

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**

**Evaluación de la actividad reguladora del ciclo celular de α -
conotoxinas en cáncer de mama triple negativo**

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

Presenta:

Luis Ricardo Rodríguez Marino

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Luis Ricardo Rodríguez Marino

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Dra. Patricia Juárez Camacho



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 **Luis Ricardo Rodríguez Marino** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Evaluación de la actividad reguladora del ciclo celular de α -conotoxinas en cáncer de mama triple negativo

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en mujeres. Se estima que alrededor de cada 13 minutos, una mujer con cáncer de mama fallece a nivel mundial. Los caracoles marinos del género *Conus* disponen de un arsenal biosintético de toxinas derivados de un aparato venenoso que utilizan para cazar. Entre estos compuestos destacan las conotoxinas, que son un grupo de péptidos farmacológicamente activos de entre 12-20 aminoácidos con blancos moleculares específicos asociados a receptores y/o canales en la membrana celular. Se ha estudiado la importante relación de estos canales con procesos de regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis. Debido a la diversidad y a la especificidad que presentan, las conotoxinas poseen un gran potencial como fuente para desarrollar nuevos fármacos para combatir el cáncer de mama. En este proyecto, se realizó la evaluación de α conotoxinas sintéticas derivadas de caracoles marinos del género *Conus* que tengan actividad reguladora del ciclo celular en las líneas de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-157 y MDA-MB-231. La identificación de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) se realizó mediante la extracción y retrotranscripción del ARN celular. Una vez obtenido el ADNc, se amplificaron las distintas subunidades de los receptores nAChR. Los resultados mostraron que ambas líneas celulares comparten la subunidad $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\alpha 5$. Posteriormente, se evaluó el efecto de 9 α -conotoxinas sintéticas distintas en la viabilidad celular utilizando un ensayo colorimétrico. Los resultados mostraron que las conotoxinas xm1b y vc1.1 presentan una mayor actividad reguladora del ciclo celular en ambas líneas celulares no dependientes del tiempo ni de la concentración. Las otras conotoxinas no mostraron efectos significativos en los ensayos. Los resultados de esta investigación sugieren una interacción entre las conotoxinas con los nAChRs, sin embargo, se necesitan más pruebas para determinar la vía de interacción.

Palabras clave: cáncer de mama triple negativo, conotoxinas, *Conus*, apoptosis.

Abstract of the thesis presented by **Luis Ricardo Rodríguez Marino** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Evaluation of the cell cycle regulatory activity of α -conotoxins in triple negative breast cancer

Abstract approved by:

PhD Alexei Fedórovich Licea Navarro
Thesis Director

Breast cancer is the cancer with the highest incidence and mortality in women. It is estimated that around every 13 minutes, a woman with breast cancer dies worldwide. The marine snails of the genus *Conus* have a biosynthetic arsenal of toxins derived from a poisonous apparatus that they use to hunt. Among these compounds, conotoxins stand out, and they are a group of pharmacologically active peptides of between 12-20 amino acids with specific molecular targets associated with receptors and/or channels in the cell membrane. The important relationship of these channels to processes of regulation of the cell cycle, proliferation and apoptosis has been studied. Due to their diversity and specificity, conotoxins have great potential as a source for developing new drugs to combat breast cancer. In this project, the evaluation of synthetic α conotoxins derived from marine snails of the genus *Conus* that have cell cycle regulatory activity in the triple negative breast cancer lines MDA-MB-157 and MDA-MB-231 was carried out. The identification of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) was carried out by extraction and retrotranscription of cellular RNA. Once the cDNA was obtained, the different subunits of the nAChR receptors were amplified. The results showed that both cell lines share the $\alpha 9$, $\alpha 10$ and $\alpha 5$ subunit. Subsequently, the effect of 9 different synthetic α -conotoxins on cell viability was evaluated using a colorimetric assay. The results showed that the conotoxins xm1b and vc1.1 present greater regulatory activity of the cell cycle in both cell lines, not dependent on time or concentration. The other conotoxins did not show significant effects in the tests. The results of this investigation suggest an interaction between conotoxins with nAChRs, however, more evidence is needed to determine the interaction pathway.

Keywords: triple negative breast cancer, conotoxins, *Conus*, cell cycle regulation.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi compañera de vida, que nunca me ha soltado en el proceso y continúa recordándome todos los días que lo puedo lograr.

A mis padres y mi hermana, que siempre han estado para mí de todas las maneras posibles.

A mi hermoso bebé, que ha sacado lo mejor de mí desde que llegó a mi vida y siempre me regala una sonrisa que inspira.

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 pertenecer a su equipo de trabajo y aprender de los mejores. Por su apoyo durante el proceso, por creer en mí a pesar de las adversidades, por su disposición y su paciencia y sobretodo por sus consejos personales y académicos que me brindó en la realización de este proyecto.

A la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, por su enseñanza en el área de cultivo celular, por su paciencia, consejos y disposición.

A la Dra. Fabiola Lafarga por su paciencia y acompañamiento en este trabajo, así como por aceptar ser parte de mi comité.

A la Dra. Patricia Juárez Camacho, por enseñarme sobre el cáncer, tema muy valioso en esta tesis y formar parte de mi comité.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron en este proceso y son parte de mi vida de cualquier manera.

A mi familia, que me da motivos diarios para seguir adelante. Los amo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Tratamientos actuales.....	3
1.1.2 Generalidades del género Conus	4
1.1.3 Aparato venenoso y veneno de los Conus	5
1.1.4 Conotoxinas.....	7
1.1.5 Canales iónicos y su relación con el cáncer.....	8
1.1.6 Receptores nicotínicos de acetilcolina	10
1.1.7 Cáncer de mama triple negativo	11
1.2 Justificación	11
1.3 Hipótesis (opcional).....	12
1.4 Objetivos	12
1.4.1 Objetivo general.....	12
1.4.2 Objetivos específicos.....	12
Capítulo 2. Metodología.....	13
2.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama	13
2.1.1 Preparación de material y equipo	13
2.1.2 Activación de líneas celulares	14

2.1.3	Mantenimiento celular.....	14
2.1.3.1	Desprendimiento de líneas celulares	14
2.1.3.2	Expansión de cultivo.....	15
2.1.3.3	Conteo celular	15
2.1.4	Criopreservado de líneas celulares	15
2.2	Caracterización de receptores nicotínicos de acetilcolina	15
2.2.1	Extracción de ARN	15
2.2.2	Retrotranscripción del ARN a ADNc	16
2.2.3	Amplificación de genes por PCR.....	17
2.3	Ensayos para la evaluación de la viabilidad celular.....	18
2.3.1	Estandarización de protocolos para evaluación de la viabilidad celular.....	18
2.3.2	Ensayos de viabilidad celular.....	19
2.3.3	Análisis de ensayos de viabilidad celular	20
Capítulo 3.	Resultados	21
3.1	Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama	21
3.2	Caracterización de receptores nicotínicos de acetilcolina	22
3.3	Ensayos para evaluación de la viabilidad celular	23
3.3.1	Estandarización de protocolos para ensayos de viabilidad celular.....	23
3.3.2	Ensayos de viabilidad celular.....	26
Capítulo 4.	Discusión.....	38
Capítulo 5.	Conclusiones	44
Literatura citada		45

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Esquema representativo del aparato venenoso de Conus.	6
Figura 2. Fotografías de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. A) línea celular MDA MB 157 y B) línea celular MDA MB 231. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido con un objetivo de 10X.....	21
Figura 3. Amplificación de genes de las subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina mostrada por electroforesis en geles de agarosa (1.5%) de las líneas celulares A) MDA MB 231 y B) MDA MB 157. El número de pares de bases esperado para cada amplificación se encuentra por encima de cada línea de expresión, de color blanco si coincide, azul si no aparece o no coincide. Los controles negativos de amplificación (sin ADN) se muestran en la parte inferior de cada gel. C) La escalera de peso molecular de referencia se muestra del lado izquierdo.....	22
Figura 4. Fotografías de diferentes números de células MDA MB 231 cultivadas en una microplaca de 96 pozos. Cada imagen muestra la cantidad de células cultivadas en un solo pozo. A) 5 000 células, B) 7 500 células, C) 10 000 células y D) 15 000 células.	24
Figura 5. Fotografías de diferentes números de células MDA MB 157 cultivadas en una microplaca de 96 pozos. Cada imagen muestra la cantidad de células cultivadas en un solo pozo. A) 5'000 células, B) 7'500 células, C) 10'000 células y D) 15'000 células.	24
Figura 6. Gráficas de viabilidad celular del efecto de diferentes concentraciones de DMSO en la viabilidad celular de las líneas MDA MB 231 y MDA MB 157. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media±SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples.....	25
Figura 7. Gráficas de ensayos de estandarización de controles para pruebas de viabilidad celular. Ensayos realizados en línea celular MDA MB 231. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media±SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples.....	26
Figura 8. Primer ensayo de viabilidad celular en ambas líneas celulares A) MDA MB 231 y B) MDA MB 157. 9 distintas conotoxinas se probaron en estos ensayos. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media±SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los controles positivos utilizados fueron: DMSO al 5% y Cisplatino [100 ug mL⁻¹]......	28
Figura 9. Segundo ensayo de viabilidad celular con ambas líneas celulares MDA MB 231 y MDA MB 157. Se utilizaron 4 conotoxinas distintas como tratamientos, seleccionadas de resultados previos. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media±SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los controles positivos utilizados fueron: DMSO al 5% y Cisplatino [100 ug mL⁻¹].	29

- Figura 10. Tercer ensayo de viabilidad celular con ambas líneas celulares MDA MB 231 y MDA MB 157.** Se utilizaron 4 conotoxinas distintas como tratamientos, seleccionadas de resultados previos. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los controles positivos utilizados fueron: DMSO al 5% y Cisplatino [100 ug mL⁻¹]. 30
- Figura 11. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 231. Se utilizaron 3 conotoxinas distintas como tratamientos a 5 distintas concentraciones.** Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) como control positivo..... 31
- Figura 12. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 157.** Se utilizaron 3 conotoxinas distintas como tratamientos a 5 distintas concentraciones. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [100 ug mL⁻¹] como control positivo. 32
- Figura 13. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 231.** Se utilizaron 3 conotoxinas distintas como tratamientos a 3 distintas concentraciones y se probaron a 3 diferentes tiempos (24 h, 48 h y 72 h). Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [100 ug mL⁻¹] como control positivo. 33
- Figura 14. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 157.** Se utilizaron 3 conotoxinas distintas como tratamientos a 3 distintas concentraciones y se probaron a 3 diferentes tiempos (24 h, 48 h y 72 h). Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [100 ug mL⁻¹] como control positivo. 34
- Figura 15. . Ensayo de viabilidad celular en ambas líneas celulares MDA MB 157 y MDA MB 231.** Se probó el efecto de la conotoxinas xm1b de un nuevo lote a 3 distintas concentraciones. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm SD, estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [100 ug mL⁻¹] como control positivo. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 16. Comparación de secuencias entre α -conotoxinas.** Se presentan las secuencias de las conotoxinas utilizadas en este estudio. Los colores son representativos para diferenciación de cada aminoácido. El análisis fue llevado a cabo mediante el programa MEGA X (Versión 10.2.7). 39
- Figura 17. Efectos de la nicotina actuando sobre los receptores que contienen la subunidad $\beta 9$ expresada de diferentes tipos de células cancerosas.** A) La nicotina (en células de glioma y adenocarcinoma de pulmón) y la colina (solo en células de glioma) median efectos proliferativos y antiapoptóticos a través de las vías de señalización ERK y Akt. B) En las células de cáncer de mama, la nicotina que actúa sobre los nAChRs $\alpha 9$ activa la vía PI3K/Akt que fosforila los receptores de estrógeno intracelulares (RE) que, a su vez, se unen al factor de transcripción AP1 y a la región

promotora del gen CHRNA9. También aumenta los niveles de ciclina D3 proproliferativa, la proteína antiapoptótica XIAP y la proteína fosfatasa PPM1F que reduce la p53 y BAX fosforiladas, protegiendo así las células de la apoptosis. Finalmente, promueve la fosforilación de STAT3 y su translocación nuclear, aumentando así la transcripción del gen que codifica la lectina antiapoptótica Gal-3. En las células de melanoma, la nicotina aumenta el número de nAChR $\alpha 9$ y fosforila STAT3, que se une al promotor PD-L1 en el núcleo y conduce a una mayor expresión superficial de PD-L1, promoviendo así el escape inmunológico de las células cancerosas..... 41

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Características de las líneas celulares de cáncer de mama (ATCC).	13
Tabla 2. Condiciones del termociclador para amplificación de genes.	18
Tabla 3. Características generales de las conotoxinas sintéticas probadas.	19
Tabla 4. Comparación de la expresión de subunidades de receptores nAChR en las células de cáncer de mama.	23

Capítulo 1. Introducción

El cáncer (OMS, 2022) es un término utilizado para denominar un amplio grupo de enfermedades genéticas que pueden afectar a cualquier parte del organismo, asociado a la formación de tumores o neoplasias malignos. La característica principal del cáncer es el crecimiento y rápida proliferación de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden así, invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos en un proceso denominado “metástasis”. La extensión de la metástasis es conocida como la principal causa de muerte de esta enfermedad.

Este padecimiento es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2020, el Observatorio Global de Cáncer (GCO) atribuyó 9 958 133 defunciones asociadas al cáncer (Sung et al., 2021). En este número, los cánceres que presentaron mayor número de muertes fueron: de mama (2,26 millones de casos), de pulmón (2,21 millones de casos), colorrectal (1,93 millones de casos), de próstata (1,41 millones de casos), de piel (1,2 millones de casos) y gástrico (1,09 millones de casos).

El cáncer es producido cuando las células normales son transformadas en células tumorales debido a un proceso que suele ser en varias etapas y consiste en una progresión de una lesión localizada a un tumor maligno. Las alteraciones que presentan este tipo de células pueden derivar de factores genéticos de la persona afectada o algunos factores externos denominados carcinógenos. La incidencia del cáncer incrementa con la edad relacionado a la acumulación de factores de riesgo de determinados tipos de cáncer, aunado a la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que suelen ocurrir con la edad (Wormald et al., 2020).

Los tumores formados durante un proceso de carcinogénesis por células malignas adquieren cualidades que las diferencian del funcionamiento celular normal. Este tipo de características se proponen como “Hallmark del cáncer”, y son un conjunto de capacidades funcionales adquiridas por las células humanas a medida que pasan de la normalidad a los estados de crecimiento neoplásico, más específicamente capacidades que son cruciales para su capacidad de formar tumores malignos (Senga y Grose, 2021).

La formulación de estas características estuvo influenciada por el reconocimiento de que los cánceres humanos se desarrollan como productos de procesos de múltiples pasos, y que la adquisición de estas capacidades funcionales podría mapearse de alguna manera en los pasos distinguibles de la patogénesis del tumor.

Las ocho características comprenden actualmente las capacidades adquiridas para mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir formación de vasos capilares, activar la invasión y la metástasis, reprogramar el metabolismo celular y evitar la destrucción inmunitaria. En la elaboración más reciente de este concepto, la desregulación del metabolismo celular y la evitación de la destrucción inmunitaria se segregaron como “sellos distintivos emergentes” (Senga y Grose, 2021).

Los senos se refieren a los órganos glandulares presentes en el pecho. Los senos se encuentran sobre la pared torácica y sobre los músculos pectorales. Tanto los hombres como las mujeres tienen senos. Sin embargo, están más desarrollados en las mujeres. Cada seno contiene muchas glándulas y otras estructuras que les permiten realizar sus funciones. Por ejemplo, en la mujer la función biológica primaria del seno es producir leche para alimentar a los bebés. Asimismo, el pecho puede ser también un símbolo de feminidad y jugar un papel en la atracción y el placer sexual. (

Una de las enfermedades con más incidencia y mortalidad asociadas a este órgano es el cáncer de mama, el cual afecta mayoritariamente a las mujeres, presentando una incidencia del 99.4% en mujeres y 0.6% en hombres en 2023. En 2023, GLOBOCAN afirmó la detección de 2 261 419 nuevos casos de cáncer de mama en mujeres, representando el 24.5% del total de cánceres detectados ese año (Sung et al., 2021). Por otro lado, el cáncer de mama se presentó como el cáncer con mayor mortalidad, con un total de 684 996 defunciones debidas a esta enfermedad, el 15.5% del total de muertes por cáncer en 2020.

El cáncer de mama, como lo dice su nombre, es un tipo de cáncer que se origina en una o ambas mamas. Los cánceres de mama pueden comenzar en diferentes partes de la mama, dando origen a diferentes subtipos de este cáncer. En este caso, las células cancerosas del seno normalmente dan lugar a la formación de uno o varios tumores que a menudo pueden ser observados por radiografía o palparse como un bulto o masa. Existen principalmente dos tipos de cáncer de mama: el carcinoma ductal que comienza en los tubos (conductos) que transportan leche desde la mama hasta el pezón. La mayoría de los cánceres de mama son de estas características. El otro tipo es el carcinoma lobular que comienza su formación en partes de las mamas, llamadas lóbulos, productores de la leche (Anastasiadi et al., 2017).

Entre los síntomas que esta enfermedad presenta se encuentran: bulto mamario o bulto duro en la axila con bordes irregulares, cambio del tamaño, textura o forma del pezón, enrojecimiento, piel tipo cáscara de naranja, incluso puede presentarse líquido en el pezón, que puede ser sanguinolento y/o lucir como

pus. En etapas avanzadas, el paciente suele presentar dolor óseo, dolor o molestia en las mamas, úlceras cutáneas, hinchazón de los ganglios linfáticos en la axila y pérdida de peso y debilidad (Fahad, 2019).

El tratamiento actual para cáncer de mama depende de la localización del tumor y el tipo de cáncer que se presenta o si ya existe un estado invasivo a partir del tumor primario. Entre estos tratamientos se encuentran la cirugía, la radiación, la quimioterapia y hormonoterapia, de ser el caso. La mayoría de los cánceres se tratan con una combinación de estos acercamientos y se persigue eliminar por completo el tumor sin dejar secuelas o disminuyendo efectos secundarios (Maughan et al., 2010).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Tratamientos actuales

El plan de tratamiento para el cáncer de mama es influenciado por la biología y el comportamiento de la enfermedad. Algunos tumores suelen ser pequeños, pero crecen rápidamente, mientras que otros son más grandes y crecen lentamente. Las opciones de tratamiento para estos casos son personalizadas y dependen de varios factores, entre ellos: el subtipo de tumor, si presenta receptores hormonales (ER, PR, HER2), el estadio del tumor, los marcadores genómicos, la edad de la persona, su estado de salud en general, presencia de mutaciones en genes, específicamente BRCA1 o BRCA2, si el cáncer de mama es triple negativo (Maughan et al., 2010).

En la actualidad, la mayoría de los tratamientos consisten en combinaciones de opciones que llevan a erradicar por completo los rasgos de los tumores crecientes. Destacan la mastectomía, que es una cirugía donde se extirpa por completo el seno, ayudada de tratamientos quimioterapéuticos, terapia hormonal, o radiación. En ciertas ocasiones, es posible administrar quimioterapia antes de la cirugía.

Si el tumor presenta resistencia a la quimioterapia y/o radiación, es posible decidir un tratamiento con medicamentos de terapias dirigidas, en donde la selección se hace a partir de las anormalidades específicas que presenten las células cancerosas. Por ejemplo, en un tipo de cáncer positivo a HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), hay varios fármacos selectivos que centran en disminuir o erradicar esta proteína que ayuda a las células cancerígenas a proliferar y sobrevivir.

Otro enfoque actual, en vías de desarrollo, son las inmunoterapias, que utilizan el sistema inmunológico para combatir el cáncer. Este tipo de tratamientos son comunes para cáncer de mama triple negativo, es decir, que las células cancerosas no tienen receptores de estrógeno, progesterona o el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por sus siglas en inglés).

Actualmente, la investigación en cáncer ha buscado nuevas alternativas a los tratamientos actuales debido a la amplia gama de características o acercamientos que el tumor puede presentar y la baja disponibilidad de tratamientos eficaces que no presenten efectos secundarios. Debido a esto, se propone la búsqueda de nuevos tratamientos con efectos antiproliferativos y mayor selectividad hacia las células cancerosas, disminuyendo así, los efectos secundarios en pacientes. El veneno de algunos caracoles marinos han sido evaluados recientemente y surgen como una opción a esta aproximación de tratamientos específicos (Papiez y Krzyściak, 2021).

1.1.2 Generalidades del género *Conus*

Conus es un género de moluscos gasterópodos que pertenece a la familia Conidae, conocidos coloquialmente como conos. Se estima que existen más de 700 especies diferentes de este caracol depredador. Si bien los humanos no son la presa prevista para estos moluscos, suelen existir casos de humanos que son picados por un caracol tipo cono. A menudo estos se caracterizan por poseer un veneno lo suficientemente potente como para paralizar de forma inmediata y eventualmente matar a su presa. El veneno de un caracol cono tiene el potencial hipotético de matar hasta 700 personas (Lewis et al., 2012).

Las conchas espirales del caracol son el hábitat de por vida para este depredador residente. A medida que el caracol continúa creciendo, se construye sobre su caparazón estampado. Todos los miembros del género parecen similares, pero muchas especies diferentes de *Conus* también poseen atractivo biomédico. Los caracoles de cono varían en tamaño desde unos pocos centímetros hasta 29 cm de largo.

El veneno de *Conus* es una mezcla compleja de compuestos que tienen la capacidad de causar parálisis a través de múltiples pasos de bloqueo neuromuscular. Las combinaciones de péptidos que componen el veneno varían entre especies, y se ha estimado que cada caracol tiene la capacidad de albergar compuestos bioactivos diferentes dentro de su veneno. Dentro del veneno compuesto, cada especie tiene la capacidad de expresar alrededor de 100 a 200 péptidos diferentes (Lewis et al., 2012).

Los hábitats del caracol cono incluyen principalmente aguas tropicales, como el Mar Rojo, el Caribe, el Océano Índico y el Pacífico. A pesar de la preferencia por los ambientes tropicales, los caracoles cónicos suelen vivir en mares cálidos y profundos. Suelen vivir en aguas profundas cerca de los arrecifes y cazan principalmente de noche. Durante el día, se entierran en la arena y se encuentran principalmente con humanos solo cuando se les provoca (Martínez, 2010).

1.1.3 Aparato venenoso y veneno de los Conus

Los *Conus* utilizan el veneno como un importante arma en la captura de sus presas, utilizando su aparato venenoso como un eficaz sistema de inyección y liberación del veneno. Esta estructura facilita la alimentación de estos gasterópodos mediante la síntesis de toxinas constituidas por componentes peptídicos (Kapil, 2022).

Su proceso de caza inicia cuando se detecta la presa por medio de señales químicas, posteriormente se extiende la probóscide en dirección a la presa, se posiciona un diente radular cargado con veneno cerca de la punta de la probóscide y es accionado mediante un esfínter, inyectando a la presa y liberando el veneno.

La anatomía del aparato venenoso de *Conus* es compleja y está conformado por tres estructuras principales (figura 1): bulbo, conducto venenoso y rádula. La principal función del bulbo es impulsar la toxina a lo largo del conducto venenoso, sin embargo, algunos autores sostienen que es en el bulbo donde se producen la biosíntesis de las toxinas.

El saco radular, responsable de la biosíntesis de toxinas se encuentra conectado al bulbo y cercano al saco radular, que está relacionado con la formación de dientes radulares, uno de los cuales se encuentra precargado de veneno y está ubicado en la probóscide que genera la inyección de toxinas al momento del ataque (Arizmendi, 2019).

El diente radular es usado una vez, si el ataque es exitoso, el diente es ingerido entero junto con la presa, pero si es fallido, el diente es desechado y un nuevo diente es montado en la probóscide listo para otro ataque.

El veneno de cada caracol está constituido por alrededor de 100 a 200 pequeñas proteínas (péptidos)

diferentes, los cuales se encuentran clasificados en familias y superfamilias. Están formados por entre 7 a 40 aminoácidos, aunque la mayoría contiene solo entre 12 y 30 aminoácidos.

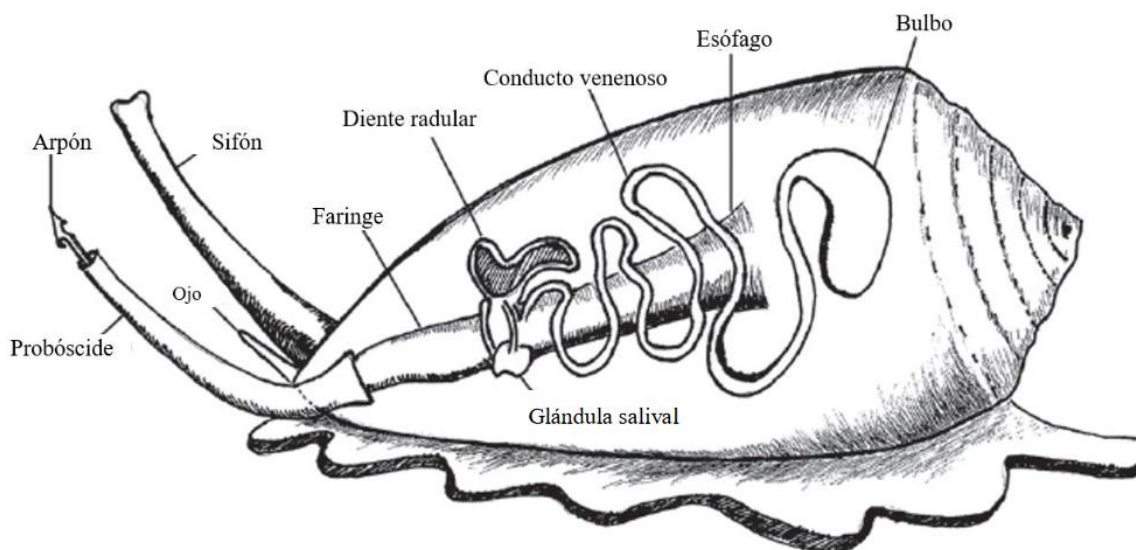


Figura 1. Esquema representativo del aparato venenoso de *Conus* spp.

La producción y liberación del veneno de los conos involucran tres pasos generales:

1. Biosíntesis, procesamiento y empaquetamiento de toxinas.
2. Generación, almacenamiento y transferencia de dientes radulares a la probóscide.
3. Inyección del diente sobre la presa y liberación del veneno.

Una característica común de estos péptidos es la presencia de varios residuos del aminoácido cisteína a lo largo de su estructura primaria. Estos permiten la formación de enlaces disulfuro a lo largo de la molécula que le brindan una alta estabilidad. Los residuos de cisteínas están presentes en patrones definidos, lo cual ha permitido clasificar a los péptidos de acuerdo con este criterio; los miembros de cada clase estructural pueden tener el mismo o diferente blanco de acción. Por ejemplo, el patrón C-C-CC-C-C (“C” indica una cisteína, mientras que “-” indica uno o más aminoácidos que no son cisteína) es típico de las ω -conotoxinas, mientras que la disposición CC-C-C corresponde a las α -conotoxinas (Lewis et al., 2012).

Las conotoxinas tienen la propiedad de ser toxinas más pequeñas que las de otros animales venenosos, como víboras, alacranes y arañas. La longitud de las toxinas de estos organismos suele oscilar entre 40 a 80 aminoácidos o más. Debido a su bajo tamaño molecular, las conotoxinas pueden difundirse

rápidamente a través de los tejidos de sus presas, alcanzando sus blancos moleculares en lapsos breves. Diferentes investigaciones enfocadas en estos péptidos ricos en enlaces disulfuro, como las conotoxinas o conopeptidos han mostrado tener un alto potencial farmacéutico (Lopez y Aguilar, 2006).

1.1.4 Conotoxinas

Las conotoxinas representan un grupo de oligopéptidos relativamente cortos aislados del veneno de gasterópodos marinos del género *Conus*. La mayoría de estos péptidos tienen de 12 a 30 aminoácidos. Las conotoxinas contienen un gran número de enlaces disulfuro, y actúan como notables inhibidores selectivos y moduladores de los canales iónicos (calcio, sodio, potasio), receptores nicotínicos de acetilcolina, transportadores de noradrenalina, receptores de N-metil-D-aspartato y receptores de neurotensina (Fedosov, et al., 2012).

Las primeras conotoxinas se aislaron y caracterizaron hace más de treinta años y el número de estudios sobre conotoxinas está creciendo exponencialmente. La gran atención a las conotoxinas se explica por su excepcional actividad fisiológica observada durante la administración de conotoxinas a vertebrados y algunos invertebrados.

La mayoría de las conotoxinas conocidas interactúan con los canales iónicos y, por lo tanto, influyen en la propagación del impulso nervioso y conducción neuromuscular. Este grupo de compuestos se caracteriza por la combinación de diversos mecanismos de acción sobre los canales iónicos de vertebrados e invertebrados con una acción altamente específica de cada conotoxina en particular. Esto hace que las conotoxinas sean una herramienta útil para los estudios del funcionamiento de varios tipos de canales iónicos que muestran una sensibilidad altamente selectiva a ciertas conotoxinas. Por lo tanto, las conotoxinas son aplicables para estudios de estructura y cinética molecular de canales iónicos y su papel en la formación y propagación de potenciales de acción y en la transmisión sináptica, así como la aplicación a enfermedades que presentan canalopatías, como el cáncer (Mir et al., 2016).

Por ejemplo, el descubrimiento de la ω -conotoxina GVIA, un antagonista de canales de calcio dependientes de voltaje permitió su amplio uso en estudios posteriores del funcionamiento de los canales iónicos, que desempeñó un papel importante en la neurofisiología. Por otro lado, la alta especificidad molecular y la eficacia en dosis bajas hacen de las conotoxinas un recurso prometedor para la farmacología.

Los efectos biológicos ejercidos por cualquier veneno de caracol cónico son la función combinada de los objetivos o receptores fisiológicos con los que se unen los componentes individuales de la toxina. Los péptidos conocidos como α -conotoxinas son herramientas importantes para discriminar entre subtipos de nAChRs (receptores nicotínicos de acetilcolina) estrechamente relacionados. Mientras que, cinco de los siete sitios objetivo de los fármacos presentes en los canales de sodio dependientes de voltaje de vertebrados están definidos por toxinas animales. Los conopéptidos exhiben actividades antinociceptivas, antiepilépticas, neuroprotectoras y/o cardioprotectoras y, por lo tanto, tienen aplicaciones farmacológicas en cáncer, trastornos neuromusculares y psiquiátricos (Luo et al., 2015).

El interés en aprovechar al veneno de caracol para diseñar terapias novedosas radica en la exactitud y prontitud con la que actúan los diversos péptidos componentes; la mayoría de ellos se dirigen solo a una clase de receptor en particular, excluyendo al resto. Esto indica que pueden generar un efecto específico en las vías metabólicas del cuerpo sin efectos secundarios de manera confiable y rápida; como la reducción instantánea de la frecuencia cardíaca o la interrupción de la señalización de una clase particular de nervio, por ejemplo, los receptores del dolor. En la actualidad, los receptores diana conocidos de los péptidos de *Conus* se dividen ampliamente en las siguientes tres clases: (a) canales iónicos activados por ligando; (b) canales iónicos dependientes de voltaje; y (c) otros.

1.1.5 Canales iónicos y su relación con el cáncer

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el paso de iones a través de gradientes electroquímicos. Son clasificados por el tipo de ion que transporta y por el mecanismo por el cual se abre o se cierra. Los canales iónicos, en general, tienen un papel de vital importancia en funciones celulares, como contracción, ciclo celular, excitabilidad y metabolismo.

Los canales iónicos se encuentran de manera esencial en las células de todas las especies, tienen diversos roles fisiológicos en mamíferos a través de la regulación de varios procesos, como excitabilidad de los nervios, músculos, secreción hormonal, proliferación celular, transducción sensorial, equilibrio osmótico y electrolítico, actividad enzimática, expresión de genes, comunicación intercelular, regulación de la presión sanguínea e incluso procesos sinápticos de memoria y aprendizaje. De estos canales existen 3 grandes subdivisiones (Prevarskaya et al., 2018):

- **Canales dependientes de voltaje:** Son canales que presentan actividad cuando hay un cambio de voltaje en la membrana. Son responsables de la generación, estructura y transmisión de señales eléctricas de la célula.
- **Canales dependientes de ligando:** Son activados por la unión de sus respectivos agonistas. Están formados por 5 subunidades, cada una con 4 dominios transmembrana (M1-M4). Son responsables de mediar la transmisión sináptica de la célula y se agrupan según su estructura y función. Existen receptores activados por acetilcolina (Ach), serotonina, GABA o glicina, los receptores de glutamato y los receptores de ATP, que son receptores purinérgicos.
- **Canales regulados por proteínas G:** Pueden operar inhibiendo a proteínas efectoras, regulando el canal a través de segundos mensajeros o cinasas y mediante la asociación física directa entre las subunidades de la proteína G y el canal iónico.

Sin embargo, el conocimiento sobre la relación entre canales iónicos y los procesos de regulación de división celular, apoptosis, invasión y metástasis es poco conocido (Fedosov et al., 2012).

Todos los organismos regulan las señales eléctricas mediante proteínas de membrana especializadas, o también conocidos como canales iónicos y estos son esenciales para la transducción de señales. Por otra parte, existen anomalías relacionadas al mal funcionamiento de estos canales iónicos, las cuales son llamadas canalopatías. Las canalopatías son desórdenes causados por mutaciones de los genes que codifican los canales iónicos. Estas enfermedades se pueden presentar con base a dos conceptos: *heterogeneidad fenotípica*, que presenta mutaciones en el mismo gen causando diferentes enfermedades; el segundo es la *heterogeneidad genética*, con mutaciones en diferentes genes que derivan en enfermedades similares.

Los canales iónicos presentes en la membrana plasmática tienen amplia accesibilidad y por lo general, son expresados a concentraciones bajas en las células y tejidos específicos, lo que genera que sean buenos blancos terapéuticos para novedosos fármacos. Algunas anomalías en canales iónicos están asociadas a un descontrol en la proliferación celular y por ende, al cáncer. Estudios recientes han indicado que la sobreexpresión de algunos canales puede estar ligado al comportamiento biológico de líneas celulares tumorales específicas. Por ejemplo, la sobreexpresión de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), que son canales dependientes de ligando, está relacionado al crecimiento y proliferación de líneas tumorales de cáncer de mama y de pulmón (Sun et al., 2020).

1.1.6 Receptores nicotínicos de acetilcolina

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) pertenecen a los canales iónicos dependientes de ligando y están compuestos por subunidades transmembranales que comparten un origen evolutivo común. Las diferentes subunidades de estos receptores pueden formar homopentámeros o heteropentámeros y así formar un canal iónico central por donde se realizará el intercambio iónico al unirse su ligando natural (acetilcolina). Los nAChR son expresados en la membrana celular de todas las células de mamíferos incluidas las células cancerosas (Fedosov et al., 2012).

Los nAChR no solo median las respuestas fisiológicas normales, como la inflamación y el dolor, sino también participan en la regulación de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y ventajosamente en cánceres.

Existen dos tipos de nAChR en vertebrados: los tipo muscular, encontrados en la parte postsináptica en la placa neuromuscular y los tipo neuronal presentes en el sistema nervioso periférico y central. En el caso de los receptores musculares estas subunidades son $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ en músculo fetal, con la sustitución de la subunidad γ por la subunidad ϵ en el adulto. A diferencia de éstos, los receptores neuronales sólo están constituidos por combinaciones de subunidades α y β , siendo la subunidad α donde se encuentra el sitio de unión de acetilcolina y con ello de la activación del canal. Sin embargo, nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) han sido clonadas. Por lo que diferentes subunidades de nAChR pueden combinarse de varias maneras, con propiedades farmacológicas y electrofisiológicas distintas (Lopez, 2010).

Los nAChR $\alpha 7$ y $\alpha 9$ son encontrados mayoritariamente en células cancerosas de mama. Creciente evidencia sugiere que la activación de $\alpha 7$ -nAChR conduce a la activación de las cascadas de señalización ERK/MAPK y JAK2/PI3K en células de cáncer de mama. Además, Luo et al. (2021) informaron que el $\alpha 9$ -nAChR era altamente correlacionado con el cáncer de mama, y la estimulación del $\alpha 9$ -nAChR condujo al crecimiento del cáncer de mama. Estos resultados implican que los $\alpha 9$ -nAChRs detectados en células de cáncer de mama humano podrían usarse como un nuevo objetivo molecular terapéutico para el tratamiento de algunos cánceres, en específico de mama (Sun et al., 2020).

Como antagonistas de los nAChR, las α -conotoxinas pueden ser utilizadas para descifrar las funciones farmacológicas de estos receptores, y algunas de ellas también tienen potencial terapéutico para tratamientos contra el cáncer.

1.1.7 Cáncer de mama triple negativo

Las células mamarias normales tienen receptores que responden a hormonas como el estrógeno y la progesterona, lo que les permite crecer y retroceder en respuesta al nivel hormonal. Los receptores hormonales pueden o no estar presentes en el cáncer de mama. Alrededor de dos tercios de los cánceres de mama son "positivos" y contienen estos receptores como lo hacen las células mamarias normales. Estos son cánceres menos agresivos que tienen menos probabilidades de necesitar quimioterapia y, a menudo, se tratan con terapia hormonal y cirugía. La radiación puede o no ser necesaria (Yin et al., 2020).

El cáncer de mama triple negativo es cualquier cáncer que da negativo en tres de las cosas principales (las hormonas estrógeno y progesterona y una proteína llamada HER2) que impulsan otras formas de la enfermedad. Saber eso ayuda a los médicos a descubrir la mejor manera de tratarlo. Eso es importante porque el cáncer de mama triple negativo es más agresivo que otras formas. Es más probable que se haya extendido más allá de su seno en el momento en que se encuentra, y existe una mayor probabilidad de que regrese dentro de los primeros 3 años después del tratamiento. También es más probable que sea fatal dentro de los primeros 5 años.

Es por eso por lo que se propone necesario indagar en nuevas estrategias o moléculas terapéuticas con actividad antiproliferativa que disminuyan los efectos secundarios aumentando la tasa de especificidad con este tipo de cáncer que mantiene inactiva la vía hormonal. Este acercamiento es posible a través de los antecedentes ya descritos del funcionamiento dirigido de las conotoxinas a través de la regulación por canales iónicos dependientes de ligando, en específico de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Changeux, 2020).

1.2 Justificación

El cáncer de mama sigue siendo un importante problema de salud sin resolver, aunado a que los tratamientos quimioterapéuticos actuales suelen tener amplias afectaciones secundarias con baja resolución del problema. Asimismo, se relacionan a los receptores nicotínicos de acetilcolina como moduladores de la proliferación celular, metástasis y apoptosis en el cáncer de mama.

Por otro lado, los caracoles marinos del género *Conus* son una fuente de diversos péptidos que actúan como moduladores de receptores iónicos, estos compuestos abren un gran campo de estudio para el

desarrollo de nuevas terapias. Como antagonistas competitivos de los nAChR, las α -conotoxinas han sido particularmente útiles en el desarrollo de ligandos que se dirigen selectivamente a un subtipo de nAChR sobre otro y pueden tener un papel importante en un nuevo enfoque que permita la disminución en la proliferación del cáncer, específicamente de mama.

1.3 Hipótesis

Las toxinas provenientes de caracoles marinos de la familia Conidae presentan actividad reguladora del ciclo celular en las líneas celulares de cáncer de mama de tipo triple negativo MDA-MB-157 y MDA MB 231.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar e identificar distintas conotoxinas sintéticas derivadas del veneno de caracoles marinos que presenten actividad reguladora del ciclo celular sobre las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-157 y MDA MB 231.

1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar las subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) expresadas de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA MB 231 y MDA MB 157.
- Estandarizar protocolos previos para evaluar la actividad reguladora del ciclo celular en líneas de cáncer de mama triple negativo MDA MB 231 y MDA MB 157.
- Evaluar la actividad de diferentes conotoxinas en la viabilidad celular de líneas de cáncer de mama triple negativo MDA MB 231 y MDA MB 157.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama

2.1.1 Preparación de material y equipo

Se trabajó con dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo: MDA-MB-157 y MDA MB 231 (Tabla 1), dentro de una campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, LABCONCO).

Tabla 1. Características de las líneas celulares de cáncer de mama (ATCC).

Línea celular	Enfermedad	Características	Medio de cultivo	Radio de expansión
MDA MB 231	Adenocarcinoma epitelial	Células adherentes Morfología: epitelial (fusiforme)	Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) para contener L-glutamina 4 mM, 4500 mg/L de glucosa, piruvato de sodio 1 mM y 1500 mg/L de bicarbonato de sodio.	1:2 a 1:8
MDA MB 157	Carcinoma medular	Células adherentes Morfología: epitelial (fusiforme)	Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) para contener L-glutamina 4 mM, 4500 mg/L de glucosa, piruvato de sodio 1 mM y 1500 mg/L de bicarbonato de sodio	1:2 a 1:4

Se trabajó en condiciones de asepsia limpiando y esterilizando previamente el material y equipo utilizado con alcohol etílico al 70%. El medio de cultivo fue suplementado con antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina 10 000 unidades/ml, estreptomina 10 000 µg/ml y anfotericina B 25 µg/ml, Gibco®) y suero fetal bovino (BFS) (Life Technologies) al 10%.

2.1.2 Activación de líneas celulares

A partir de un primer criovial almacenado, se descongeló en un baño maría (37°C) y se colocó inmediatamente a un tubo Falcon que contenía 9 ml de medio de cultivo completo. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 800 rcf durante 5 min. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo completo, el cual fue colocado en una placa de cultivo celular (tratada para crecimiento de tejido, área de cultivo 55 cm²) en un volumen total de medio de 8 ml. Finalmente, el cultivo fue incubado a 37°C con una atmósfera parcial de CO₂ al 5% durante 24 h.

2.1.3 Mantenimiento celular

Las células fueron monitoreadas diariamente en un microscopio invertido Axiovert 200 (Zeiss) por contraste de fase con un objetivo de 4x a 40x. Se realizaron lavados con solución amortiguadora de fosfatos a 1X (PBS) y se hicieron cambios de medio de cultivo de la caja tres veces por semana, requerido de acuerdo con el procedimiento sugerido por ATCC para cada línea celular. Las células eran despegadas de la caja mediante método enzimático utilizando Tripsina-EDTA 0.25% una vez alcanzado el 80% de confluencia poblacional en la monocapa celular.

2.1.3.1 Desprendimiento de líneas celulares

Se utilizó la enzima tripsina para separar las células de la placa a la que están adheridas. Al observar en el microscopio invertido, al menos, un 80% de confluencia de población celular en la monocapa celular, era necesario realizar una disminución de la población celular para su mantenimiento. Primeramente, se retiraba el medio de cultivo de la caja con ayuda de una bomba de succión, después se adicionaban 8 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) para retirar el excedente de medio de cultivo. Se retiraba el PBS con la bomba de succión y se agregaba 1 ml de enzima tripsina (Tripsina-EDTA 0.25%, rojo fenol de Gibco® a 1X). La tripsina tiene un tiempo de acción de aproximadamente 5 min para desprender las células adheridas, posterior a este tiempo, se añadieron 4 ml de medio completo para inhibir la tripsina, se homogeneizó la suspensión y se transfirió a un tubo cónico de 50 ml.

2.1.3.2 Expansión de cultivo

Se transfirió 1-2 ml de la suspensión previamente homogeneizada (punto 2.1.3.1) a una caja nueva con el número de células correspondientes al pase y se adicionó 6-7 ml de medio. Se colocó la caja nuevamente en la incubadora a una temperatura de 37°C al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Los radios de expansión correspondientes a cada línea celular se encuentran en la Tabla 1.

2.1.3.3 Conteo celular

Se utilizó un hematocitómetro para realizar el conteo celular. Se preparó una solución 1:1 con 10 µl de la suspensión celular (obtenida del punto 2.1.3.1) y 10 µl de colorante azul tripano (Trypan Blue Stain al 0.4%) de Gibco® 10X, diluido en PBS 1X, dilución 1:10). Se agregaron 10 µl de esta dilución en la cámara del hematocitómetro. Se contabilizaron las células vivas por cuadrante y se sumaron. Para calcular el número de células por mililitro de solución se aplicó la siguiente fórmula:

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

2.1.4 Criopreservado de líneas celulares

La suspensión celular del punto 2.1.3.1 fue centrifugada a 800 rcf por 5 min, descartando el sobrenadante. Posteriormente, se añadió medio de cultivo suplementado al 5% de DMSO. Se separó en crioviales de 1 ml de volumen total (con un rango aproximado de 2 a 2.5 millones de células por vial) y se pasaron al recipiente de congelación Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ para pasarlo al ultrancongelador a -80°C.

2.2 Caracterización de receptores nicotínicos de acetilcolina

2.2.1 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN de las células en monocapa con TRI Reagent® Solution de Applied Biosystems acorde a las especificaciones del fabricante. Los ciclos del termociclador fueron modificados. Se utilizó RNAsa away

y etanol al 70% para limpiar el material (gradillas, micropipetas, etc.) y el área de trabajo. Se lisaron las células de las placas de cultivo con tripsina posterior a retirar el medio, se agregó 1 ml de TRI Reagent® por cada 10 cm² de superficie, se homogenizó y transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml. Con el propósito de permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 100 µl de 1-bromo-3-cloropentano (BCP, 99%, ACROS Organics™) por cada ml de reactivo TRI Reagent® usado para lisar. Se agitó vigorosamente e incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó la muestra durante 15 min a 12 000 rpm. Se recuperó la fase acuosa que contiene el ARN y se transfirió a un tubo nuevo.

Se añadieron 500 µl de isopropanol por cada ml de TRI Reagent® usado, se agitó con un mezclador de vórtice por 10 segundos y se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 12 000 rpm por 8 min. El ARN se sedimentó en el fondo del tubo y se retiró el sobrenadante. Se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de reactivo TRI Reagent® utilizado. Se centrifugó a 7 500 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento por 10 min al aire. Por último, el ARN se resuspendió en 20 µl de agua con pirocarbonato de dietilo (DEPC ≥ 97%, Sigma-Aldrich) al 0.1%.

El ARN total fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific™. La integridad de la muestra fue visualizada en un gel de agarosa al 1.5% disuelto en 50 ml de buffer TAE 1X.

2.2.2 Retrotranscripción del ARN a ADNc

Se utilizó el kit Superscript™ III Reverse Transcriptase de Invitrogen™. En un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas, se agregaron los siguientes componentes: 0.5 µl de oligo (dT)₂₀ (50µM), 0.5 µl de hexámeros aleatorios (*random hexamers*), 5 µg de ARN total en 6 µl y 1 µl de buffer de templado (*annealing buffer*).

La mezcla fue precalentada a 65°C durante 5 min y se incubó en hielo durante un minuto, después se le agregaron 10 µl de mezcla de reacción (2X First-Strand Reaction Mix) y 2 µl de enzima (Superscript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix). Se procedió a incubar a 25°C durante 10 min, para después aumentar la temperatura de reacción a 50°C por 50 min y por último a 85°C por 5 min. Posterior a concluir la retrotranscripción, se procedió a realizar amplificación de genes por PCR de punto final con el ADNc resultante.

2.2.3 Amplificación de genes por PCR

Se realizó una amplificación de genes con el ADNc resultante del punto 2.2.2. La secuencia y el número de referencia (clave GenBank) de los cebadores utilizados se muestra en la Tabla 2. Se utilizó β -actina como gen de referencia y se buscó la caracterización de las subunidades α 3, α 4, α 5, α 7, α 9, α 10, β 2 y β 4 de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en las líneas celulares empleadas.

Tabla 2. Cebadores utilizados en el análisis de genes por PCR.

Receptor	Secuencia	Tf (°C)	Pb	Genbank ID
β -actina	S: GCGAGAAGATGACCCAGATC A: CCAGTGGTACGGCCAGAGG	S: 57.85 A: 62.02	103	NM_001101
α 3-nAChR	S: CTGGTGAAGGTGGATGAAGT A: CTCGCAGCAGTTGTTACTTGA	S: 57.13 A: 58.22	465	NM_001166694.1
α 4-nAChR	S: GGATGAGAAGAACCAGATGA A: CTCGTA CTCTGGTGTTGT	S: 56.75 A: 56.50	463	NM_001256573.2
α 5-nAChR	S: TCAACACATAATGCCATGGC A: CCTCACGGACATCATTTTCC	S: 56.75 A: 56.60	220	NM_000745.4
α 7-nAChR	S: GCCAATGACTCGCAACCACTC A: CCAGCGTACATCGATGTAGCA	S: 62.13 A: 60.27	336	NM_000746.6
α 9-nAChR	S: GACTGAGAGCTGCAGAGACG A: AATCTGCAGGGTCACATTCA	S: 60.18 A: 57.11	131	NM_017581.3
α 10-nAChR	S: AGCTGTTCCGTGACCTCTTT A: TGTCGATGATCTGGGACAGT	S: 59.24 A: 58.15	111	NM_020402.2
β 2-nAChR	S: ATGACCAGAGCGTGAGTGAG A: AAGAGAGGCTGCAGGAACAT	S: 59.47 A: 59.01	121	NM_000748.2
β 4-nAChR	S: TGTGCAGGAGGCATTAGAAG A: GACGCACACAAACATGAACA	S: 57.59 A: 57.53	145	NM_000750.3

S: sentido; A: antisentido; Pb: pares de bases; Tf: temperatura fusión

Previo a la amplificación por PCR se preparó un mix que contenía: 307.5 μ l de agua libre de nucleasas, 100 μ l de Buffer Green GoTaq Flexi 5X, 60 μ l de cloruro de magnesio [25 mM], 10 μ l de dNTPs [2.5 mM c/u] y por último 2.5 μ l de enzima GoTaq Polimerasa. El volumen final de este mix fue de 480 μ l que posteriormente se distribuyeron en nueve microtubos para PCR con 48 μ l a cada uno. A cada tubo se le agregó 1 μ l de cebador sentido y 1 μ l de cebador antisentido de cada gen a caracterizar (tabla 2) y posteriormente se separaron en 2 tubos equitativamente para obtener microtubos con 25 μ l de solución. La mitad de los microtubos se utilizaron como control negativo, es decir, no contenía ADNc, mientras que la otra mitad se les agregó 2 μ l con 50 ng de ADNc para llevarlos al termociclador posteriormente.

Una vez colocados los microtubos en el termociclador, se configuraron las siguientes condiciones

mostradas en la tabla 3.

Tabla 2. Condiciones del termociclador para amplificación de genes.

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
95°C	2 min	1
95°C	30 s	35
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	1
4°C	∞	

Al término de la reacción en el termociclador, las muestras fueron cargadas en un gel desnaturalizante para electroforesis (1.5% de agarosa) disuelto en TAE 1X. Se adicionaron 10 µl de bromuro de etidio. El gel, una vez cargado se corrió en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X, a 90 volts durante 45 min para posteriormente visualizar el resultado de la amplificación.

2.3 Ensayos para la evaluación de la viabilidad celular

2.3.1 Estandarización de protocolos para evaluación de la viabilidad celular

Con el fin de realizar ensayos de viabilidad celular que pudieran determinar la actividad reguladora del ciclo celular, se procedió a estandarizar los protocolos de evaluación previo a los ensayos de citotoxicidad. Se verificó que la población celular alcanzara la confluencia requerida (80-90%) sembrando distintas cantidades (5 000, 7 500, 10 000 y 15 000) de células por pozo en una microplaca de poliestireno transparente de 96 pozos Corning™. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante 24 h y se tomaron fotografías en un microscopio invertido para determinar el número de células por pozo que se utilizarían en los ensayos con ambas células (MDA MB 231 y MDA MB 157).

De la misma manera, se realizó un ensayo de viabilidad celular empleando el reactivo Dimetilsulfóxido (DMSO) como control positivo de muerte celular en ambas líneas celulares. Se aplicaron diferentes concentraciones del mismo para determinar el porcentaje de DMSO que se utilizaría en los ensayos al

disminuir la población celular al menos un 80% respecto al control negativo (células sin tratamiento) en un periodo de 24 h incubadas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Por último, se seleccionaron los controles y se realizaron tres ensayos independientes a la concentración con la que se probarían en los ensayos de viabilidad celular. De esta manera, se obtuvo una estandarización de los mismos y se comprobó su reproducibilidad con el fin de obtener información comparable al aplicar tratamientos en ensayos posteriores.

2.3.2 Ensayos de viabilidad celular

Tabla 3. Características generales de las conotoxinas sintéticas probadas.

Especie	Conotoxina	Masa molecular (g/mol)	Longitud (aa)	Modificaciones postraduccionales	Conectividad
<i>Californiconus californicus</i>	cal14.1b	1775.10	17	---	Globular 1-3, 2-4
	cal14.2c	1844.07	17	---	Globular 1-3, 2-4
	cal14.b	1904.22	17	---	Globular 1-3, 2-4
<i>Conus imperialis</i>	xm1a	1519.60	14	---	1-3, 2-4
	xm1b	1519.60	14	C terminal amidado	1-3, 2-4
	xm1c	1523.61	14	---	aC1-bC1 aC2-bC2
<i>Conasprella ximenes</i>	lm1	1355.5	12	C terminal amidado	1-3, 2-4
	lm1b	1369.63	12	C terminal amidado	1-3, 2-4
<i>Conus victoriae</i>	vc1.1	1807.03	16	C terminal amidado	1-3, 2-4
	vc1.1b	1810.65	16	C terminal amidado	1-3, 2-4

Se utilizaron microplacas de poliestireno transparente de 96 pozos Corning™ para realizar los ensayos de viabilidad celular. Se sembraron ambas líneas celulares por separado, con un número estandarizado para los ensayos de 10 000 células por pozo en un volumen final de trabajo de 100 µl. Las células sembradas se

incubaron durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Se agregaron los controles y tratamientos (conotoxinas) seleccionados para los ensayos. Las 10 conotoxinas sintéticas resuspendidos en 1 ml de PBS 1X estéril se encontraban a una concentración inicial de 1 mg/ml. Los tratamientos iniciales se realizaron a una concentración de 50 µg/ml.

Como controles positivos (C+) se utilizaron: cisplatino a 100 µg/ml (332 µM) (fármaco quimioterapéutico de primera línea para diferentes tipos de cáncer) y 5-Fluorouracilo (5-FU) (fármaco terapéutico antimetabolito para tratamiento de distintos tipos de cáncer) a 100 µg/ml (768 µM). Adicionalmente, se colocó un control de DMSO (compuesto orgánico ampliamente utilizado en cultivo celular, es tóxico a ciertas concentraciones) para comparar la muerte celular inducida en los ensayos.

El control negativo (C-) fueron las células sin tratar y para eliminar el fondo de placa se colocó medio de cultivo sin células. Una vez colocados los tratamientos y controles, se incubó la placa de cultivo a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa por 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 µl de solución de medio de cultivo con reactivo CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay en relación 10:1 y se incubó por 3 h bajo las mismas condiciones anteriores.

Después de 3 h la placa de cultivo fue leída en un microlector de placas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc) usando el Software Gen5 versión 2.01, a una longitud de onda de 490 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.3.3 Análisis de ensayos de viabilidad celular

Los resultados obtenidos de absorbancia (ABS) fueron procesados mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \left[\frac{(ABS_{Tratamiento} - ABS_{Fondo de placa})}{ABS_{CO} - ABS_{Fondo de placa}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Se graficó la media y la desviación estándar. Posteriormente, se realizaron ANOVAs de una y dos vías dependiendo el requerimiento del análisis seguido de prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism® (Versión 9).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama

El cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo se realizó acorde a la descripción del punto 2.1. Se cultivaron dos líneas de cáncer de mama distintas; MDA MB 231 y MDA MB 157. En la figura 2 se muestran las fotografías de las líneas celulares con una confluencia del 80%. La respuesta a los tratamientos de ambas líneas celulares fue evaluada inicialmente, debido a que, a pesar de ser del mismo tejido y patología, presentan un origen distinto de génesis, y así mismo, responden de manera diferente a los tratamientos.

La línea celular MDA MB 231 es una de las más utilizadas para estudios experimentales *in vitro* de cáncer de mama triple negativo, esto quiere decir, que no tiene receptores para ER (estrógeno), PR (progesterona) ni sobre expresan el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2 por sus siglas en inglés). Al igual que esta línea celular, la línea MDA MB 157 utilizada en este estudio, es también denominada cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, el origen de formación es diferente para cada una de las líneas celulares. MDA MB 231 deriva de células de los conductos secretores de las glándulas mamarias, tratándose de un adenocarcinoma, mientras que MDA MB 157 es un carcinoma medular con origen en células epiteliales del revestimiento de la mama.

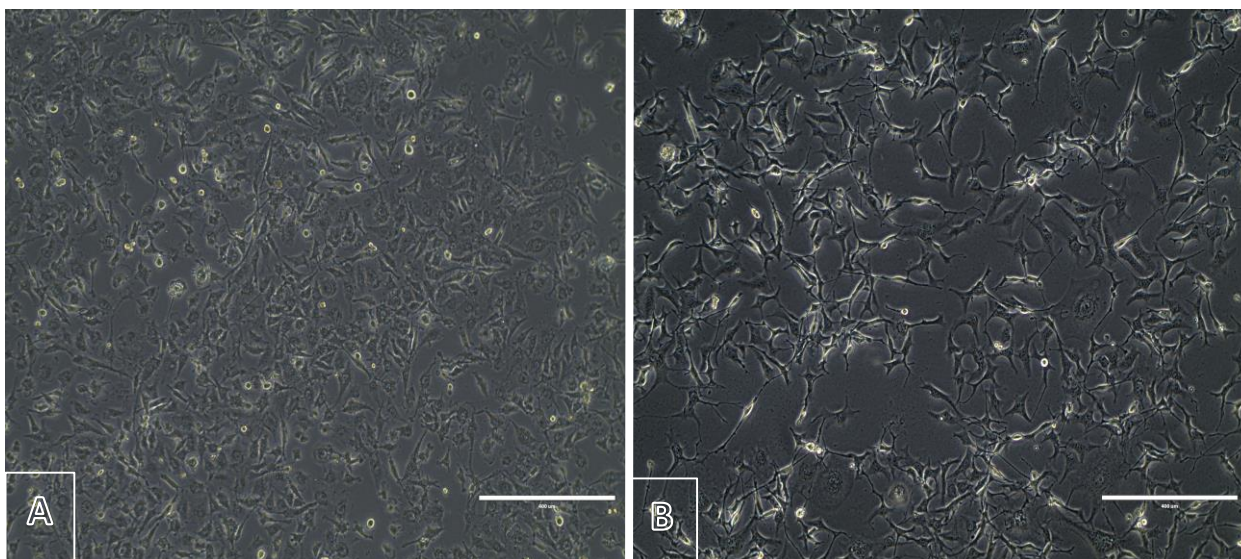


Figura 2. Fotografías de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. A) línea celular MDA MB 157 y B) línea celular MDA MB 231. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido con un objetivo de 10X.

3.2 Caracterización de receptores nicotínicos de acetilcolina

Se realizó la caracterización de la expresión de subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) de las líneas celulares MDA MB 231 y MDA MB 157, por medio de un ensayo de PCR. Se extrajo ARN de ambas líneas celulares utilizando el protocolo de TRITM Reagent marca Invitrogen®, de acuerdo al punto 2.2.1.

En la línea celular MDA MB 231 (Figura 3B) se puede observar en la imagen la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$, corroborando con la expresión del gen de referencia para β actina. En la línea celular MDA MB 157 se encontró la expresión de las subunidades de nAChRs $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 4$ (Figura 3).

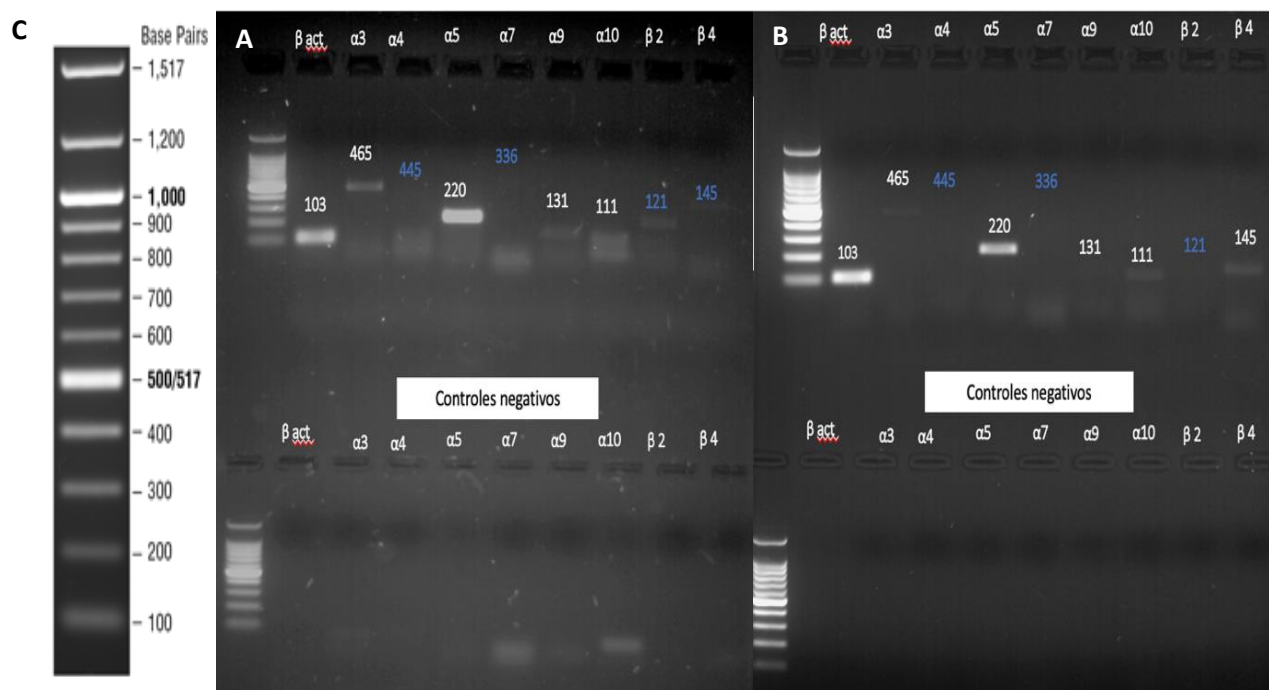


Figura 3. Amplificación de genes de las subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) mostrada por electroforesis en gels de agarosa (1.5%) de las líneas celulares A) MDA MB 231 y B) MDA MB 157. El número de pares de bases esperado para cada amplificación se encuentra por encima de cada línea de expresión, de color blanco si coincide, azul si no aparece o no coincide. Los controles negativos de amplificación (sin ADN) se muestran en la parte inferior de cada gel. C) La escalera de peso molecular de referencia se muestra del lado izquierdo.

La amplificación de las bandas se consideró válida si se observa claramente definida y su tamaño molecular coincide con el valor reportado en la base de datos. En la tabla 5 se observa la presencia o ausencia de las subunidades expresadas por cada línea celular, mostrando un arreglo muy parecido para ambas líneas celulares donde se expresan las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$.

Tabla 4. Comparación de la expresión de subunidades de receptores nAChR en las células de cáncer de mama.

	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 7$	$\alpha 9$	$\alpha 10$	$\beta 2$	$\beta 4$
MDA MB 231	*	-	*	-	*	*	-	*
MDA MB 157	*	-	*	-	*	*	-	-

*si se expresa, - no se expresa

La expresión de los genes de las subunidades de nAChR es mostrada en los geles de electroforesis de la figura 3 y en la tabla 5. EDebido a que estos resultados muestran que efectivamente, ambas líneas celulares, a pesar de ser cáncer de mama triple negativo, expresan diferentes subunidades de nAChRs. Por consecuente, surge la hipótesis de que alguna o varias de las conotoxinas empleadas en el estudio poseen actividad reguladora del ciclo celular sobre estas, ejerciendo acción en la cascada de señalización intracelular.

3.3 Ensayos para evaluación de la viabilidad celular

3.3.1 Estandarización de protocolos para ensayos de viabilidad celular

Como primera parte de los ensayos de viabilidad celular, se realizó la estandarización de los protocolos a seguir. Se cultivaron 5 000, 7 500, 10 000 y 15 000 células por pozo de ambas líneas celulares con el fin de seleccionar la confluencia estándar para las pruebas con los tratamientos.

El criterio para elegir el número de células por pozo fue la confluencia (población por caja) mostrada por la imagen, siendo un 80-90% la confluencia óptima para realizar las pruebas posteriores con los tratamientos, esto debido a que si se eligiera un 100%, las células tenderían a competir por nutrientes que no existen y el espacio en caja se terminaría. En el caso de la línea celular MDA MB 231 (Figura 4C) se decidió trabajar con 10 000 células por pozo para los ensayos de viabilidad celular.

De igual manera, se realizaron pruebas de confluencia por pozo a la línea celular MDA MB 157 (Figura 5) con el fin de estandarizar los ensayos de viabilidad celular posteriores. Se eligió igualmente, 10 000 células por pozo (Figura 5C) debido a que muestra una confluencia (población celular) cercana al 80% tras 24 h cultivadas en el medio.

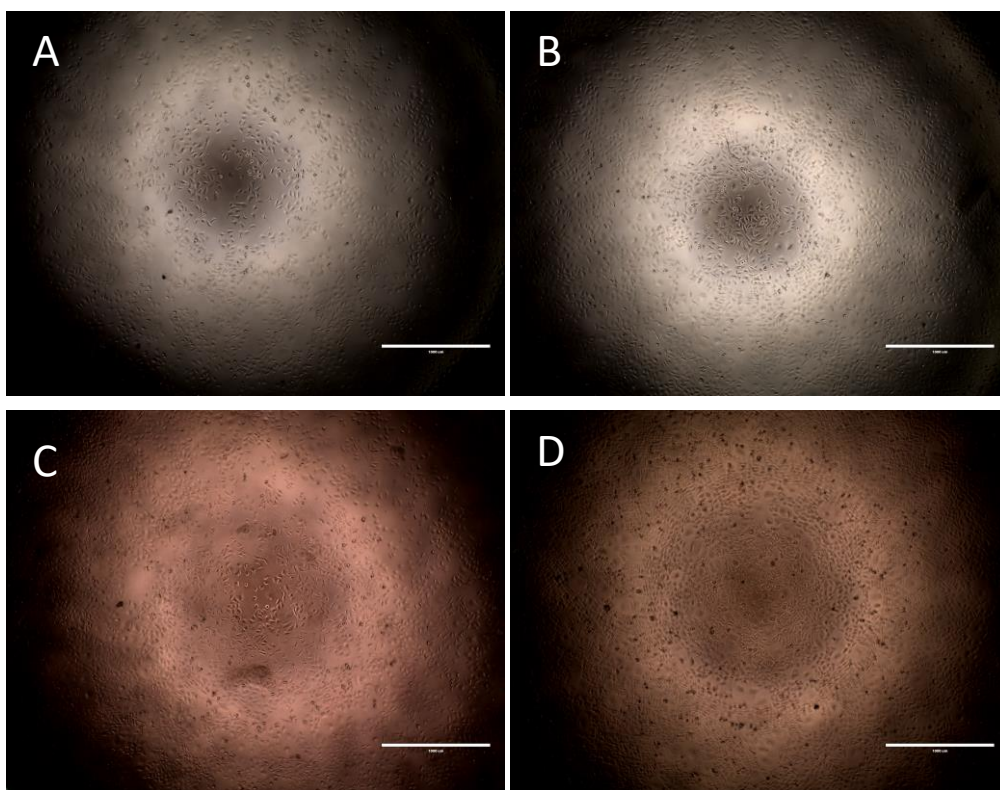


Figura 4. Fotografías de diferentes números de células MDA MB 231 cultivadas en una microplaca de 96 pozos. Cada imagen muestra la cantidad de células cultivadas en un solo pozo. A) 5 000 células, B) 7 500 células, C) 10 000 células y D) 15 000 células.

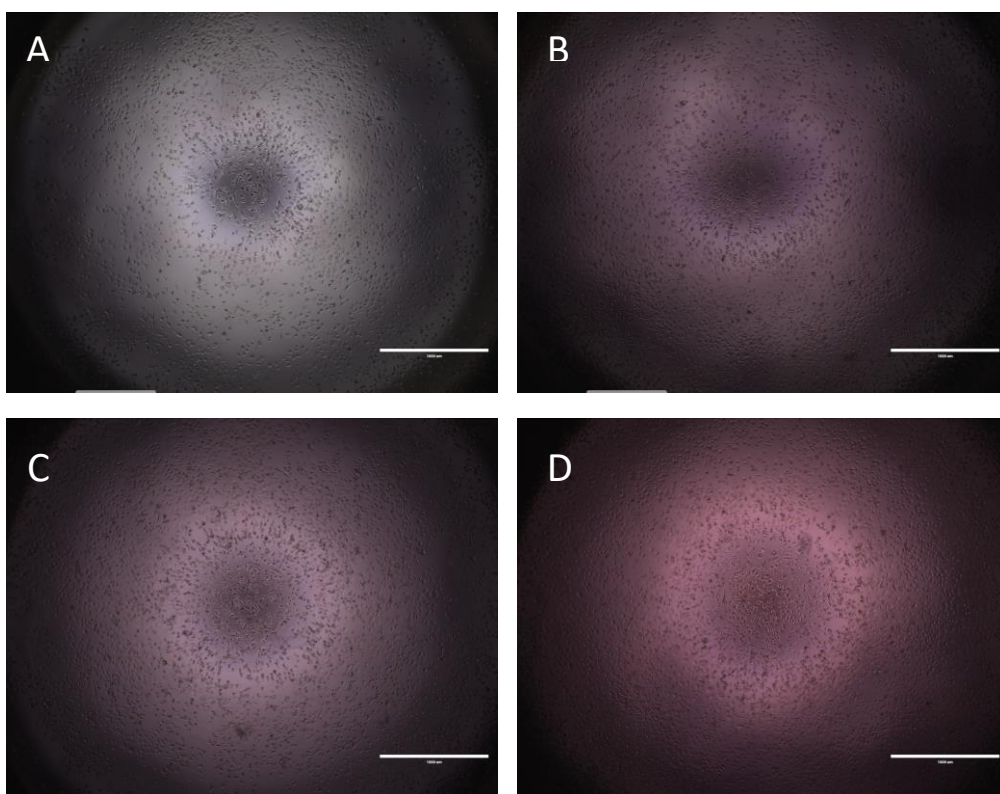


Figura 5. Fotografías de diferentes números de células MDA MB 157 cultivadas en una microplaca de 96 pozos. Cada imagen muestra la cantidad de células cultivadas en un solo pozo. A) 5 000 células, B) 7 500 células, C) 10 000 células y D) 15 000 células.

Como siguiente medida de estandarización, se probó el control positivo que se utilizaría en ensayos de viabilidad celular posteriores. Se propuso probar el DMSO a diferentes concentraciones en ambas líneas celulares con el propósito de determinar el porcentaje de este que diera una diferencia significativa proporcional a la muerte celular buscada.

Las concentraciones de DMSO evaluadas fueron: 0.1, 2.5, 5, 7.5 y 10%, y fueron contrastadas con un control sin DMSO (0%, Figura 6). En los resultados se observa que al 0.1% de DMSO no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. Mientras que, en el resto de las concentraciones de DMSO probadas, el porcentaje de viabilidad celular fue altamente significativamente menor respecto del tratamiento control. La concentración de 5% de DMSO fue la seleccionada para ser usada posteriormente, dado que por es la concentración menor de DMSO en la que se obtuvo un mayor porcentaje de muerte celular en ambas líneas celulares.

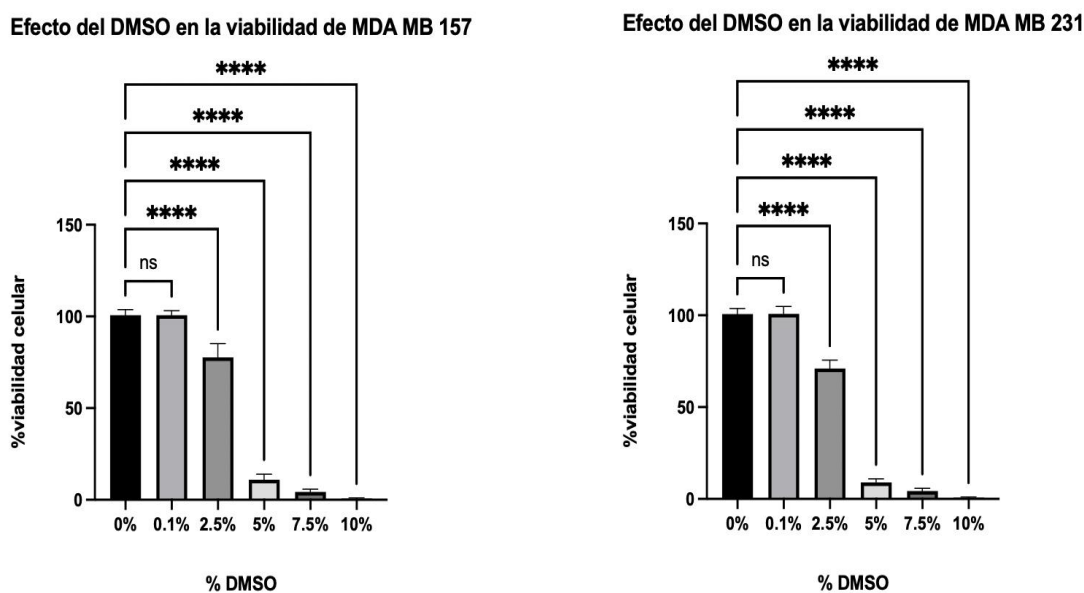


Figura 6. Gráficas del efecto de diferentes concentraciones de DMSO (%) en el porcentaje de viabilidad celular de las líneas MDA MB 231 y MDA MB 157. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples.

Por último, se probaron los controles a utilizar en los ensayos de viabilidad celular. Se utilizó cisplatino a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [332 μM], pues es considerado uno de los principales fármacos quimioterapéuticos para tratar diferentes tipos de cáncer. 5-Fluorouracilo [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$], un potente antimetabolito utilizado en el tratamiento contra el cáncer ejerciendo inhibición de la enzima timidilato sintasa, incorporando metabolitos en el ARN y ADN de las células, DMSO al 5% y agua destilada (H_2O dd). En la figura 7 se puede

observar en los gráficos una tendencia de muerte celular similar para cada ensayo independiente. Para este ensayo se utilizó la línea celular MDA MB 231. El agua destilada, como era de esperarse, no tuvo un efecto significativo comparado al control (células sin tratar). Sin embargo, al aplicar el cisplatino y el DMSO al 5%, la muerte celular alcanza porcentajes mayores al 90% con diferencias significativas respecto al control de células sin tratamiento. El compuesto 5-Fluorouracilo muestra un porcentaje de viabilidad celular aproximado de 25 a 30% pasadas 24 h con el tratamiento.

Posterior a este ensayo, se observó que la tendencia de viabilidad celular en los controles es semejante en los tres ensayos independientes. De esta manera, se determinó la estandarización de las condiciones de los controles para los ensayos de viabilidad celular con tratamientos.

3.3.2 Ensayos de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular, se utilizó el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, basado principalmente en un método colorimétrico que determina el número de células viables en proporción, ya que lo que en realidad mide este ensayo es la actividad metabólica de las mitocondrias en las células por acción enzimática.

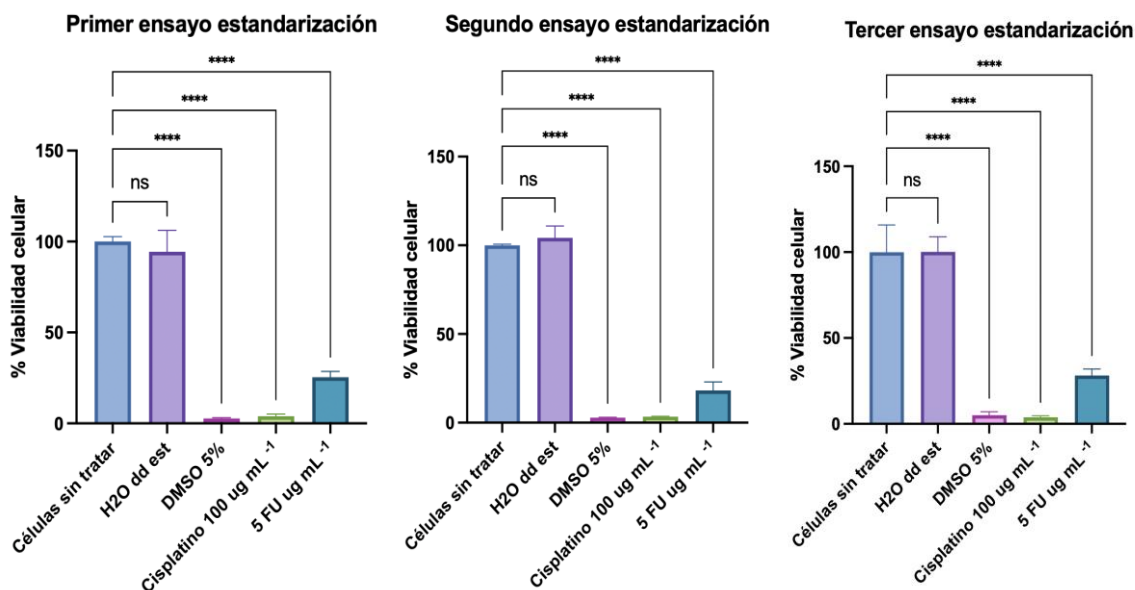


Figura 7. Gráficas de ensayos de estandarización de controles para pruebas de viabilidad celular. Ensayos realizados en línea celular MDA MB 231. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples.

El reactivo principal es un compuesto tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (sal MTS) y fenazina etodulfato (PMS, por sus siglas en inglés). El ensayo involucra la conversión del compuesto salino tetrazolio MTS a un producto de formazán que es soluble en el medio de cultivo y permite observar un cambio de color de un tono morado. La cantidad de producto de formazán es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el cultivo, medida a una absorbancia de 490 nm.

El primer ensayo de viabilidad celular fue realizado en la línea MDA MB 231 (Fig. 8A) por cuestiones de disponibilidad. La línea celular MDA MB 157, que también se probó en este estudio, mostró dificultades durante su etapa de crecimiento posterior a su primer pase, por lo que se comenzaron las pruebas aisladas con células MDA MB 231. En este ensayo se probaron nueve conotoxinas diferentes a la misma concentración [50 µg/ml]. Los controles positivos utilizados fueron cisplatino a 100 µg/ml, DMSO al 5% (previamente estandarizado) y 5-Fluorouracilo [100 µg/ml]. Como control negativo se utilizaron las células sin tratamiento (Blanco).

En el control con Cisplatino a 100 µg/ml, se mostró un efecto significativo al reducir la población celular a menos del 10% de viabilidad para el caso de la línea celular MDA MB 231. El control de DMSO al 5% mostró, de igual manera, un efecto significativo similar al del Cisplatino, disminuyendo la viabilidad celular a menos del 5%. En el caso de las células tratadas con conotoxinas, hubo un incremento en la viabilidad celular en todos los casos, siendo cal14.b la mayor viabilidad celular alcanzada tras 24 h con el tratamiento con un 171%. De igual manera, xm1b presentó un resultado significativo respecto al control de células sin tratamiento con un 162% de viabilidad celular. Las demás conotoxinas presentan un menor grado de significancia, sin embargo, sus valores de viabilidad celular son aproximados a un 150%. En este ensayo se utilizó 5-Fluorouracilo como control positivo, mostrando un 23% de viabilidad celular.

En el caso del primer ensayo con las células MDA MB 157 (Fig. 8B), los controles y tratamientos utilizados fueron los mismos que el primer ensayo con las células MDA MB 231. En esta línea celular se observa una disminución al 3% de viabilidad celular para el caso del control con DMSO al 5%. El cisplatino muestra una viabilidad celular del 8%, parecido al efecto en las células MDA MB 231 (Fig. 8A). En este ensayo no se observaron diferencias significativas respecto al control sin tratamiento en ninguna de las nueve conotoxinas probadas a una concentración de 50 µg/mL. Sin embargo, ninguna obtuvo un porcentaje mayor al 100% de viabilidad celular tras 24 h de exposición a los tratamientos. La menor disminución de población celular respecto al control la obtuvo cal14b, xm1b y vc1.1b con 93%, 91% y 88% de viabilidad celular respectivamente.

Ensayo viabilidad celular MDA MB 231 y MDA MB 157

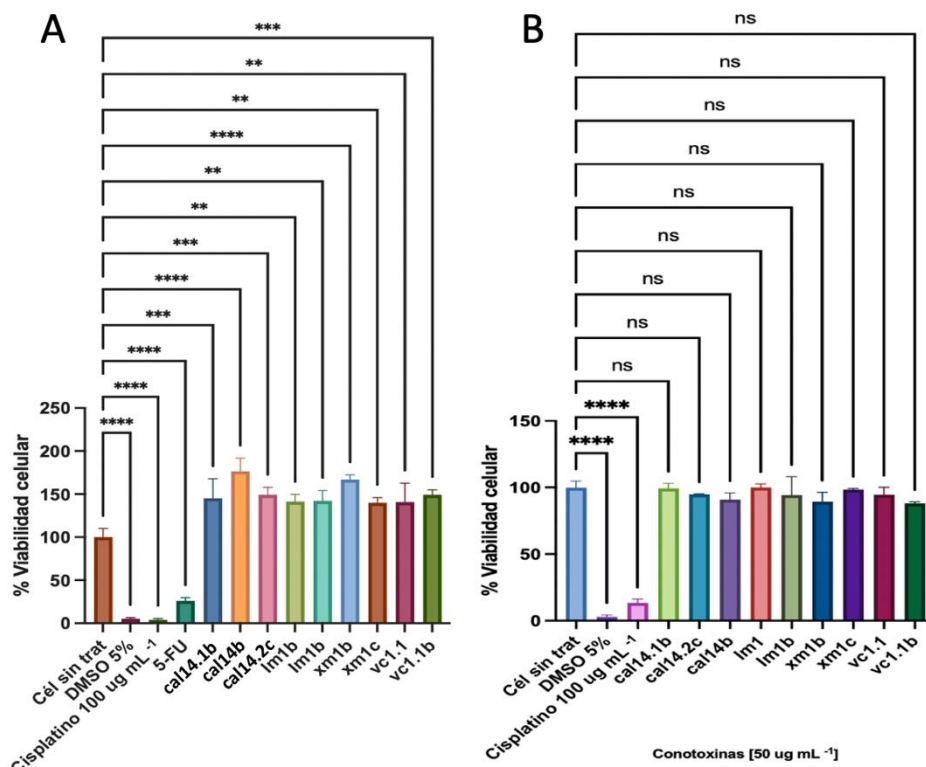


Figura 8. Primer ensayo de viabilidad celular en ambas líneas celulares A) MDA MB 231 y B) MDA MB 157. Nueve distintas conotoxinas se probaron en estos ensayos. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los controles positivos utilizados fueron: DMSO al 5% y Cisplatino [100 μ g/ml].

Debido a los primeros resultados en las líneas celulares, se decidió implementar un segundo ensayo de viabilidad celular con ambas células para corroborar el efecto, seleccionando cuatro conotoxinas que en el ensayo anterior mostraron tener un mayor efecto significativo: cal14b, xm1b, xm1c y vc1.1. Se emplearon esas cuatro conotoxinas a la misma concentración [50 μ g/mL] que los primeros ensayos y se utilizaron DMSO al 5% y Cisplatino [100 μ g/mL] como controles.

En este segundo ensayo se mostró solo una conotoxina con efecto, vc1.1 en las células MDA MB 231 obteniendo un grado de significancia y disminuyendo la viabilidad celular a un 92%. En las células MDA MB 157 no se observó efecto con ningún tratamiento, así como en las otras tres conotoxinas probadas en MDA MB 231. Los controles mostraron la misma tendencia que en ensayos anteriores.

Posterior al segundo ensayo, se tomó la decisión de repetirlo bajo las mismas condiciones, pero con otro pase celular más avanzado. En los primeros ensayos se trabajó con un pase menor al 10, mientras que en

este cuarto ensayo las células en cultivo se encontraban en un pase superior al 20.

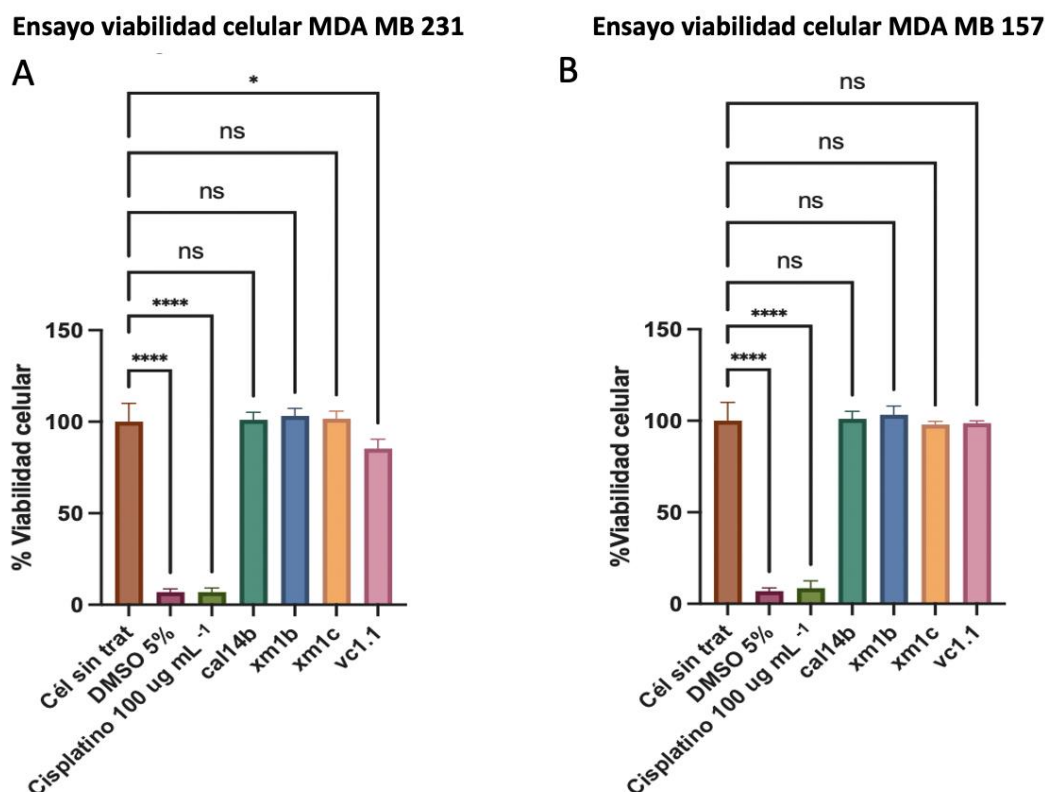


Figura 9. Segundo ensayo de viabilidad celular con ambas líneas celulares MDA MB 231 y MDA MB 157. Se utilizaron cuatro conotoxinas distintas como tratamientos, seleccionadas de resultados previos. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DS, prueba estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los controles positivos utilizados fueron: DMSO al 5% y Cisplatino [100 μ g/ml].

Las concentraciones y controles utilizados fueron los mismos. MDA MB 231 mostró actividad moduladora con las conotoxinas cal14b y xm1b con resultados altamente significativos ($p < 0.001$ y $p < 0.003$) respectivamente, con un porcentaje de viabilidad celular de 128 y 132% respecto al control sin tratamiento. Por otra parte, xm1c y vc1.1 no mostraron tener efecto en la proliferación celular para MDA MB 231. De una manera similar, cal14b y xm1b mostraron un efecto significativo ($p < 0.001$) y 121 y 124% de viabilidad celular en el ensayo con MDA MB 157. Y de nuevo, para esta línea, xm1c y vc1.1 no mostraron resultados significativos en esta línea celular ($p < 0.05$).

En un ensayo posterior se seleccionaron tres conotoxinas que en ensayos previos mostraron un efecto modulador en las células y se probaron a diferentes concentraciones para observar si el efecto era dependiente de la concentración. El siguiente ensayo se realizó con las células MDA MB 231 y se probaron las conotoxinas cal14.2c, xm1b y cal14b. Se seleccionaron dos concentraciones por debajo de lo ya

probado [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y dos concentraciones por encima. Se utilizó DMSO 5% como control positivo.

Ensayo viabilidad celular MDAMB231 Ensayo viabilidad celular MDA MB 157

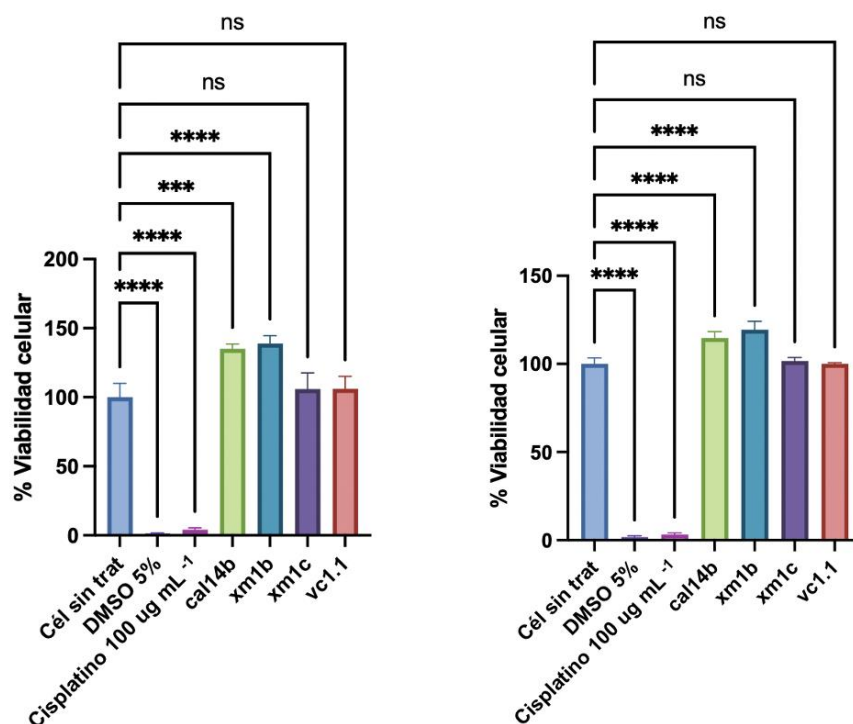


Figura 10. Tercer ensayo de viabilidad celular con ambas líneas celulares MDA MB 231 y MDA MB 157. Se utilizaron cuatro conotoxinas distintas como tratamientos, seleccionadas de resultados previos. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los controles positivos utilizados fueron: DMSO al 5% y Cisplatino [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

Los resultados de xm1b presentaron una pendiente positiva respecto a la concentración (a mayor concentración, mayor viabilidad), solo la concentración menor [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] presentó 1 grado de significancia respecto al control. Los demás resultados, incluso de las otras dos conotoxinas a todas las concentraciones, no presentaron un resultado significativo ($p > 0.5$). Los porcentajes de viabilidad no mostraron una disminución significativa de la viabilidad celular; sin embargo, contrario a resultados anteriores, se mostró una tendencia en la reducción de la misma respecto al control en todos los resultados de cal14.2c y xm1b. En el caso de cal14b solo la concentración de [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] mostró un ligero incremento en la viabilidad celular.

Se realizó un ensayo con las mismas características, pero en las células MDA MB 157. Para este ensayo se probaron las conotoxinas cal14b, vc1.1 y xm1b seleccionadas de ensayos anteriores con resultados significativos. En este ensayo se utilizó DMSO 5% y Cisplatino [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] como controles.

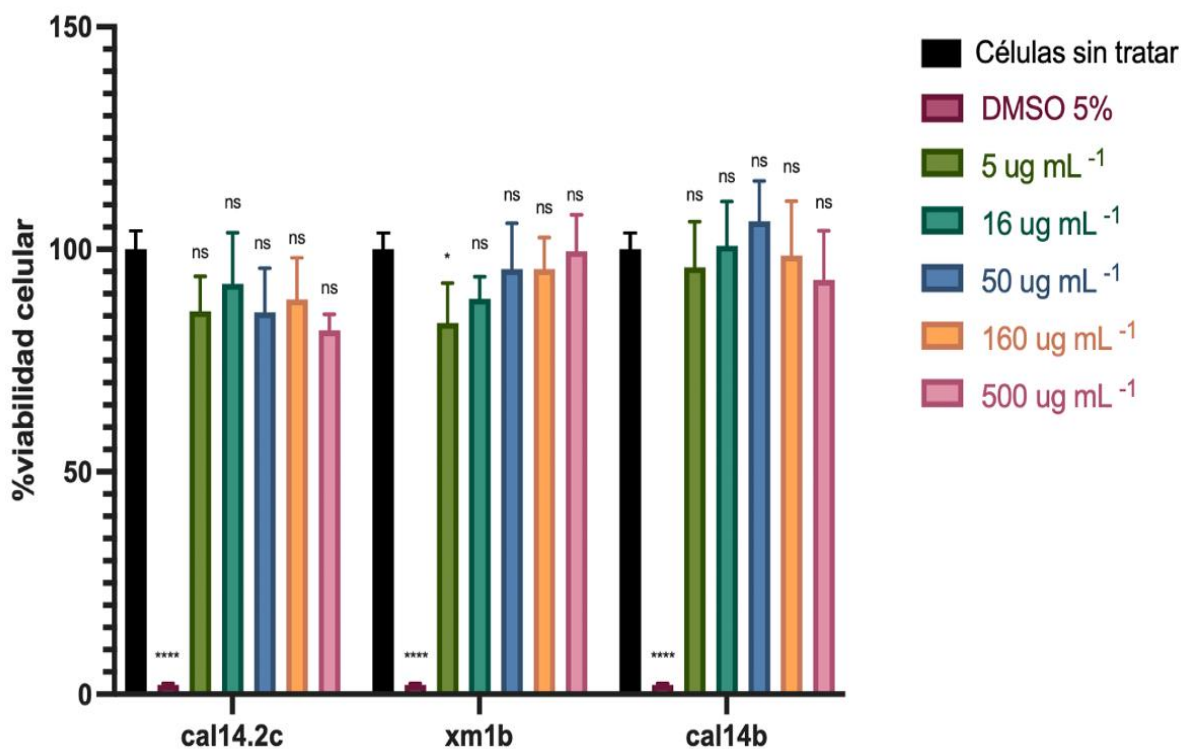


Figura 11. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 231. Se utilizaron tres conotoxinas distintas como tratamientos a cinco concentraciones. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) como control positivo.

La conotoxina cal14b no presentó valores significativos a ninguna concentración, mostrando viabilidades celulares cercanas al 100%, por lo que se deduce que no existe un efecto modulador en el uso de esta conotoxina.

Mientras que, la conotoxina vc1.1 mostró un efecto modulador en cuatro de las cinco concentraciones con un incremento en la viabilidad celular de 121% respecto al control sin tratamiento para la menor concentración (5 μ g/mL), 116% de viabilidad celular a la concentración de 16 μ g/mL, 118% a la concentración de 50 μ g/mL, 107% con 160 μ g/mL, y por último, la concentración más alta presentó un decremento en la población celular a 86%,obteniéndose un resultado significativo respecto al control.

Consecuente al ensayo anterior, se implementó un ensayo donde se buscó conocer el efecto de las conotoxinas sintéticas probadas utilizando distintos tiempos. Las mismas conotoxinas que en ensayos anterior fueron probadas a 24 h, se probaron también a 48 y 72 h. Las concentraciones utilizadas para este ensayo fueron de 16, 50 y 160 μ g/mL. Se utilizó cisplatino [100 μ g/mL] y DMSO 5% como controles.

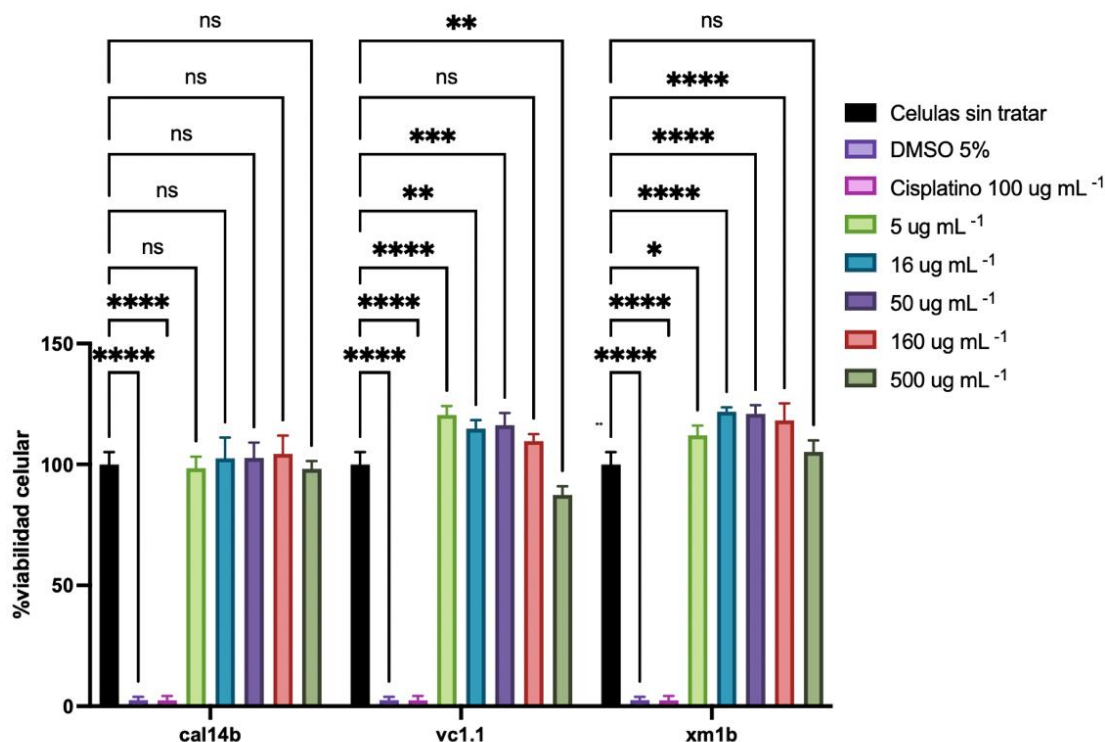


Figura 12. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 157. Se utilizaron tres conotoxinas distintas como tratamientos a cinco concentraciones. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$] como control positivo.

Se probaron primeramente las células MDA MB 231. A 24 h, la conotoxina xm1b mostró diferencias significativas en las tres concentraciones con resultados muy similares en la gráfica (Figura 15). Los valores de viabilidad celular fueron de 149% para la concentración menor de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 152% para 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 147% para 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 4 grados de significancia para estos 3 resultados. Pasadas 48 h, la viabilidad celular disminuyó a 128, 130 y 129% respectivamente con las tres concentraciones probadas, manteniéndose aún un resultado significativo con 4 grados de significancia. Por último, a 72 h se presentó una disparidad en los resultados observándose un incremento en la viabilidad celular de 177% en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 132% en 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 105% para 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, manteniendo 4 grados de significancia respecto al control para las primeras dos concentraciones (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y no significancia para 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La conotoxina cal14.2c a las 24 h mostró una viabilidad celular de 148% respecto al control en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 145% en 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 130% a la mayor concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A 24 h, en estas 3 concentraciones se mostró entonces un efecto modulador significativo para la línea celular con

la conotoxina cal14.2c. A 48 h, la viabilidad celular se mostró con un 134% respecto al control en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, un 136% en 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 135% a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El efecto modulador se mantiene significativo tras 48 h a pesar de las variaciones en el incremento de la viabilidad celular. Por último, a 72 h se observa un efecto significativo similar al de la conotoxina xm1b, donde a la menor concentración (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se aumenta la viabilidad celular de manera vertiginosa a 201%, con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa una viabilidad de 159% y con 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 120%.

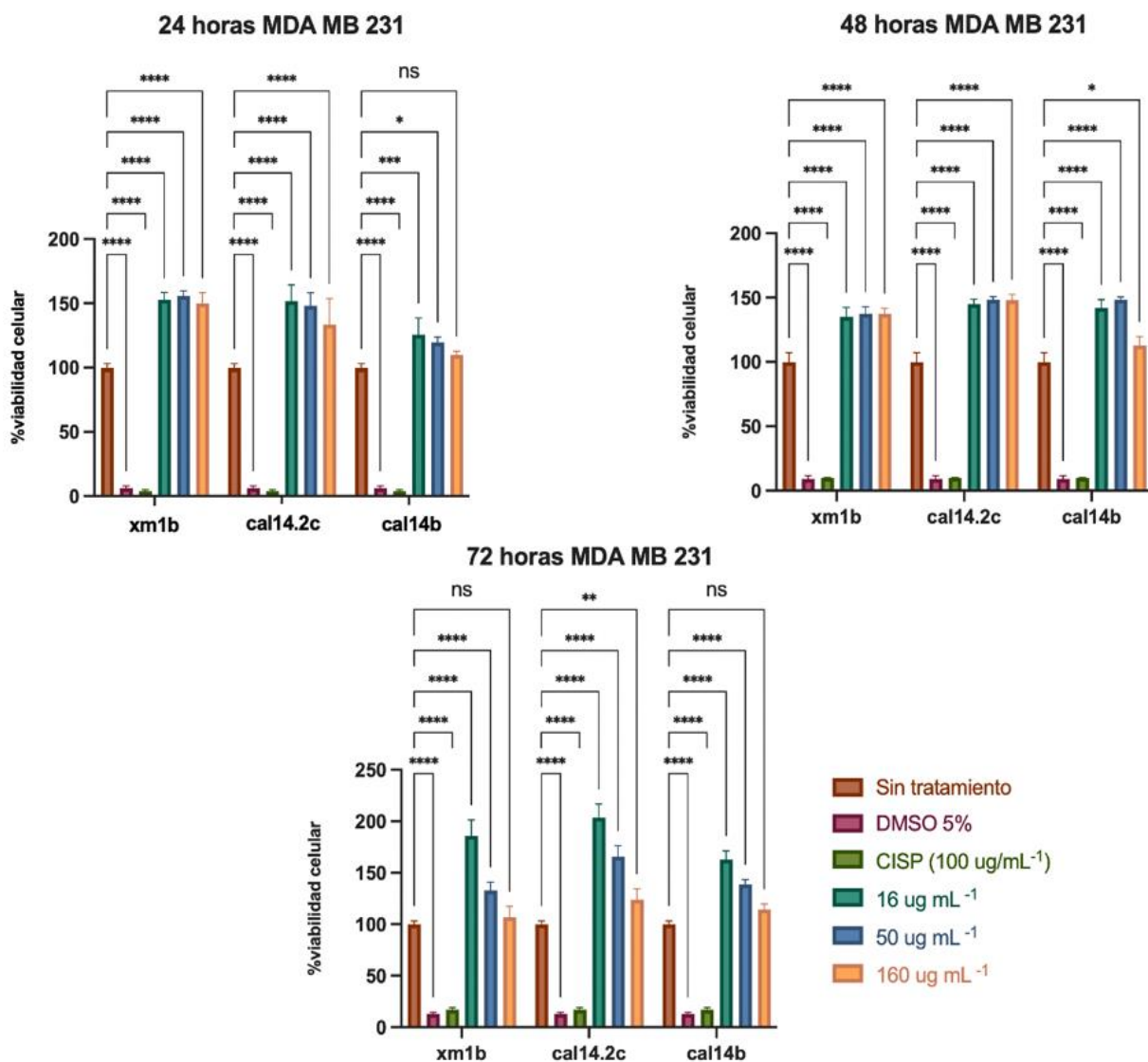


Figura 13. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 231. Se utilizaron tres conotoxinas distintas como tratamientos a tres concentraciones y tres tiempos (24, 48 y 72 h). Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [$100 \mu\text{g}/\text{mL}$] como control positivo.

La tercera conotoxina probada fue cal14b, la cual mostró un efecto significativo a 24 h con una concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentando la viabilidad celular a 131% respecto al control. Con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la viabilidad celular aumentó a 124% respecto al control y con 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad celular disminuyó a 111%, este último resultado ya no muestra ser significativo. A 48 h, la concentración menor, de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mantuvo un efecto modulador significativo mostrando un aumento en la viabilidad celular de 135% respecto al control. Con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cal14b aumentó la viabilidad celular a 142% y con 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 110%. Por último, a 72 h, la tendencia de viabilidad celular de las otras 2 conotoxinas a este tiempo se vio igualada, donde la conotoxina disminuye la viabilidad celular a mayor concentración. En el caso de la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la viabilidad celular obtuvo un efecto modulador significativo y un porcentaje de 160% respecto al control. A 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se mantuvo significancia con 140% de viabilidad celular y a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el resultado ya no mostró ser significativo y se obtuvo un porcentaje de viabilidad celular de 109% en comparación con el control sin tratamiento.

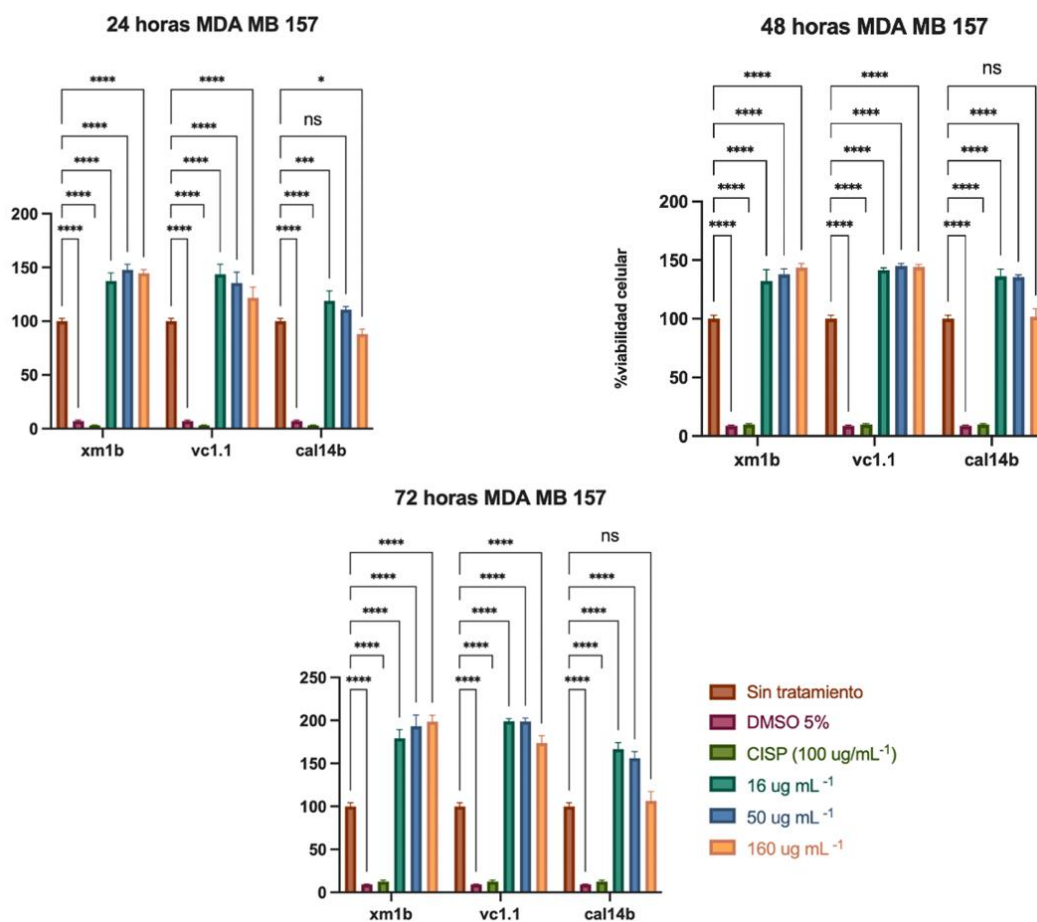


Figura 14. Ensayo de viabilidad celular en la línea MDA MB 157. Se utilizaron tres conotoxinas distintas como tratamientos a tres concentraciones y tres tiempos (24, 48 y 72 h). Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] como control positivo.

Por otro lado, se realizó este mismo ensayo en las células MDA MB 157 bajo las mismas condiciones que el ensayo anterior, probando en este caso tres conotoxinas a 3 concentraciones distintas durante 24, 48 y 72 h para comprobar si existe algún efecto modulador del ciclo celular dependiente de estas variables.

Primeramente, en el caso de la conotoxina xm1b, se observó un efecto significativo con un aumento de la viabilidad celular en el caso de las 3 concentraciones. A 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad celular fue de 138% respecto al control sin tratamiento, en la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hubo un aumento de la viabilidad celular de 144% y por último a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 141%. Estos resultados fueron a 24 h. A 48 h, el efecto significativo se mantuvo y la viabilidad celular obtuvo valores de 130% a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 134% a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 138% a la mayor concentración probada de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de la prueba a 72 h, el aumento en la viabilidad celular fue aun mayor con valores de 173% con 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 184% a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 188% con 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración. El efecto significativo mantuvo 4 grados de significancia para esta conotoxina en las 3 diferentes concentraciones y 3 tiempos probados.

Por consecuente, los resultados en las pruebas con la conotoxina vc1.1 en la línea celular MDA MB 157 se observaron significativos a 24 h con las 3 concentraciones probadas, obteniendo valores de viabilidad celular de 140%, 133% y 124% respectivamente para las concentraciones de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A 48 h el efecto significativo se mantuvo con resultados de viabilidad celular de 136%, 139% y 138% respectivamente para las concentraciones de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por último, a 72 h la conotoxina vc1.1 aumentó la viabilidad celular en las 3 concentraciones probadas con valores de 187% con 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 188% con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 171% en 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, manteniendo un efecto significativo durante los 3 tiempos probados y las 3 distintas concentraciones.

De igual manera, se probó el efecto modulador de la conotoxina cal14b en este ensayo con las células MDA MB 157. A 24 h se observó un efecto significativo en la menor concentración (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obteniendo un porcentaje de viabilidad celular de 122%, 116% de viabilidad celular en el caso de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniendo nula significancia, así como una disminución de la viabilidad celular respecto al control en la concentración más alta de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un 90%. En este último caso, se mantuvo el resultado significativo con un grado de significancia.

De igual manera, se probaron estas mismas 3 concentraciones a 48 h. Los resultados mostraron un incremento en la viabilidad celular a la menor concentración (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de 137%, así como en el caso de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde la viabilidad celular mostró un valor de 135%. En ambos casos se observa un resultado

significativo respecto al control. En el caso de la concentración más alta (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la viabilidad celular mostró un 103% de crecimiento respecto al control, lo que representó un resultado no significativo para este caso.

Por último, los resultados a 72 h mostraron un patrón similar a los otros tiempos probados con la conotxina cal14b, donde la menor concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentan resultados significativos con 163% y 156% de viabilidad celular en comparación al control respectivamente. La concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mantuvo un resultado no significativo a este tiempo presentando un 105% de viabilidad celular respecto al control.

Como último ensayo, se comprobó si la conotoxina xm1b de un nuevo lote tendría un efecto modulador distinto a los ya probados con anterioridad en este trabajo. La conotoxina xm1b de un nuevo lote se probó en ambas células MDA MB 157 y MDA MB 231. El ensayo se realizó a 24 h con tres distintas concentraciones: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La figura 17 contiene los resultados.

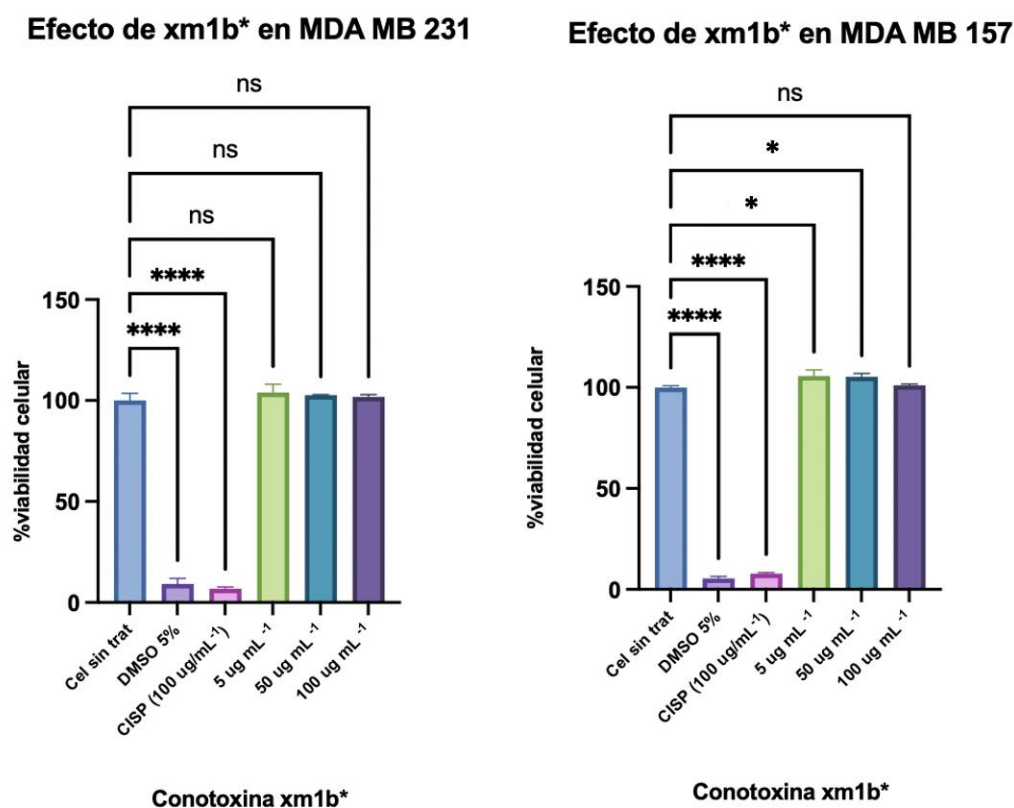


Figura 15. . Ensayo de viabilidad celular en ambas líneas celulares MDA MB 157 y MDA MB 231. Se probó el efecto de la conotoxinas xm1b de un nuevo lote a tres concentraciones. Los resultados fueron normalizados con el BCO (células sin tratar) para obtener el porcentaje de supervivencia celular y son expresados como la media \pm DE, prueba estadística: ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Se utilizó DMSO (5%) y Cisplatino [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] como control positivo.

En las células MDA MB 231 se observa una disminución en la viabilidad celular en ambos controles utilizados, Cisplatino a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y DMSO al 5%, mostrando un resultado significativo respecto al control. En las 3 distintas concentraciones probadas de la conotoxina xm1b (nuevo lote) no se muestra un resultado significativo al tratar las células MDA MB 231.

Por otro lado, en el caso de las células MDA MB 157, los controles disminuyeron la viabilidad celular y este resultado se observó significativo respecto al control. La concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la conotoxina xm1b de nuevo lote mostró un grado de significancia respecto al control, con un incremento en la viabilidad celular de 106%. La concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por igual, aumentó la viabilidad celular a 105% respecto al control, obteniendo un grado de significancia. A 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observó efecto alguno, con 98% de viabilidad celular.

Capítulo 4. Discusión

Ambas células utilizadas en este estudio pertenecen a un tipo de cáncer de mama denominado triple negativo, cuya principal diferencia radica en su patología y origen tumoral, compartiendo la característica de la ausencia de expresión de receptores de estrógeno, progesterona y crecimiento epidérmico humano, lo que limita sus opciones de tratamiento (Chavez et al., 2011). Por otro lado, una característica de interés en estas líneas celulares es la presencia de receptores nicotínicos de acetilcolina, que como se ha mencionado anteriormente, se ha comprobado que desarrollan un rol importante en la regulación del crecimiento y migración de las células, a través de la estimulación de cascadas de señalización. Estos receptores transmembranales son canales iónicos activados por ligando formados por cinco subunidades (pentaméricos), las cuales, dependiendo su conformación, le conferirán al receptor la habilidad de unirse a distintos ligandos que pudieran tener importancia farmacológica (Zhao, 2016).

De acuerdo con la ATCC (American Type Culture Collection), ambos cultivos celulares crecen en adherencia y requerían de un ambiente de incubación con CO₂ al 5% debido al medio Leibovitz's L-15 que se sugiere, sin embargo, se realizaron algunas adecuaciones, cambiando a medio DMEM, por lo que no fue necesario el CO₂ al momento de cultivarlas. Sun et al. (2020) describen el crecimiento de las células en medio DMEM como óptimo para realizar los ensayos pertinentes con las conotoxinas. El crecimiento de nuestros cultivos fue más lento de lo reportado y esperado, sin embargo, se logró un número de pases celulares adecuados para realizar los ensayos.

Sun y colaboradores (2020) realizaron un estudio donde elucidaron la expresión diferencial de los receptores nicotínicos de acetilcolina de distintas células de cáncer de mama. Entre esas células se encontró que MDA MB 231 expresa las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$. De acuerdo con los resultados encontrados en este estudio, donde las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 2$ estuvieron expresadas (Tabla 5). Es de gran importancia resaltar que, en diversos estudios en los últimos años, la subunidad $\alpha 9$ encontrada en MDA MB 231 ha sido relacionada directamente con la actividad tumoral de estas células.

Por otro lado, en las células MDA MB 157, Sun y colaboradores (2020) reportan la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 2$, lo que coincide con los hallazgos en este estudio (Tabla 5). En este paso, el número de re-cultivos celulares es de gran importancia para el resultado. Los primeros pases

celulares posteriores al descongelamiento pueden influir en una expresión de receptores distinta a la que se encontró en pases posteriores donde se realizó la evaluación.

De esta manera, se seleccionaron de la tabla de conotoxinas sintéticas disponibles (Tabla 4), las conotoxinas que posiblemente pudieran tener afinidad a las subunidades de nAChR expresadas en ambas líneas celulares, basándose en la homología de las secuencias y las características de las conotoxinas reportadas en estudios previos.

Esta comparación de las secuencias de las conotoxinas muestra un patrón compartido de cuatro residuos de cisteína en CC-C-C y C-C-C-C. Se observan variaciones en el resto de los aminoácidos entre las secuencias. Específicamente, las conotoxinas α -cal, en las posiciones 1, 4, 5, 6 y 14 que corresponden a arginina (R), prolina (P), triptófano (W), glicina (G) y treonina (T). El resto de las conotoxinas de la lista en la figura 18, tienen aminoácidos conservados en las columnas 2, 9, 10 y 11 correspondientes 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. xm1a	D	G	C	-	-	-	C	R	D	P	R	C	A	I	N	-	-	-	-	C	V	-	-
5. xm1b	D	G	C	-	-	-	C	R	D	P	R	C	A	I	N	-	-	-	-	C	V	-	-
6. xm1c	D	G	C	-	-	-	C	R	D	P	R	C	A	I	N	-	-	-	-	C	V	-	-
7. lm1	-	G	C	-	-	-	C	S	D	P	R	C	A	W	R	-	-	-	-	C	-	-	-
8. lm1b	-	G	C	-	-	-	C	S	D	P	R	C	A	W	R	-	-	-	-	C	-	-	-
9. vc1.1	-	G	C	-	-	-	C	S	D	P	R	C	N	Y	D	H	P	E	I	C	-	-	-
10. vc1.1b	-	G	C	-	-	-	C	S	D	P	R	C	N	Y	D	H	P	E	I	C	-	-	-

Figura 16. Comparación de secuencias entre α -conotoxinas. Se presentan las secuencias de las conotoxinas utilizadas en este estudio. Los colores son representativos para diferenciación de cada aminoácido. El análisis fue llevado a cabo mediante el programa MEGA X (Versión 10.2.7).

Con base en la homología de las secuencias y las características de las α -conotoxinas presentes en la figura 19, se predice la posible afinidad hacia los nAChRs dependiendo de la α -conotoxina utilizada. Se infiere que las α -conotoxinas sintéticas utilizadas en este estudio pueden exhibir una mayor afinidad sobre los receptores homoméricos $\alpha 9$ y/o su conjugación heteromérica $\alpha 9\alpha 10$, así como una posible afinidad hacia los receptores heteroméricos $\alpha 3\beta 4$ presentes en la línea de cáncer de mama triple negativo MDA MB 231 (Tabla 5).

Como control de muerte celular, se exhiben los resultados de un análisis previo a los ensayos de viabilidad donde se utilizaron distintas concentraciones de DMSO para determinar la dosis letal media de este compuesto en ambas líneas celulares. El objetivo era conseguir muerte celular con la menor concentración posible, lo que en ambas líneas celulares se obtuvo al 5% de concentración (Figura 6). Según la literatura, el porcentaje de DMSO utilizado se respalda con la mayoría de los artículos que buscan muerte celular.

De esta manera, en los ensayos de viabilidad celular, ninguna de las nueve α -conotoxinas sintéticas empleadas presentaron una disminución significativa en la viabilidad celular respecto a los controles, por el contrario, se observaron efectos de proliferación en ciertos ensayos.

Es de relevancia mencionar que diversos estudios han demostrado que los nAChRs son poderosos reguladores de respuestas que estimulan procesos cancerosos como la proliferación, la inhibición de la apoptosis y la metástasis. También se ha demostrado que su modulación es un objetivo prometedor para el desarrollo de fármacos, lo que abre una amplia posibilidad de un campo de estudio en el área biomédica.

Aunado a esto, la evidencia reciente sugiere que existe un vínculo patogénico entre la nicotina y una mayor susceptibilidad de las células a las enfermedades malignas, pero los mecanismos ligados a este proceso aún no están bien definidos. El mecanismo principal ligado a la manera en que la nicotina actúa como promotor tumoral es uniéndose y activando los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) que inducen la liberación de factores de crecimiento y citocinas que alteran la fisiología de diversos órganos y sistemas y puede activar una serie de vías de señalización que promueven el crecimiento celular, la angiogénesis y otras respuestas tisulares. Este efecto podría compararse a la manera en la que algunas conotoxinas utilizadas en este estudio interactúan con los receptores α , desencadenando procesos intracelulares que regulan el ciclo celular.

En particular, la subunidad $\alpha 9$, que tiende a formar receptores homopentaméricos y que se encuentra expresada en las dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, es una de las principales reguladoras de estos patrones celulares. La subunidad $\alpha 10$, sirve principalmente para dar estructura a los receptores, pudiendo formar receptores heteropentaméricos con la subunidad $\alpha 9$. Se debe recordar que las distintas configuraciones de los nAChRs y sus ligandos dictan las distintas reacciones en las vías de señalización intracelular que se llevarán a cabo.

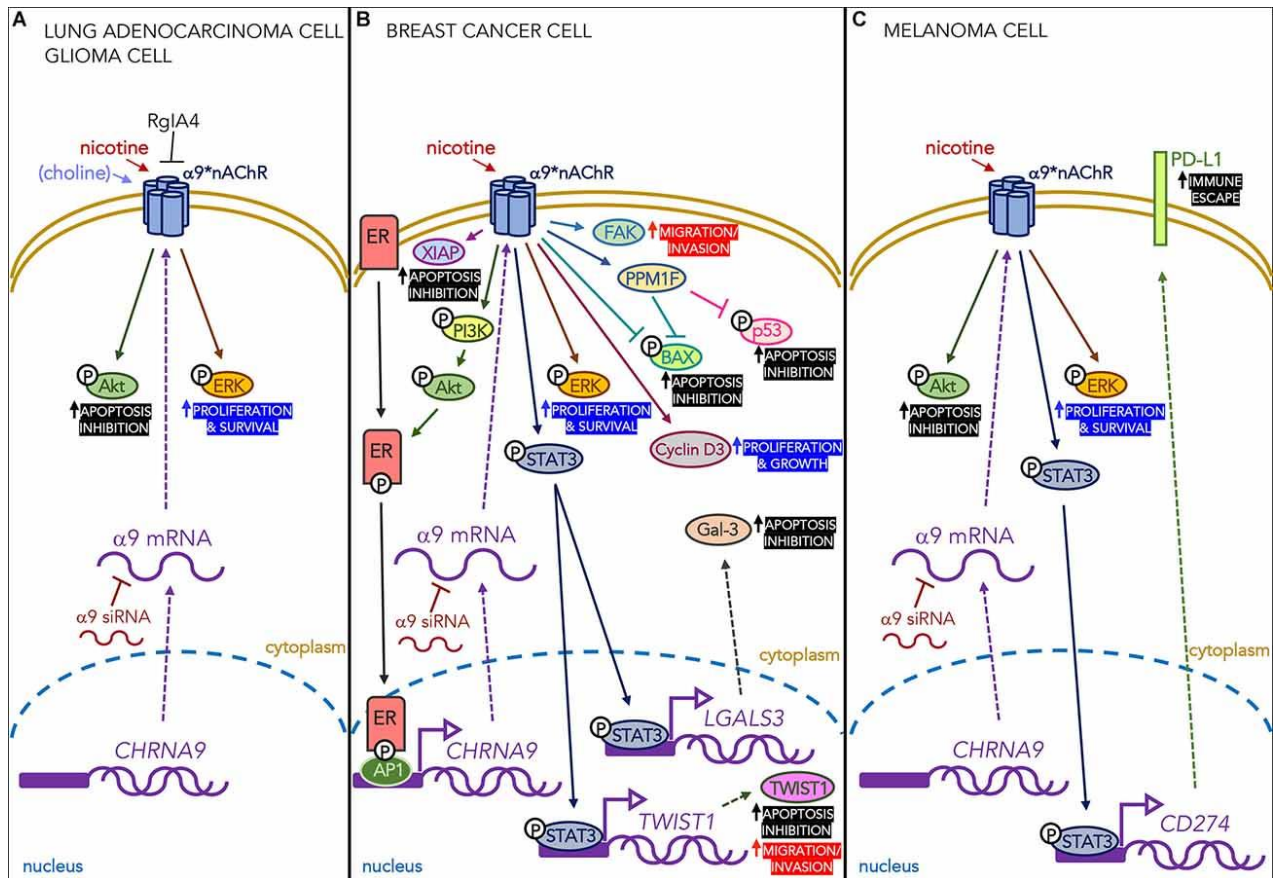


Figura 17. Efectos de la nicotina actuando sobre los receptores que contienen la subunidad $\alpha 9$ expresada de diferentes tipos de células cancerosas. A) La nicotina (en células de glioma y adenocarcinoma de pulmón) y la colina (solo en células de glioma) median efectos proliferativos y antiapoptóticos a través de las vías de señalización ERK y Akt. B) En las células de cáncer de mama, la nicotina que actúa sobre los nAChRs $\alpha 9$ activa la vía PI3K/Akt que fosforila los receptores de estrógeno intracelulares (RE) que, a su vez, se unen al factor de transcripción AP1 y a la región promotora del gen CHRNA9 . También aumenta los niveles de ciclina D3 proproliferativa, la proteína antiapoptótica XIAP y la proteína fosfatasa PPM1F que reduce la p53 y BAX fosforiladas, protegiendo así las células de la apoptosis. Finalmente, promueve la fosforilación de STAT3 y su translocación nuclear, aumentando así la transcripción del gen que codifica la lectina antiapoptótica Gal-3. En las células de melanoma, la nicotina aumenta el número de nAChR $\alpha 9$ y fosforila STAT3, que se une al promotor PD-L1 en el núcleo y conduce a una mayor expresión superficial de PD-L1, promoviendo así el escape inmunológico de las células cancerosas.

Otra subunidad de gran interés es la $\alpha 5$, encontrada en ambas líneas de cáncer de mama triple negativo utilizadas. A pesar de que $\alpha 5$ es considerada una subunidad accesoria, tiene una gran implicación en cuanto a su expresión, ya que está directamente relacionada con la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la migración celular en el 65% de los cánceres, incluido el de mama (Bele et al., 2023).

Se infiere entonces, que las conotoxinas xm1b, cal14b y vc1.1, utilizadas en estos ensayos, presentan una mayor afinidad por estos canales y podrían ser las responsables de la proliferación celular observada tras tratar ambas líneas de cáncer de mama triple negativo MDA MB 231 y MDA MB 157 con las conotoxinas.

En los primeros ensayos celulares que se realizaron con un perfil completo con las nueve conotoxinas, se presentó un aumento significativo en la población celular con las conotoxinas cal14b, cal14.2c, xm1b y vc1.1 en las células MDA MB 231. Las demás conotoxinas presentaron de igual manera un resultado significativo, sin embargo, las conotoxinas mencionadas obtuvieron el mayor efecto significativo.

En comparación con MDA MB 231, MDA MB 157 no presentó efectos significativos en la primera prueba con las nueve conotoxinas. Es importante analizar las diferencias entre las líneas celulares, pues aunque ambas son de cáncer de mama triple negativo, pueden presentar respuestas diferentes ante los tratamientos y una expresión distinta en los receptores de su membrana.

En el segundo ensayo con ambas células se redujo a probar cuatro conotoxinas que habían presentado mayor efecto significativo. En este se mostró un efecto significativo nulo para todas las conotoxinas, excepto para vc1.1 en el caso de las células MDA MB 231, donde la población se redujo a un 92%, con baja significancia. Si bien, no es un resultado similar al primero, donde hubo proliferación, puede indicar una modulación del canal y de la alteración en las vías de señalización intracelular a través de la interacción conotoxina-nAChR.

En un ensayo posterior, con las mismas conotoxinas se observó un efecto de proliferación que presentó significancia con los tratamientos de conotoxinas cal14b y xm1b en ambas líneas celulares. Mientras que las conotoxinas xm1c y vc1.1 no presentaron resultados significativos en este ensayo.

Los ensayos posteriores demostraron que no existe una relación entre la concentración utilizada de conotoxina y el efecto observado. La conotoxina xm1b y vc1.1 demostraron un incremento en la población celular en las concentraciones menores, así como en las mayores, mostrando una relación no lineal.

Para el caso del tiempo, se utilizaron tres concentraciones de conotoxina para demostrar si a 24, 48 o 72 h se mostraba un efecto dependiente del tiempo. Se observó que a 24 y 48 h el efecto se mantuvo similar, con incrementos en la población celular de hasta 150%, siendo altamente significativo el resultado. A 72 h los ensayos muestran un incremento cercano al 200% en las conotoxinas xm1b y vc1.1. A este tiempo, el crecimiento celular es intrínseco de la división celular y no por efecto de la conotoxina, no se puede inferir un efecto dependiente del tiempo.

Es de importancia resaltar que los experimentos fueron realizados con un número de pases celulares cada vez más lejanos al descongelamiento. El grado de subcultivo al que se ha sometido una línea celular a

menudo se expresa como “numero de pase”, que generalmente puede considerarse como el número de veces que las células se han transferido de un recipiente a otro. Un amplio rango de la literatura demuestra que este número de pases afecta directamente en las características de una línea celular con el tiempo. Las líneas celulares con un elevado número de pases experimentan alteraciones en la morfología, la respuesta a los estímulos, las tasas de crecimiento, la expresión de proteínas y la eficiencia de la transfección, en comparación con las células de pases más bajos.

La calidad de las líneas celulares es crucial para una experimentación exitosa y se debe evitar el uso de líneas celulares que han estado en cultivo durante demasiado tiempo. Este pudo ser un factor que influyera en los resultados de proliferación, aunado a una respuesta de modulación del ciclo celular en respuesta a las conotoxinas, en especial xm1b y vc1.1.

A pesar de tener conotoxinas similares en secuencia, como xm1a, xm1b y xm1c, algunas presentaron actividad y otras no. Esto puede deberse a que existen diferencias entre estos péptidos como la fragmentación, las modificaciones postraduccionales y la conectividad.

Esta 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). Además, existen otras diez modificaciones, como la hidroxilación de la prolina (P) o lisina (K), la glicosilación de la treonina (T) o serina (S), la γ -carboxilación del ácido glutámico (E), entre otras. Si bien la función de estas modificaciones aun no esta del todo comprendida, se infiere que contribuyen al plegamiento y estabilización de la conformación tridimensional de las α -conotoxinas, aumentando su afinidad por los nAChRs. (Ho et al., 2021)

Capítulo 5. Conclusiones

Las conotoxinas xm1b y vc1.1 mostraron resultados de proliferación significativos en la mayoría de los ensayos, lo que sugiere que existe un efecto modulador del ciclo celular en las líneas de cáncer de mama MDA MB 231 y MDA MB 157. Ambas líneas celulares expresaron las subunidades $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\alpha 5$, que al conjugarse e interactuar con ligandos como la nicotina suelen desencadenar procesos relacionados con la proliferación celular, la metástasis, transición epitelio-mesenquimal (EMT) y migración celular de ciertos cánceres, incluido el de mama. La interacción de las conotoxinas con los nAChRs sugiere un efecto modulador del ciclo celular no dependiente de la concentración ni del tiempo. Se infiere que el número de pase celular ejerce influencia en los ensayos y es un criterio relevante en la calidad de futuros experimentos. Si bien no se observó un efecto anticancerígeno, se abre la posibilidad a utilizar estas conotoxinas como herramienta en ensayos relacionados a modulación del ciclo celular.

Literatura citada

- Anastasiadi, Z., Lianos, G. D., Ignatiadou, E., Harissis, H. V., & Mitsis, M. (2017). Breast cancer in young women: an overview. *Updates in surgery*, 69(3), 313–317. <https://doi.org/10.1007/s13304-017-0424-1>
- Bernáldez, J., Román-González, S. A., Martínez, O., Jiménez, S., Vivas, O., Arenas, I., Corzo, G., Arreguín, R., García, D. E., Possani, L. D., & Licea, A. (2013). A *Conus regularis* conotoxin with a novel eight-cysteine framework inhibits CaV2.2 channels and displays an anti-nociceptive activity. *Marine drugs*, 11(4), 1188–1202. <https://doi.org/10.3390/md11041188>
- Escárrega Payán, E. (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, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3011>
- Fahad Ullah, M. (2019). Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Advances in experimental medicine and biology*, 1152, 51–64. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_4
- Fedosov, Alexander., Moshkovskii, Sergei., Kuznetsova, Ksenia., & Olivera, Baldomero. (2012). Conotoxins: From the biodiversity of gastropods to new drugs. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B*, 6(2), 107-122. <https://doi.org/10.1134/S1990750812020059>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., & Piñeros, M. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; Consultado el 02 de agosto de 2022, de <https://gco.iarc.fr/today>
- Giribaldi, J., Dutertre, S. (2017). α -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>
- Changeux J. P. (2020). Discovery of the First Neurotransmitter Receptor: The Acetylcholine Nicotinic Receptor. *Biomolecules*, 10(4), 547. <https://doi.org/10.3390/biom10040547>
- Guillén López, A. (2011). *Caracterización bioquímica de toxinas del veneno del caracol marino conus californicus que interactúan con el análogo del receptor de acetilcolina aChBP*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/597>
- Kapil S, Hendriksen S, y Cooper JS. Cone Snail Toxicity. Consultado el 2 de Agosto de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470586/>
- Martínez Galván, O. (2010). *Caracterización bioquímica del veneno del caracol marino Conus regularis*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/591>
- 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>

- 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>
- Hanahan, D. (2021). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Mir, R., Karim, S., Kamal, M. A., Wilson, C. & Mirza, Z. (2016). Conotoxins: structure, therapeutic potential, and pharmacological applications. *Current Pharmaceutical Design*, 22 (5), 582-589. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26601961/>
- 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>
- Lopez, E., Aguilar, M., & Heimer, E. (2006). Toxinas de caracoles marinos del género *Conus*. Consultado el 2 de Agosto de 2023, de <https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/index.php/ediciones-antteriores/ediciones-antteriores/7-vol-57-num-3-julio-septiembre-2006/comunicaciones-libres58/17-toxinas-de-caracoles-marinos-del-genero-conus>
- Lopez Vera, E. (2010). Los receptores nicotínicos de acetilcolina y las α -conotoxinas. *Herramientas moleculares para el estudio de receptores nAChRs*, 29(1), 8-12. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=37094>
- Luo, S.; Zhangsun, D.; Harvey, P.J.; Kaas, Q.; Wu, Y.; Zhu, X.; Hu, Y.; Li, X.; Tsetlin, V.I. & Christensen, S. (2015). Cloning, synthesis, and characterization of α O-conotoxin GeXIVA, a potent α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), 4026-4035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503617112>
- Papieź, M. A., & Krzyściak, W. (2021). Biological Therapies in the Treatment of Cancer-Update and New Directions. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11694. <https://doi.org/10.3390/ijms222111694>
- Pitones Rubio, S. (2009). *Identificación y caracterización de los componentes citotóxicos del veneno del caracol conus californicus sobre diferentes líneas celulares de cáncer*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California].
- Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?. *Physiological reviews*, 98(2), 559–621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>
- Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the New Testament. *Open biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
- Sun Z, Bao J, Zhangsun M, Dong S, Zhangsun D & Luo S. (2020). α O-Conotoxin GeXIVA Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells via Interaction with α 9 Nicotine Acetylcholine Receptors. *Marine Drugs*, 18(4), 195. <https://doi.org/10.3390/md18040195>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., 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. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

- Wormald, J. S., Oberai, T., Branford-White, H., & Johnson, L. J. (2020). Design and establishment of a cancer registry: a literature review. *ANZ journal of surgery*, 90(7-8), 1277–1282. <https://doi.org/10.1111/ans.16084>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Zhao, Yue, (2016). The Oncogenic Functions of Nicotinic Acetylcholine Receptors, *Journal of Oncology*, 9(11) 9. <https://doi.org/10.1155/2016/9650481>
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease*, 32(1-2), 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- 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(7). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119557>
- 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>
- Zhao, Y. (2016). The Oncogenic Functions of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Oncology*, 1- 9. <https://doi.org/10.1155/2016/9650481>.