, P. (2011). Structure-Activity Studies on Alpha-Conotoxins. *Current Pharmaceutical Design*, 17(38), 4226-41. <https://doi.org/10.2174/138161211798999384>
- Nicke, A., Loughnan, M., Millard, E., Alewood, P., Adams, D., Daly, N., Craik, D., Lewis, R. (2003). Isolation, Structure, and Activity of GID, a Novel  $\alpha 4/7$ -Conotoxin with an Extended N-terminal Sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3137-3144. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210280200>
- Nicke, A., Wonnacott, S., Lewis, R. (2004).  $\alpha$ -Conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *European Journal of Biochemistry*, 271, 2305–2319. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04145.x>

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2:3, 213-219. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s23213>
- Nour, M.A., Hajiasgharzadeh, K., Kheradmand, F., Asadzadeh, Z., Bolandi, N., Baradaran, B. (2021). Nicotinic acetylcholine receptors in chemotherapeutic drugs resistance: An emerging targeting candidate. *Life Sciences*, 278, 119557. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119557>
- Nys, M., Zarkadas, E., Brams, M., Mehregan, A., Kambara, K., Kool, J., Casewell, N., Bertrand, D., Baenziger, J.E., Nury, H., Ulens, C. (2022). The molecular mechanism of snake short-chain  $\alpha$ -neurotoxin binding to muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Communications*, 13, 4543. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32174-7>
- Olivera, B. M., Cruz, L. J. (2001). Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*, 39(1), 7–14. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00157-4](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00157-4)
- Olusola, P., Nath, H., Philley, J., Dasgupta, S. (2019). Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*, 8, 622. <https://doi.org/10.3390/cells8060622>
- Oroz, I., Navarro, M., Cervantes, K., Álvarez, C., Salvese, G., Sanchez, L., Licea, A. (2016). Apoptosis Activation in Human Lung Cancer Cell Lines by a Novel Synthetic Peptide Derived from *Conus californicus* Venom. *Toxins*, 8(2), 38. <https://doi.org/10.3390/toxins8020038>
- Osipov, A., Terpinskaya, T., Yanchanka, T., Balashevich, T., Zhmak, M., Tsetlin, V., Utkin, Y. (2020).  $\alpha$ -Conotoxins Enhance both the In Vivo Suppression of Ehrlich carcinoma Growth and In Vitro Reduction in Cell Viability Elicited by Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitors. *Marine drugs*, 18(4), 193. <https://doi.org/10.3390/md18040193>
- Paleari, L., Grozio, A., Cesario, A., Russo, P. (2008). The cholinergic system and cancer. *Seminars in Cancer biology*, 18, 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.12.009>
- Peng, C., Chen, W., Sanders, T., Chew, G., Liu, J., Hawrot, E., Chi, C. (2010). Chemical synthesis and characterization of two  $\alpha$ 4/7-conotoxins. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(10), 745–753. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq074>
- Phuong, M. A., Mahardika, G. N. (2018). Targeted Sequencing of Venom Genes from Cone Snail Genomes Improves Understanding of Conotoxin Molecular Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35(5), 1210–1224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy034>
- Poon, I., Hulett, M., Parish, C. (2010). Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differentiation*, 17, 381–397. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.195>
- Prashanth, J.R., Dutertre, S., Lewis, R.J. (2017). Pharmacology of predatory and defensive venom peptides in cone snails. *Molecular BioSystems*, 13, 2453-2465. <https://doi.org/10.1039/c7mb00511c>
- Pulliandre, N., Watkins, M., Olivera, B. (2010). Evolution of *Conus* Peptide Genes: Duplication and Positive Selection in the A-Superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 70, 190–202. <https://doi.org/10.1007/s00239-010-9321-7>
- Qian, J., Liu, Y., Sun, Z., Zhangsun, D., Luo, S. (2019). Identification of nicotinic acetylcholine receptor subunits in different lung cancer cell lines and the inhibitory effect of alpha-conotoxin TxID on

- lung cancer cell growth. *European Journal of Pharmacology*, 865, 172674. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172674>
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 12, 985363. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
- Quiram, P.A., McIntosh, J.M., Sine, S.M. (2000). Pairwise interactions between neuronal alpha (7) acetylcholine receptors and alpha-conotoxin PnIB. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4889-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4889>
- Reichrath, S., Reichrath, J., Moussa, A.T., Meier, C., Tschernig, T. (2016). Targeting the non-neuronal cholinergic system in macrophages for the management of infectious diseases and cancer: challenge and promise. *Cell Death Discovery*, 2, 16063. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.63>
- Rieger, A., Nelson, K., Konowalchuk, J., Barreda, D. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*, 24(50), 2597. <https://doi.org/10.3791/2597>
- Robinson, S., y Norton, R. (2014). Conotoxin Gene Superfamilies. *Marine drugs*, 12, 6058-6101; <https://doi.org/10.3390/md12126058>
- Sabatini, D.M. (2006). mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Review Cancer*, 6(9), 729-34. <https://doi.org/10.1038/nrc1974>
- Sakamoto, K.M., Frank, D.A. (2009). CREB in the Pathophysiology of Cancer: Implications for Targeting Transcription Factors for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 15(8), 2583–2587. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1137>
- Saraste, A., Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528-37. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3)
- Sastry, B.V., Sadavongvivad, C. (1978). Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacological Reviews*, 30, 65-132. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/377313/>
- Scholze, P., y Huck, S. (2020). The  $\alpha 5$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Differentially Modulates  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 4$  Receptors. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, Vol. 12, 607959. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.607959>
- Schuller, H. (2009). Is cancer triggered by altered signaling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nature Reviews*, Vol. 9, 195-205. <https://doi.org/10.1038/nrc2590>
- Sen, C. K., Roy, S. (2001). Redox control of caspases. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(4), 215–220. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(01\)00085-0](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(01)00085-0)
- Shah, N., Khurana, S., Cheng, K., Raufman, J. (2009). Muscarinic receptors and ligands in cancer. *American Journal of Physiology*, 296. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00514.2008>

- Sharma, S., Dutta, A. (2023). Phospholipase and radiation-mediated membrane dynamics. In: Chakraborti, S. *Phospholipases in Physiology and Pathology* (p. 449-476). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2021-1-02265-9>
- Sinha, S., Eisenhaber, B., Lynn, A. (2018). Predicting Protein Function Using Homology-Based Methods. In: Shanker, A. (Ed.), *Bioinformatics: Sequences, Structures, Phylogeny* (pp. 289–305). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1562-6>
- Sun, Z., Bao, J., Zhangsun, M., Dong, S., Zhangsun, D., Luo, S. (2020).  $\alpha$ O-Conotoxin GeXIVA Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells via Interaction with  $\alpha$ 9 Nicotine Acetylcholine Receptors. *Marine drugs*, 18(4), 195. <https://doi.org/10.3390/md18040195>
- Sun, Z.; Zhangsun, M.; Dong, S.; Liu, Y.; Qian, J.; Zhangsun, D.; Luo, S. (2020). Differential Expression of Nicotine Acetylcholine Receptors Associates with Human Breast Cancer and Mediates Antitumor Activity of  $\alpha$ O-Conotoxin GeXIVA. *Marine drugs*, 18, 61. <https://doi.org/10.3390/md18010061>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suryanarayanan, A. (2014). Acetylcholine. In Wexler, P., *Encyclopedia of Toxicology*, Third Edition (pp. 49-50). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00218-9>
- Tae, H.S., Adams, D.J. (2023). Nicotinic acetylcholine receptor subtype expression, function, and pharmacology: Therapeutic potential of  $\alpha$ -conotoxins. *Pharmacological Research*, 191, 106747. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106747>
- Tansey, E. M. (2006). Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *Neurosciences*, 329, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.03.012>
- Terlau, O., Olivera, B. (2004). *Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiological Reviews*, 84, 41– 68. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2003>
- The Nobel Prize. (2024, Febrero 12). *All Nobel Prizes in Physiology or Medicine*. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-laureates-in-physiology-or-medicine/1939-1930/>
- Turner, M., Marquart, L., Phillips, P., McDougal, O. (2019). Mutagenesis of  $\alpha$ -Conotoxins for Enhancing Activity and Selectivity for Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Toxins*, 11(2), 113. <https://doi.org/10.3390/toxins11020113>
- Walker, D., Brown, B., Blackett, A., Tidy, J., Smallwood, R. (2003). A study of the morphological parameters of cervical squamous epithelium. *Physiological measurement*, 24, 121-135. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/24/1/309>
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Carter, A., ... Coates, M. M. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1459–1544. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31012-1)

- Wargo, J.A., Reuben, A., Cooper, Z.A., Oh, K.S., Sullivan, R.J. (2015). Immune Effects of Chemotherapy, Radiation, and Targeted Therapy and Opportunities for Combination with Immunotherapy. *Seminars in Oncology*, 42(4), 601-616. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.007>
- Wazham, M.N. (2014). Neurotransmitter Receptors. In Byrne, J.H., Heidelberger, R., Waxham, M.N (Eds.), *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience* 3<sup>rd</sup> edition (pp. 285-290). Academic press. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07251-4>
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J. (2001). The Non-neuronal Cholinergic System: The Biological Role of Non-neuronal Acetylcholine in Plants and Humans. *Japanese Journal of Pharmacology*, 85, 2 – 10. <https://doi.org/10.1254/jjp.85.2>
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*, 154, 1558–1571. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
- WHO (World Health Organization). (2024, Febrero 13). *Global cancer burden growing, amidst mounting need for services*. <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
- Wu, C., Lee, C., Ho, Y. (2011). Nicotinic Acetylcholine Receptor-Based Blockade: Applications of Molecular Targets for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 17(11). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2434>
- Xie, Y.H., Chen, Y.X., Fang, J.Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Xue, J., Yang, S., & Seng, S. (2014). Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers*, 6(2), 1138–1156. <https://doi.org/10.3390/cancers6021138>
- Yang, C., Jiang, Y., Hao, S., Yan, X., Hong, D., Naranmandura, H. (2022). Aptamers: an emerging navigation tool of therapeutic agents for targeted cancer therapy. *Royal Society of Chemistry*, 10, 20-33. <https://doi.org/10.1039/D1TB02098F>
- Yin, Q., Li, J., He, Q., Liu, S., He, L. (2017). Mutations and reduced expression of p53 gene are involved in HPV-independent oncogenesis of cervical cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(4), 4356-4362. ISSN:1936-2625/IJCEP0036136
- Zacapala, A., Moral, O., Villegas, N., Hidalgo, A., Romero, S., Beltrán, F., Leyva, M., Alarcón, L., Illades, B. (2016). Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C-33A cells. *Virology*, 488, 187-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.017>
- Zhang, H., Kong, Q., Wang, J., Jiang, Y., Hua, H. (2020). Complex roles of cAMP–PKA–CREB signaling in cancer. *Experimental Hematology Oncology*, 9, 32. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00191-1>
- Zhao, Y. (2016). The Oncogenic Functions of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Oncology*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/9650481>.

Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Neuropharmacology*, 16, 338-349. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450>.

Zou, Z., Tao, T., Li, H., Zhu, X. (2020). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & Bioscience*, 10, 31. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>