

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con
orientación en Biotecnología Marina**

Estudio del efecto de conotoxinas en la remodelación ósea

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

Presenta:

Brenda Ivette Iduarte Frias

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Brenda Ivette Iduarte Frias

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

Dra. Lilian Irene Plotkin

Dra. Guadalupe Reyes Cruz

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Pierrick Gérard Jean Fournier



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 **Brenda Ivette Iduarte Frias** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

Estudio del efecto de conotoxinas en la remodelación ósea

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

El sistema óseo es un tejido dinámico que a lo largo de nuestra vida sufre ciclos de destrucción y formación, denominados en conjunto como remodelación ósea. Las células óseas son las responsables de llevar a cabo este proceso: los osteoclastos son las células que resorben el tejido óseo, mientras que los osteoblastos son las células encargadas de producir los componentes de la matriz ósea y mineralizarla. La remodelación ósea es un proceso continuo y en equilibrio entre la resorción del hueso viejo y la formación de hueso nuevo que permite al esqueleto mantener su integridad estructural y contribuir al equilibrio de calcio y fósforo en el cuerpo. Cuando existe un desbalance en este proceso el esqueleto es susceptible al desarrollo de diversas enfermedades. Las estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades óseas son limitadas por lo que existe la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos. En este trabajo se estudió el efecto de fracciones derivadas del veneno de *C. ximenes* y de conotoxinas sintéticas (Xm1b, Vc1.1, Imlb, Cal142b), con afinidad por receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), con el fin de identificar nuevos moduladores de la actividad de las células óseas. De las 13 fracciones obtenidas del veneno total, se identificaron componentes moduladores de osteoblastogénesis: algunos de ellos promovieron la mineralización en osteoblastos, y otros disminuyeron la actividad de los osteoblastos. Interesantemente, todas las fracciones evaluadas promovieron la osteoclastogénesis. Por otro lado, las cuatro conotoxinas sintéticas evaluadas, promovieron la osteoclastogénesis en presencia de RANKL, incrementando la actividad resortiva de los osteoclastos. En osteoblastos, las conotoxinas disminuyeron la capacidad de mineralización, acompañada de una regulación negativa de los genes osteoblásticos como *Runx2*, *Alpl*, *Col1a1* y *Blgap*. En tejido enriquecido en osteocitos, se observó un aumento en la expresión de *Dmp1*, *Mepe*, *Tnfsf11* y *Sost*. El análisis transcriptómico reveló que Xm1b y Vc1.1 modulan vías clave relacionadas con la mineralización y osteogénesis, incluyendo la regulación de miembros de la familia Wnt y BMP. Finalmente, la evaluación *ex vivo* de calvarias de ratón tratadas con las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 mostró un incremento el número de osteoclastos, y una reducción significativa del área ósea total. El análisis de expresión de genes reveló un incremento de *Tnfsf11*, *Ctsk*, *Sost* y disminución de *Runx2* y *Tnfrsf11b*. Estos resultados sugieren que las conotoxinas inducen un microambiente óseo que favorece la diferenciación y actividad de los osteoclastos. En conjunto, este trabajo demuestra que tanto los componentes de las fracciones del veneno de *C. ximenes* como las conotoxinas sintéticas evaluadas tienen el potencial de modular la actividad de las células óseas, lo que los convierte en moléculas con alto potencial para la modular la remodelación ósea y el desarrollo de posibles agentes terapéuticos en patologías óseas.

Palabras clave: Remodelación ósea, Osteoblastos, Osteoclastos, *Conus*, Conotoxinas, nAChR

Abstract of the thesis presented by **Brenda Ivette Iduarte Frias** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences Marine Biotechnology

Characterization of Conotoxins Effects on Bone Remodeling

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Thesis Director

The skeletal system is a dynamic tissue that undergoes continuous cycles of destruction and formation throughout our lives. This process is collectively referred to as bone remodeling. Bone cells are responsible for carrying out this process: osteoclasts resorb bone tissue, while osteoblasts are the cells responsible for producing the components of the bone matrix and mineralizing it. However, like other organs, the skeleton is susceptible to the development of various diseases, for which the development of new drugs is necessary. In this study, we explored the effect of fractions derived from the venom of *C. ximenes* and synthetic conotoxins (Xm1b, Vc1.1, Imlb, Cal142b), which have affinity for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), in order to identify new tools with the potential to modulate bone cell activity. Of the 13 fractions obtained from the total venom, we identified that some promoted osteoblast mineralization, while others decreased osteoblast activity. All the tested fractions in osteoclastogenesis promoted osteoclast differentiation. The four synthetic conotoxins evaluated promoted osteoclastogenesis in the presence of RANKL, increasing the resorptive activity of osteoclasts. In osteoblasts, conotoxins reduced mineralization capacity, accompanied by a downregulation of osteoblastic genes such as *Runx2*, *Alpl*, *Col1a1* and *Blgap*. In osteocyte-enriched tissue, after treatment with conotoxins an increase in the expression of *Dmp1*, *Mepe*, *Tnfrsf11* and *Sost* was observed. Transcriptomic analysis revealed that Xm1b and Vc1.1 modulate key pathways related to mineralization and osteogenesis, including the regulation of Wnt and BMP family members. Finally, *ex vivo* evaluation of mouse calvaries treated with the conotoxins Xm1b and Vc1.1 showed an increase in the number of osteoclasts and a significant reduction in total bone area. Gene expression analysis in calvaria tissue revealed an up-regulation of *Tnfrsf11*, *Ctsk*, and *Sost*, alongside a down-regulation of *Runx2* and *Tnfrsf11b* genes, showing that conotoxins induce a bone microenvironment that favors osteoclast differentiation and activity. This study demonstrates that both compounds derived from *C. ximenes* venom and synthetic conotoxins have the potential to modulate bone cell activity, supporting their use as experimental tools in bone biology and highlighting their potential as therapeutic agents in bone pathologies characterized by excessive bone formation or impaired bone remodeling.

Keywords: Bone remodeling, Osteoclast, Osteoblast, *Conus*, Conotoxins, nAChR

Dedicatoria

A Rogelio Cárdenas, Aquiles y Pimienta, gracias por ser mi motor para seguir.

A Brian Salas, gracias por abrirme las puertas del BlackBox, ayudarme a creer en mí, por siempre tener un reto nuevo, aguantar mi genio, y por todos esos kilómetros corridos; de otra forma, nunca habría terminado de escribir esta tesis

A Brenda, por darse la oportunidad.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada durante la realización del posgrado con número de CVU 747173.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Posgrado en Ciencias de la Vida y al Departamento de Innovación Biomédica (DIB), por brindarme las instalaciones y el acompañamiento académico indispensables para el desarrollo de mi trabajo de doctorado.

A los miembros de mi comité de tesis Dra. Patricia, Dra. Lilian, Dra. Guadalupe, Dr. Alexei y Dr. Pierrick, por su apoyo, retroalimentación y paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio.

Al personal técnico de Departamento de Biotecnología Marina y del DIB, especialmente Dra. Edna Sánchez, Dr. Pavel Galindo, Dra. Claudia Ventura, Dr. Ricardo González, Dra. Johanna Bernáldez y M. C. Samantha Jiménez.

A Adriana Mejía, gracias por tu compromiso, amabilidad y apoyo constante.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 El sistema óseo.....	2
1.1.2 Células del tejido óseo.....	2
1.1.3 Proceso de remodelado óseo y alteraciones patológicas.....	4
1.1.4 Canales iónicos en células óseas.....	7
1.1.5 Toxinas como potencial estrategia terapéutica.....	12
1.1.6 Conotoxinas.....	13
1.2 Justificación.....	15
1.3 Hipótesis.....	16
1.4 Objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo general.....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Metodología.....	17
2.1 Recolección y extracción de veneno de <i>Conasprella ximenes</i>	17
2.2 Fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP).....	17
2.3 Conotoxinas.....	17
2.4 Mantenimiento de ratones.....	18

2.5	Evaluación del efecto de las fracciones en la viabilidad de celular.....	19
2.6	Modelo de osteoclastogénesis a partir de células de médula ósea de ratón.....	19
2.7	Ensayo de resorción de área por osteoclastos.....	20
2.8	Evaluación de conotoxinas en osteoclastos humanos diferenciados a partir de aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	20
2.9	Ensayo de osteoblastogénesis a partir de células de médula ósea de ratón.....	21
2.10	Modelo de tejido óseo enriquecido en osteocitos	21
2.11	Evaluación de conotoxinas en el modelo de cultivo <i>ex vivo</i> de calvarias de ratón neonato	22
2.11.1	Procesamiento para análisis histológico de hemi-calvarias.....	22
2.11.2	Procesamiento de muestras para evaluar la expresión de genes.....	23
2.11.3	PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR)	24
2.12	Preparación de muestras para análisis transcriptómico y análisis de datos.....	25
2.13	Análisis estadístico	26
Capítulo 3.	Resultados.....	27
3.1	Evaluación de las fracciones de <i>C. ximenes</i> en células óseas	27
3.1.1	Extracción y fraccionamiento por HPLC del veneno total del <i>C. ximenes</i>	27
3.1.2	Efecto de las fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i> en la viabilidad de células RAW264.727	
3.1.3	Efecto de las fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i> en la diferenciación de células óseas	29
3.2	Evaluación de conotoxinas sintéticas en remodelación ósea	35
3.2.1	Efecto de las conotoxinas sintéticas en la viabilidad celular.....	35
3.2.2	Evaluación de conotoxinas en la osteoclastogénesis.....	37
Capítulo 4.	Discusión	61
4.1	Evaluación de las fracciones de <i>C. ximenes</i> en células óseas.....	61
4.2	Evaluación de conotoxinas sintéticas en la remodelación ósea	62
Capítulo 5.	Conclusiones.....	71
Literatura citada		72

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Células óseas y proceso de remodelación.....	3
Figura 2. Alteraciones en el tejido óseo osteoporótico.	7
Figura 3. Clasificación de las conotoxinas....	14
Figura 4. Secuencia de aminoácidos de las conotoxinas sintéticas.	18
Figura 5. Cromatograma del fraccionamiento del veneno total de <i>C. ximenes</i> . Empleando RP-HPLC se fraccionó el veneno total de <i>C. ximenes</i>	28
Figura 6. Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i> en células RAW264.7.....	29
Figura 7. Efecto de las fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i> en osteoclastogénesis.....	30
Figura 8. Efectos de las fracciones 1 a 5 del veneno de <i>C. ximenes</i> en la mineralización de osteoblastos.....	32
Figura 9. Efectos de las fracciones 5 a 8 del veneno de <i>C. ximenes</i> en la mineralización de osteoblastos.....	33
Figura 10. Efectos de las fracciones 9 a 12 del veneno de <i>C. ximenes</i> en la mineralización de osteoblastos	34
Figura 11. Evaluación de conotoxinas en la viabilidad celular de células de médula ósea de ratón mediante ensayo MTT.....	36
Figura 12. Efecto de conotoxinas en la diferenciación de osteoclastos de ratón.....	38
Figura 13. Efectos de las conotoxinas en la diferenciación de PBMC humanas en osteoclastos.	40
Figura 14. La diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclastos inducida por conotoxinas depende de RANKL.....	41
Figura 15. Las conotoxinas modulan la actividad de resorción de osteoclastos..	43
Figura 16. Efectos de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 en la expresión de genes osteoclastos.....	44
Figura 17. Efectos de las conotoxinas Imlb y Cal14.2b en la expresión de genes osteoclastos.....	45
Figura 18. Efectos de las conotoxinas en la mineralización de osteoblastos.....	46
Figura 19. Efectos de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 en la expresión de genes osteoblastos	48
Figura 20. Efectos de las conotoxinas Imlb y Cal14.2b en la expresión de genes osteoblastos	49

Figura 21. Efecto de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 sobre la expresión génica de osteocitos.....	50
Figura 22. Efecto de las conotoxinas Im1b y Cal14.2b en la expresión génica de osteocitos.....	51
Figura 23. Efecto de las conotoxinas sobre la expresión génica de osteoclastos.....	53
Figura 24. Términos GO asociados a la modulación transcriptómica en osteoclastos por Vc1.1.....	54
Figura 25. Efecto de las conotoxinas sobre la expresión génica de osteoblastos.....	55
Figura 26. Términos GO asociados a la modulación transcriptómica en osteoblastos por Xm1b.....	56
Figura 27. Términos GO asociados a la modulación transcriptómica en osteoblastos por Vc1.1.....	57
Figura 28. Principales genes regulados a la baja en los osteoblastos.....	58
Figura 29. Efecto de las conotoxinas en el cultivo de calvaria <i>ex vivo</i>	59
Figura 30. Efecto de las conotoxinas en el cultivo de calvaria <i>ex vivo</i>	60

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Canales iónicos en osteoclastos	9
Tabla 2. Canales iónicos en osteoblastos	10
Tabla 3. Canales iónicos en osteocitos	10
Tabla 4. Secuencias sentido y antisentido de los oligonucleótidos empleados para evaluar expresión de genes.	25
Tabla 5. Concentraciones empleadas de las conotoxinas evaluadas.....	35

Capítulo 1. Introducción

El sistema óseo cumple con diversas funciones que contribuyen al funcionamiento del cuerpo humano, entre ellas proporcionar estructura y soporte, proteger órganos, regular el metabolismo mineral y participar en funciones endocrinas (Boyce & Xing, 2007). Como tejido dinámico, el hueso se encuentra en remodelación continua, reemplazando hueso viejo o dañado por hueso nuevo. Este proceso es esencial para mantener la integridad estructural del esqueleto, regular los niveles de calcio en el cuerpo y reparar fracturas o lesiones, este proceso es llevado a cabo por las células óseas osteoclastos, osteoblastos y osteocitos, y es conocido como remodelación ósea (Sims & Martin, 2014). De manera similar a otros sistemas, es susceptible al desarrollo de patologías cuando hay desequilibrios en los procesos de remodelado, entre estos padecimientos encontramos a la osteoporosis, fibrodisplasia osificante progresiva, osteopetrosis y osteosarcoma, entre otras (Branch, 2017b).

Las patologías óseas frecuentemente son diagnosticadas tardíamente, y existe una tasa elevada de discapacidad asociada a la pérdida de funciones físicas y de movilidad. Aunque no todos los padecimientos óseos son mortales, las complicaciones asociadas a estas pueden contribuir a un aumento en la mortalidad de los pacientes y a un alto costo social y económico. A pesar de la alta frecuencia de las patologías óseas existen muy pocos fármacos para su tratamiento, existiendo una necesidad creciente de nuevos fármacos que nos permitan restablecer los ciclos de remodelación ósea, y tratar estas patologías (Harvey et al., 2010; L. Liu et al., 2024).

En los últimos años, se ha demostrado que la modulación de los canales iónicos no es exclusiva de células capaces de generar potenciales de acción, como neuronas o fibras musculares (Camerino et al., 2007), sino que también resulta esencial en células consideradas “no excitables”, como las del sistema inmune, las epiteliales y las óseas (Bohmwald et al., 2021; Perin et al., 2023). En estos tipos celulares, la regulación de dichos canales se ha asociado con procesos de señalización que influyen en la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis (Becchetti et al., 2013). Por lo tanto, la identificación de herramientas que permitan modular estos mecanismos en el tejido óseo constituye un área de interés terapéutico.

Las conotoxinas, péptidos presentes en el veneno de los caracoles marinos del género *Conus*, han sido estudiadas por su especificidad hacia sus blancos moleculares como canales iónicos, receptores de neurotransmisores y otras proteínas de membrana (N. Chen et al., 2018). Evaluar el efecto de las conotoxinas en células óseas podría ayudarnos a comprender mejor el impacto de la modulación de

canales iónicos en la remodelación ósea y explorar el potencial terapéutico de estos péptidos en patologías óseas. Por tanto, el presente trabajo plantea el estudio y caracterización de los efectos de conotoxinas sobre la remodelación ósea.

1.1 Antecedentes

1.1.1 El sistema óseo

El esqueleto humano tiene una gran diversidad de funciones, entre ellas se encuentra: proporcionar un sitio de adherencia para los músculos, proteger órganos vitales, ser almacén de calcio, fósforo y citocinas, además de albergar a la médula ósea (Boyce & Xing, 2007). Histológicamente, se puede dividir el tejido óseo secundario o maduro en dos tipos: cortical y trabecular. El hueso cortical es más abundante, constituye aproximadamente el 80% del volumen en el esqueleto adulto, y forma una capa externa en todos los huesos. El hueso trabecular representa cerca del 20% del esqueleto y forma espículas en zonas localizadas en el interior de los huesos donde se alberga a la médula ósea (Lerner, 2012).

Para mantener la integridad del esqueleto este es sometido a ciclos de destrucción y formación, en conjunto denominados remodelación ósea. La remodelación es llevada a cabo por las células óseas en respuesta a múltiples señales del organismo, que permiten establecer un equilibrio entre la formación y la resorción local de hueso (Figura 1).

1.1.2 Células del tejido óseo

En el tejido óseo existen tres tipos principales de células, cuyas funciones se han identificado como las principales involucradas durante el proceso de remodelación.

Osteoblastos

Los **osteoblastos**, son células de origen mesenquimal, especializadas en la formación del tejido óseo. Son las células responsables de producir los componentes de la matriz ósea, conformada principalmente de colágeno tipo I y proteínas no colágenas (como osteocalcina, osteopontina y fosfatasa alcalina), y su

posterior mineralización. Para la diferenciación a osteoblastos las células precursoras requieren la activación de factores de transcripción clave como *Runx2* y *Sp7*, que para su activación requieren el estímulo de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y la vía Wnt/ β -catenina (Lerner, 2012; Marie & Cohen-Solal, 2018). A su vez, los osteoblastos regulan la diferenciación de células precursoras a osteoclastos, mediante la secreción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), principalmente. La osteoprotegerina (OPG) es una proteína soluble secretada principalmente por osteoblastos, que actúa como receptor señuelo de RANKL, al competir con RANK por su unión a este ligando (Rivadeneira & Mäkitie, 2016; Ross, 2013). De esta forma los osteoblastos pueden regular la diferenciación o actividad de los osteoclastos a través del eje RANK/RANKL/OPG.

Por otro lado, durante el proceso de secreción de matriz ósea, algunos osteoblastos maduros quedan embebidos en la nueva matriz ósea y se diferencian a osteocitos, mientras que algunos permanecen en la superficie del hueso y se les denomina células de revestimiento plano (Marie & Cohen-Solal, 2018; Lerner, 2012).

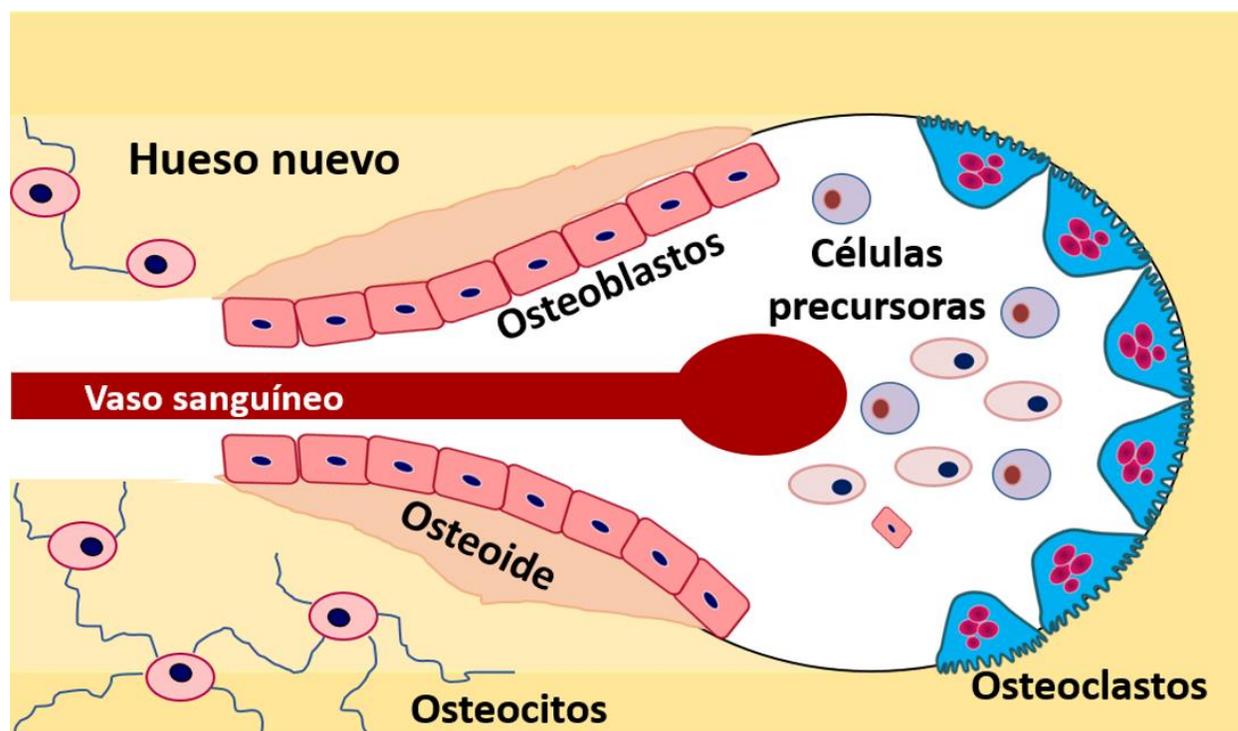


Figura 1. Células óseas y proceso de remodelación. Los osteoclastos, derivados de precursores hematopoyéticos, llevan a cabo la resorción de la matriz ósea. Posteriormente, células progenitoras mesenquimales se diferencian en osteoblastos, que se disponen sobre la superficie resorbida para depositar osteoide y promover su mineralización, formando hueso nuevo. Los osteoblastos pueden quedar embebidos en la matriz ósea y diferenciarse en osteocitos, que actúan como sensores mecánicos y reguladores de la remodelación (Modificado de Sims & Martin, 2014).

Osteocitos

Los **osteocitos**, son las células más abundantes del tejido óseo. Se caracterizan por tener una morfología estrellada, con extensiones citoplasmáticas similares a dendritas. Estas extensiones citoplasmáticas les permiten conectarse con otros osteocitos, así como con osteoclastos y osteoblastos, estableciendo así una red de comunicación a lo largo del tejido óseo. Mediante esta red de intercomunicación en el hueso, los osteocitos pueden coordinar la remodelación ósea, al secretar agentes que permiten modular la actividad de los osteoblastos y osteoclastos. Por ejemplo, los osteocitos secretan esclerostina, una proteína que inhibe la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la activación de esta vía es necesaria para la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos. Asimismo, los osteocitos pueden modular la osteoclastogénesis al liberar RANKL u OPG, influyendo en el equilibrio entre formación y resorción ósea (Bellido & Delgado-Calle, 2020; Marie & Cohen-Solal, 2018; Stern et al., 2012).

Osteoclastos

Los **osteoclastos**, son las células encargadas de llevar a cabo la resorción ósea. Para poder diferenciarse a partir de células hematopoyéticas de linaje monocito/macrófago requieren principalmente del estímulo de dos citocinas: el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) (Marino et al., 2014). Los osteoclastos nacen de la fusión de las células precursoras, son células multinucleadas (de tres o más núcleos), y expresan la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) (Manolagas, 2000), misma que se puede identificar ópticamente mediante su tinción.

1.1.3 Proceso de remodelado óseo y alteraciones patológicas

El proceso de remodelado óseo, es llevado a cabo en las unidades multicelulares óseas (BMU) mediante la acción coordinada de las células óseas, puede dividirse en distintas etapas:

Fase de activación y resorción: la primera etapa de la remodelación implica la detección de una señal iniciadora por los osteocitos. Esta señal puede ser por tensión mecánica, acción hormonal, entre otras (Raggatt & Partridge, 2010). Como resultado de esta señal, suele haber apoptosis de osteocitos y un aumento en la osteoclastogénesis (Manolagas, 2000). Una de las principales vías de señalización que regula la diferenciación y actividad de los osteoclastos es la vía OPG-RANK-RANKL. Cuando RANKL no es

capturado por OPG, y se une a su receptor RANK en las células precursoras de osteoclastos, la proteína adaptadora TRAF6 es reclutada, lo que activa y transloca al núcleo al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). El NF- κ B aumenta la expresión de la proteína c-Fos, misma que interactúa con el factor nuclear de células-T activadas (NFATc1), NFATc1 es un factor de transcripción considerado regulador maestro de la diferenciación de los osteoclastos, que ejerce su función sobre distintos genes específicos de los osteoclastos como TRAP y catepsina K (Kim & Kim, 2014; Rivadeneira & Mäkitie, 2016; Ross, 2013). Las células precursoras de osteoclastos se fusionan para formar osteoclastos, los osteoclastos maduros se adhieren a la superficie ósea formando una “cavidad de resorción” (también denominada laguna de Howship) donde secretan protones, iones cloruro y distintas enzimas (por ejemplo metaloproteinasas y catepsina K) para degradar la matriz ósea (Marino et al., 2014; Raggatt & Partridge, 2010).

Fase de formación y terminación: Para formar el tejido que ha sido resorbido por los osteoclastos es necesaria la expresión de distintos genes moduladores de la osteoblastogénesis. RUNX2 es un regulador maestro de la osteoblastogénesis, su expresión modula a su vez la producción de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteopontina, osteonectina y osteocalcina (Gorter & Dijke, 2013). El factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) a través del receptor IGF-1, activa la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)-Akt y Ras-ERK MAP, e induce la expresión de Osterix, que al interactuar con el factor nuclear para células T activadas 2 (NFAT2), regula la transcripción de genes relacionados con la diferenciación y actividad de osteoblastos (Gorter & Dijke, 2013).

En el tejido óseo, la vía de señalización Wnt/ β -catenina se activa cuando disminuye la expresión de esclerostina, secretada principalmente por osteocitos, lo que favorece la diferenciación y actividad de los osteoblastos (Yao et al., 2017). Una vez que las células madre mesenquimales se encuentran en las zonas de resorción, se diferencian a osteoblastos, que entonces secretan los componentes que formarán el tejido óseo nuevo. El colágeno tipo I es el principal componente del tejido óseo, que es mineralizado mediante la incorporación de hidroxapatita (Raggatt & Partridge, 2010). Al concluir un ciclo de remodelación, el balance de la BMU puede ser neutro, cuando la formación compensa el total de la resorción; positivo, si la formación excede la resorción; o negativo, si la formación resulta insuficiente respecto a la resorción. Al finalizar la remodelación los osteoblastos pueden iniciar el proceso de apoptosis, diferenciarse a osteocitos o a células de revestimiento óseo (Bolamperti et al., 2022).

La interacción precisa entre los procesos de formación y resorción ósea son vitales para mantener la integridad estructural y funcional del tejido óseo. Los desequilibrios en la actividad de osteoclastos, osteoblastos y osteocitos favorecen el desarrollo de diversas patologías óseas.

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más común, es el resultado del desbalance entre formación y resorción lo que lleva a la pérdida del tejido óseo, presenta huesos frágiles y propensos a fracturas (Figura 2). La actividad de resorción de los osteoclastos está regulada por vías de señalización intracelular dependientes del calcio, en las que participan canales de potencial receptor transitorio (TRP), particularmente los de la subfamilia vanilloide (TRPV) de potencial receptor transitorio (TRPV), y receptores de citocinas como lo es el receptor de RANKL (N. Liu et al., 2022). Entre los TRPV, los canales TRPV5 y TRPV6 regulan el transporte transmembranal de calcio, esencial para los procesos de formación y resorción. La deficiencia o pérdida de función de estos canales se ha asociado con un incremento en la resorción y reducción de la masa ósea, contribuyendo al desarrollo de osteoporosis (F. Chen et al., 2014; Luo et al., 2023). Por su parte, la activación excesiva de la vía RANK/RANKL favorece la diferenciación osteoclástica y aumenta la destrucción del tejido óseo, promoviendo la pérdida ósea.

Por otro lado, existen patologías como la osteopetrosis, donde hay un aumento en la densidad ósea derivada de una resorción deficiente. Mutaciones en el gen *CLCN7*, que codifica para el canal de cloro 7 (ClC-7), o en genes que codifican subunidades de la bomba de protones V-ATPasa, se han asociado con esta enfermedad. En consecuencia, los osteoclastos presentan una capacidad deficiente para acidificar y disolver la matriz mineral en la laguna de Howship, lo que favorece la acumulación de tejido óseo viejo y da como resultado huesos densos pero frágiles (Stauber et al., 2023).

Estas condiciones demuestran el impacto que puede tener la regulación iónica en la calidad del tejido óseo y el desarrollo de padecimientos. Se han descrito más de 700 enfermedades óseas (Tosi, 2024), donde podemos encontrar aquellas con un incremento en la destrucción, la formación ósea, o la presencia de ambos procesos de manera simultánea. Las patologías óseas tienen en común la necesidad de nuevas terapias, que ofrezcan alternativas más eficaces que los medicamentos actuales o que actúen como tratamientos complementarios. Por tanto, comprender el efecto de la modulación iónica en un entorno óseo, a través de la regulación de canales específicos, como receptores de calcio, canales de sodio o cloro, podría ofrecer nuevos abordajes terapéuticos o complementarios a los tratamientos ya existentes.

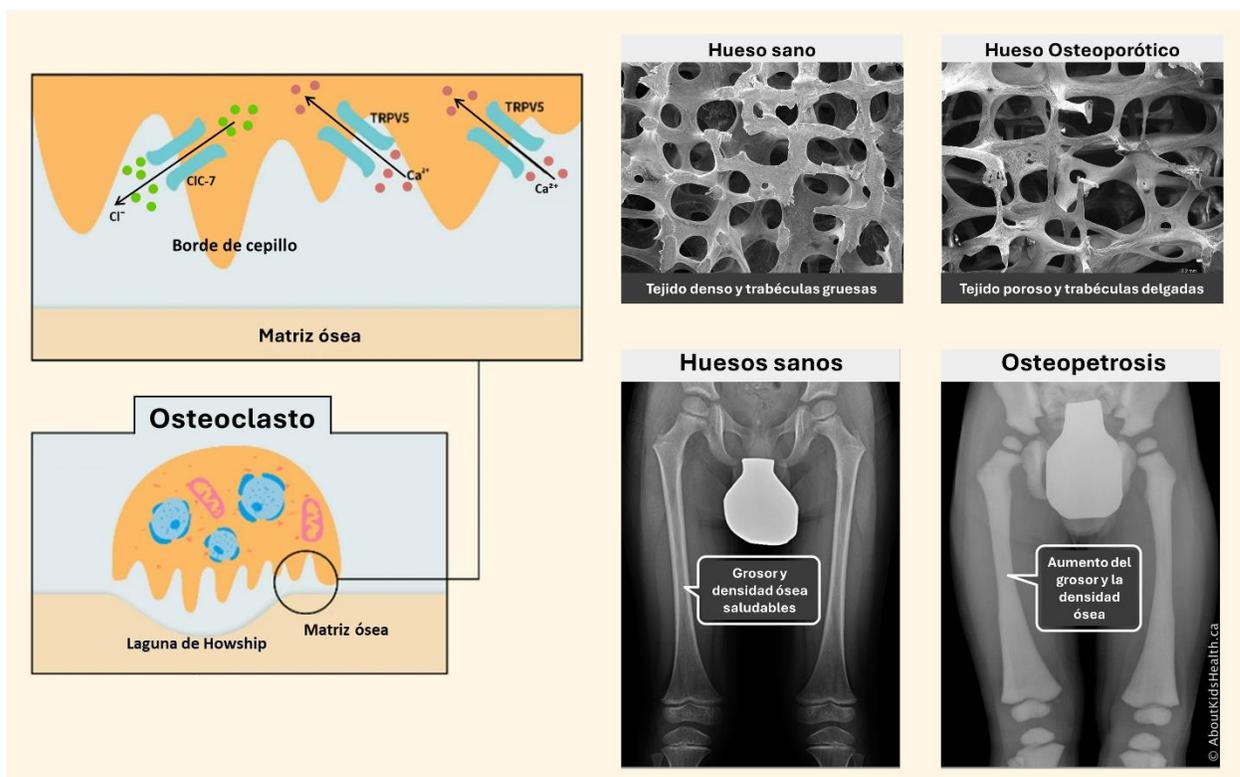


Figura 2. Alteraciones en el tejido óseo osteoporótico. La osteoporosis es una patología ósea caracterizada por una disminución en la densidad mineral. Resultando en huesos frágiles y propensos a fracturas. En los últimos años se ha identificado las implicaciones que puede tener la modulación de los canales iónicos TRPV5 en el incremento de la actividad osteoclástica. Además de como la administración de agonistas de TRPV5/6 pueden ayudar a prevenir el desarrollo de osteoporosis postmenopáusica. En el borde de cepillo del osteoclasto también se encuentra el Canal de cloro 7 (CIC-7), mutaciones en el gen que codifica para este canal generan la reducción de la actividad osteoclástica, lo que conlleva una disminución de la resorción ósea, presentando huesos densos y frágiles. (Modificado de Luo et al., 2023; (Branch, 2017a).

1.1.4 Canales iónicos en células óseas

Los procesos de remodelación ósea dependen de la regulación que ejercen distintas redes de señales mecánicas, eléctricas y bioquímicas sobre osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. Entre estos diversos mecanismos, los canales iónicos tienen un papel central, considerando que la regulación de flujo de iones a través de estos canales se ha asociado con procesos celulares de diferenciación, proliferación, mecanotransducción y apoptosis (Becchetti et al., 2013).

Los canales iónicos se pueden dividir dependiendo de su modo de activación. Entre ellos se encuentran los canales dependientes de voltaje; su apertura se da en respuesta a los cambios en el potencial de membrana, como los canales de cloro, sodio, potasio y calcio. Los canales iónicos activados por ligando se abren o cierran dependiendo de la unión de un ligando, por ejemplo, los receptores nicotínicos de

acetilcolina (nAChRs). Los nAChR se conforman por la unión de cinco subunidades, pueden ser homo o heteropentaméricos, entre las subunidades más comunes están $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 7$, y son regulados por la unión de acetilcolina principalmente (Terlau & Olivera, 2004). Por otro lado, los canales mecanotransductores son activados por estímulos físicos como la tensión, al abrirse permiten el flujo de iones. Traduciendo la señal mecánica en una respuesta electroquímica; por ejemplo, los canales TRPV4 y Piezo1, ambos relevantes en la fisiología ósea (Steinecker-Frohnwieser et al., 2023).

Los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos expresan distintas combinaciones de canales iónicos, estas variaciones influyen en las funciones y respuestas específicas ante distintos estímulos.

En los osteoclastos es esencial el transporte de iones a través de la membrana (mediado tanto por bombas de protones como por canales iónicos) para poder llevar a cabo la resorción y, por ende, para el mantenimiento del tejido óseo. Los osteoclastos alternan entre fases móviles y de reabsorción activa, y estas transiciones se acompañan de cambios morfológicos y de patrones de corrientes iónicas, lo que sugiere la participación de canales específicos en la regulación de sus funciones (Tabla 1). Los canales de K^+ influyen en la migración celular, y se han identificado algunos en osteoclastos. Se ha demostrado que la modulación de estos canales puede disminuir la migración y la resorción de los osteoclastos. Asimismo, se identificó una corriente de potasio activada por calcio, atribuida al canal $KCa3.1$, cuyo bloqueo con caribdotoxina o apamina, disminuyó la motilidad de los osteoclastos e inhibió la resorción ósea *in vitro* (Espinosa et al., 2002).

Durante el proceso de resorción, es necesario que se produzca un ambiente ácido que permita disolver el tejido óseo, para ello los osteoclastos requieren de la activación de canales como los canales de cloro $ClC-7$, el canal de calcio TRPV5, además de la bomba de protones V-ATPasa. NFATc1 es un regulador maestro de la diferenciación y función de los osteoclastos, su expresión depende de la señalización RANK-RANKL, pero también del incremento de calcio intracelular mediado por canales TRP (como TRPV4, TRPV5 y TRPV6) y canales de calcio dependientes de voltaje (F. Chen et al., 2014; Kang et al., 2020; Luo et al., 2023). De esta manera la regulación de estos canales puede afectar de manera directa la resorción ósea.

En osteoblastos la modulación de canales iónicos ha permitido identificar algunos que afectan la diferenciación, mineralización o supervivencia de estas células (Tabla 2). Se ha demostrado que la modulación del canal de cloro $ClC-3$ mediante compresión estática puede favorecer la diferenciación de células MC3T3-E1 a osteoblastos, al emplear clorotoxina (inhibidor específico del canal de cloruro $ClC-3$)

no se observaron cambios en la expresión de CIC-3, pero redujo la expresión de Runx2, BMP-2 y OPN, en las células MC3T3-E1, disminuyendo la diferenciación a osteoblastos (D. Wang et al., 2017).

Tabla 1. Canales iónicos en osteoclastos

Canal iónico	Función principal en osteoclastos	Efecto de su modulación
TRPV1	Flujo de Ca ²⁺	Promueve la diferenciación y la expresión de genes asociados a resorción
TRPV4	Flujo de Ca ²⁺ , mecanotransducción	Regula etapas finales de diferenciación y resorción. Asociado con la expresión NFATc1.
TRPV5	Flujo de Ca ²⁺	Transporte de calcio durante la resorción. Deficiencia aumenta la cantidad de osteoclastos, pero reduce su actividad.
TRPV6	Flujo de Ca ²⁺	Regula diferenciación medida por RANKL.
CIC-7	Acidificación de las lagunas de resorción	Intercambiador Cl ⁻ /H ⁺ esencial para disolver la matriz ósea. Su disfunción ↓ resorción.
KCa3.1	Mantenimiento del potencial de membrana, apoyo en la señalización del Ca ²⁺	Afecta la diferenciación, motilidad y resorción.

La entrada de calcio a través de los canales dependientes de voltaje Cav1.2 promueve la osteogénesis al activar la vía de señalización de Wnt/ β -catenina (Fei et al., 2019), o mediante los canales TRPV4 activa cascadas de señalización como la vía calmodulina-calcineurina-NFATc1, induciendo la expresión de genes osteogénicos como Runx2, osteocalcina, Col1a1 y DMP1, promoviendo la diferenciación y actividad de mineralización de los osteoblastos (Kang et al., 2020). Por otro lado, los canales de potasio activados por calcio (KCa1.1), activan vías de señalización como MAPK-ERK, aumentando la expresión de Runx2, se ha observado una disminución en la mineralización cuando hay disfunción de estos canales. La modulación de los canales KCa3.1 disminuye la expresión de genes como osterix y osteocalcina, afectando negativamente la mineralización (Lee et al., 2018).

En osteocitos, la modulación de canales iónicos principalmente aquellos mecanosensores les permiten mantener el equilibrio entre destrucción y formación del tejido óseo (Tabla 3). Se identificaron tres tipos de canales de K⁺ en la línea celular de tipo osteocito de ratón MLO-Y4. Se estima que estos canales contribuyen al mantenimiento del potencial de la membrana celular y, por tanto, podrían participar en la mecanotransducción y la comunicación intercelular de los osteocitos (Gu et al., 2001). La activación de los canales TRPV4 en estas células, regula la diferenciación osteoblástica al disminuir los niveles de esclerostina producida por los osteocitos (Williams et al., 2020).

Tabla 2. Canales iónicos en osteoblastos

Canal iónico	Función principal	Efecto de su modulación en osteoblastos
CIC-3	Flujo de Cl ⁻ sensible al volumen	Su actividad de mecanotransducción promueve la expresión de genes osteoblastogénicos.
Cav1.2	Flujo de Ca ²⁺	Su activación mecánica promueve osteogénesis al activar la vía de señalización de Wnt/ β -catenina
TRPV4	Flujo de Ca ²⁺ , mecanotransducción	Asociado con diferenciación y mineralización
KCa1.1, KCa3.1	Flujo de K ⁺ dependiente de Ca ²⁺	Asociado con diferenciación y mineralización
Kv7.3	Flujo de K ⁺	Su inhibición promueve mineralización

La estimulación mecánica del canal iónico Piezo1 en osteocitos, incrementa la expresión de Wnt1 a través de la vía Calcio/CaM/YAP, estimulando la diferenciación, proliferación y actividad de los osteoblastos. La modulación de Piezo1, con su agonista Yoda1, ayudó a mejorar la estructura del tejido óseo en ratones con osteoporosis inducida por glucocorticoides, sugiriendo su modulación como potencial blanco terapéutico para este padecimiento (Li et al., 2025; Webster, 2025).

Tabla 3. Canales iónicos en osteocitos

Canal iónico	Función principal	Efecto de su modulación en osteocitos
Canales de K⁺	Flujo de K ⁺	Mecanotransducción y comunicación intercelular de los osteocitos
TRPV4	Flujo de Ca ²⁺ , mecanotransducción	Adaptación del tejido óseo tras estímulos mecánicos
Piezo1	Flujo de iones no selectivo, mecanotransducción	Esencial para detectar carga mecánica, su activación aumenta masa y fuerza ósea

Se pensaba que la expresión de nAChR estaba restringida a células excitables como neuronales y musculares (J. M. McIntosh et al., 1994), pero la investigación emergente muestra que los nAChR se expresan ampliamente en células no excitables como epiteliales, del sistema inmune, incluso las células óseas; en este último caso el enfoque de estudio ha sido el poder entender las posibles interacciones del sistema nervioso y el óseo.

Sato et al. (2010) identificaron la expresión de múltiples nAChR en osteoblastos, al inducir la diferenciación de osteoblastos y tratar con acetilcolina (ACh) observaron un incremento de la proliferación, pero también

una disminución en la actividad de la fosfatasa alcalina, sugirieron que la ACh a través de receptores nicotínicos y muscarínicos de acetilcolina, puede promover la proliferación en etapas tempranas de diferenciación e inhibirla en etapas posteriores. En osteocitos también se ha identificado la expresión de distintas subunidades componentes de los nAChR, al tratar células MLO-Y4 con ACh se observó un aumento en la expresión de la proporción RANKL-OPG (Ma et al., 2014).

En osteoclastos diferenciados a partir de médula ósea de ratón se ha detectado la presencia de las subunidades α 2, 7, 9 y 10, y las subunidades β 2 y 3 de nAChR. En ratones knockout de las subunidades α 7 o β 2 de nAChR se redujo la diferenciación mediada por RANKL de células de médula ósea a osteoclastos. Mientras que a nivel histomorfométrico se observó que en los ratones que carecían de la subunidad α 7, había una menor cantidad de osteoclastos por superficie de tejido óseo. Los análisis mediante microCT mostraron un mayor volumen óseo y una reducción en la separación trabecular. Estos resultados sugieren la influencia que tienen los nAChR en la osteoclastogénesis, a través de la modulación del calcio y la regulación de la expresión de NFATc1 (Mandl et al., 2016).

Mito et al. (2017) observaron que el knockout de nAChR α 7 disminuyó la formación de osteoclastos, sin observar cambio en la diferenciación o actividad en los osteoblastos, indicando un posible papel de los nAChR en el mantenimiento de la homeostasis ósea. En ratones knockout, Baumann et al. (2019) estudiaron el papel de las subunidades α 9 y α 10 de los nAChR en la integridad ósea. En los ratones con la delección de α 9 se observó una mayor fragilidad ósea, acompañada de disminución en la expresión de fosfatasa alcalina y colágeno tipo I en osteoblastos, así como reducción en su actividad, sin apreciar alteraciones en osteoclastos. Por otro lado, en los ratones con la delección de la subunidad α 10 no se apreciaron cambios a nivel celular o estructural de tejido óseo. En conjunto, estos hallazgos señalan la relevancia de las subunidades α 7 en la formación de osteoclastos y el impacto diferencial de las subunidades α 9 y α 10 en los osteoblastos, reforzando la idea de que los nAChR pueden tener un papel en la regulación de la remodelación ósea.

El estudio de los canales iónicos en la fisiología ósea nos ha permitido entender que también tienen un papel relevante en el mantenimiento de la integridad del tejido. Sugiriendo que su modulación selectiva podría ser un enfoque terapéutico viable. En este sentido, diversos canales como los nAChR han sido identificados como blancos moleculares de toxinas producidas por diversos organismos, como los caracoles marinos, víboras, lagartos venenosos (monstruo de Gila), entre otros (Kini, 2019; Nasiripourdori et al., 2011).

1.1.5 Toxinas como potencial estrategia terapéutica

Actualmente existen diversos medicamentos cuyo desarrollo es derivado del estudio de componentes en el veneno de distintos organismos. Por ejemplo, del veneno de la víbora *Bothrops jararacá* se aisló el péptido bradisinina (Ferreira et al., 1970), que permitió el desarrollo del captopril, un fármaco empleado para el tratamiento de la hipertensión (Cushman et al., 1977).

Las desintegrinas son una familia de mini-proteínas aisladas del veneno de algunas víboras. Se ha demostrado que bloquean la agregación plaquetaria al unirse al receptor $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, que previene la unión del fibrinógeno. Del veneno de la víbora *Echis carinatus* se aisló la desintegrina echistatin, inhibidor de la agregación plaquetaria (Gan et al., 1988).

Del veneno de *Sistrurus miliarius barbouri* se identificó barbourin (Scarborough et al., 1991), el estudio de esta mini-proteína permitió el desarrollo de los medicamentos Tirofiban (Merck & Co) y Eptifibatide (Cor Therapeutics) (Pennington et al., 2018). Del veneno producido por *Heloderma robustum* (monstruo de Gila), se aislaron las exendinas, péptidos que tienen una alta homología de secuencia con el péptido 1 similar al glucagón. En 2005 fue aprobado Byetta® (Amylin Pharmaceuticals), un medicamento desarrollado a partir de la Exendina-4 (Eng et al., 1992), empleado para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 (Pennington et al., 2018). El efecto de Exendina-4 ha sido evaluado también en el tejido óseo, empleando un modelo murino de pérdida ósea inducida por lipopolisacárido (LPS). En este contexto, la coadministración de Exendina-4 y LPS disminuyó la cantidad de osteoclastos, las áreas de resorción y las concentraciones séricas del telopéptido carboxiterminal reticulado del colágeno tipo I (CTX), en comparación con los ratones que recibieron únicamente LPS, lo que sugiere un efecto protector frente a la resorción inducida por inflamación (Shen et al., 2018). También se reportó que Exendina-4 promueve la proliferación y diferenciación de los osteoblastos a partir de células MC3T3-E1 (Feng et al., 2016), además de promover la proliferación de osteoblastos senescentes (Zhang et al., 2019).

Un grupo de especial interés farmacológico son las toxinas encontradas en el veneno de los caracoles del género *Conus*. Por ejemplo el péptido ω -conotoxina MVIIA aislado por McIntosh et al. (1982) y colaboradores, del veneno de *Conus magus*, es un potente bloqueador de los canales de calcio, que actualmente es utilizado en su versión recombinante para tratar el dolor crónico (Schmidtke et al., 2010). También se han caracterizado toxinas presentes en el veneno de *Conasprella ximenes* con potencial en la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Figueroa-Montiel et al., 2018). Del veneno de *Californiconus californicus* y *Conus inscriptus*, se han aislado conotoxinas con efecto proapoptótico en

distintas líneas celulares de cáncer (Oroz-Parra et al., 2016a, 2020b; Kumari et al., 2020). El estudio de los componentes del veneno de las especies de *Conus*, debido a su gran diversidad, representa una fuente de nuevos compuestos con potencial terapéutico para diversas patologías.

Caracoles del género *Conus*

La superfamilia *Conoidea* es un grupo diverso de gasterópodos marinos depredadores divididos en 16 familias, entre las cuales, los caracoles del género *Conus* son los más estudiados. Se conocen más de 500 especies de estos caracoles que están distribuidas por todo el mundo (Chen et al., 2018). Los caracoles *Conus* son depredadores que se alimentan de otros invertebrados marinos (gusanos, moluscos) y pequeños peces. Para poder capturar a sus presas, los *Conus* han desarrollado un aparato venenoso especializado. Los principales constituyentes son, sifón, utilizado para detectar presas y para respirar. La rádula, es la estructura que inyecta el veneno hacia la presa. En las glándulas venenosas es donde el veneno que contiene las conotoxinas es producido. La probóscide, es un tubo muscular que es proyectado hacia la presa, en él se encuentra la rádula cargada con el veneno (Anderson & Bokor, 2012; Gao et al., 2017; Olivera & Teichert, 2007). Las conotoxinas presentes en el veneno de los cónidos producen parálisis o muerte en las presas de manera rápida. Se estima que cada especie de *Conus* produce entre 100 a 200 péptidos bioactivos (Gao et al., 2017).

1.1.6 Conotoxinas

Dentro de los constituyentes del veneno producido por los caracoles *Conus* se encuentran proteínas, como las fosfolipasas del tipo A2, componentes no peptídicos como serotonina y ácido araquidónico, y una amplia variedad de péptidos bioactivos denominados conopéptidos (J. M. McIntosh et al., 1999). El término conopéptidos engloba a los péptidos del veneno de *Conus*, los cuales se dividen en dos clases: a) las conotoxinas, que son conopéptidos ricos en enlaces disulfuro, con dos o más enlaces de este tipo, y b) los conopéptidos pobres en disulfuros, que presentan o no un enlace disulfuro. Las conotoxinas están compuestas por 12 a 30 aminoácidos, rara vez superan los 60, y en su mayoría se dirigen a los canales iónicos o receptores del sistema nervioso (Terlau & Olivera, 2004).

Las conotoxinas generalmente se clasifican según tres criterios principales (Figura 3): a) la agrupación en superfamilias, basada en la similitud del péptido señal presente en sus transcritos; b) el marco de cisteínas y el patrón de enlaces disulfuro de la toxina madura; y c) sus blancos moleculares, clasificación también

conocida como familia farmacológica (McIntosh et al., 1994). Dentro de los blancos moleculares descritos se encuentran canales iónicos (como los de Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), receptores como el receptor nicotínico de acetilcolina, el receptor de serotonina, así como transportadores de neurotransmisores (Chen et al., 2018).

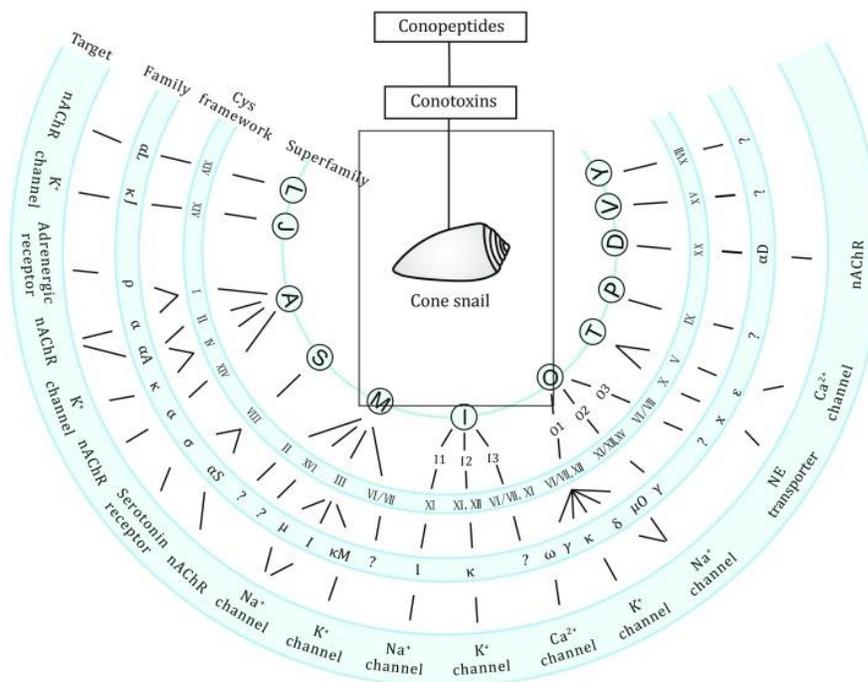


Figura 3. Clasificación de las conotoxinas. Las conotoxinas se clasifican en varias superfamilias basándose en la homología de la secuencia señal conservada. A su vez, se clasifican en familias basándose en su marco de cisteínas y blancos moleculares. NE= norepinefrina, nAChR= receptores nicotínicos de acetilcolina. Tomado de (N. Chen et al., 2018).

Las familias de conotoxinas α , μ y ω son las familias más caracterizadas hasta ahora. Las α -conotoxinas actúan principalmente como antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina, interfiriendo con la neurotransmisión colinérgica. Las μ -conotoxinas bloquean los canales de sodio dependientes de voltaje, inhibiendo la generación y propagación de potenciales de acción. Por su parte, las ω -conotoxinas inhiben los canales de calcio dependientes de voltaje, modulando la liberación de neurotransmisores (Turner et al., 2020). En los últimos años, las conotoxinas se han evaluado para el tratamiento de patologías que incluyen dolor crónico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia (Gao et al., 2017), cardioprotección (Lubbers et al., 2005), cáncer (Oroz-Parra et al., 2016a, 2020b) y diabetes tipo 2 (Lugo-Fabres et al., 2021). Algunas han alcanzado la etapa preclínica de desarrollo, por ejemplo: RgIA4 (KCP-400), un análogo de la α -RgIA del veneno de *Conus regius*, es un bloqueador del $\alpha 9\alpha 10$ nAChR que contrarresta el dolor neuropático (H. Wang et al., 2019); y mini-Ins, un análogo mínimo de insulina basado en el péptido

similar a la insulina que se encuentra en el veneno de *Conus geographus* se ha evaluado como tratamiento para la diabetes tipo I (Gorai & Vashisth, 2022). Las α -conotoxinas son una gran familia de péptidos antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). Estos pequeños péptidos (12-20 residuos de aminoácidos) pueden discriminar entre nAChR de tipo muscular y neuronal e incluso entre distintos subtipos de nAChR (Abraham et al., 2017; Lebbe et al., 2014).

Como se ha mencionado previamente, los procesos que regulan la remodelación ósea pueden verse afectados por la actividad de canales iónicos, los cuales se han relacionado con proliferación, diferenciación y actividad de las células óseas. Los desequilibrios de estos procesos a través de los canales iónicos se han asociado a padecimientos como osteoporosis u osteopetrosis. Las conotoxinas destacan por su capacidad de modular de manera selectiva canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , así como los receptores tipo canal activado por ligando, como los receptores nicotínicos de acetilcolina. Esta capacidad de modular blancos moleculares definidos abre la posibilidad de explorar su uso en la regulación del remodelado óseo y en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

1.2 Justificación

En la justificación se debe expresar el porqué del estudio y la razón de su realización. Convencer al lector de que se hizo una investigación significativa: la importancia, la pertinencia del tema, el objeto de estudio y la utilidad de los resultados obtenidos. Alteraciones en los procesos de remodelado óseo pueden conducir al desarrollo de patologías como la osteoporosis o la osteopetrosis, las enfermedades óseas representan un problema de salud pública creciente, especialmente al aumentar la esperanza de vida. Para avanzar en el desarrollo de nuevas terapias o mejorar las existentes, resulta esencial comprender los mecanismos moleculares que regulan la actividad de las células óseas. En este contexto, los canales iónicos se han identificado como reguladores de la proliferación, diferenciación y función de osteoblastos, osteoclastos y osteocitos.

El veneno de caracoles marinos del género *Conus* contiene una amplia diversidad de péptidos bioactivos, conocidos como conopéptidos, que actúan con especificidad sobre diversos blancos moleculares. Entre ellos, las conotoxinas destacan por modular canales iónicos dependientes de voltaje y canales iónicos activados por ligando, como los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). Las α -conotoxinas, son antagonistas selectivos de subtipos de nAChR, receptores ampliamente estudiados en el sistema nervioso y muscular, pero poco caracterizados en tejido óseo.

En este contexto, evaluar los efectos tanto de fracciones de veneno como de conotoxinas sintéticas en células óseas constituye un primer acercamiento para generar evidencia sobre su capacidad de modular procesos asociados a la remodelación. Estos estudios permitirían identificar nuevos agentes con potencial regulador de la remodelación ósea, orientados al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para patologías óseas, así como ayudar a identificar mecanismos moleculares que subyacen a la remodelación ósea.

1.3 Hipótesis

Las conotoxinas de caracoles del género *Conus* pueden modular los procesos celulares asociados a la remodelación ósea.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de fracciones del veneno de *C. ximenes* y de conotoxinas sintéticas sobre la remodelación ósea en modelos celulares *in vitro* y *ex vivo*.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Identificar fracciones del veneno de *C. ximenes* con capacidad de modular la formación o actividad de osteoclastos y osteoblastos *in vitro*.
2. Evaluar los efectos de conotoxinas sintéticas sobre osteoclastos, osteoblastos y osteocitos *in vitro*.
3. Seleccionar conotoxinas que modulen la diferenciación o actividad de osteoclastos y osteoblastos, y caracterizar sus efectos mediante análisis transcriptómico durante la diferenciación *in vitro*.
4. Evaluar los efectos de las conotoxinas seleccionadas sobre la remodelación ósea en cultivos de calvarias *ex vivo*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Recolección y extracción de veneno de *Conasprella ximenes*

Los caracoles marinos de la especie *Conasprella ximenes*, fueron colectados en Bahía de los Ángeles, ubicada a 480 km al sur de Ensenada, Baja California (28.9526° N, 113.5578° O).

El procedimiento de extracción del veneno y su fraccionamiento mediante HPLC-RP se realizó siguiendo la metodología descrita por Jiménez-Flores (2011). Para la obtención del veneno total, se realizó la disección del conducto venenoso de cada organismo, mismo que fue homogeneizado en un homogeneizador de vidrio que contenía una solución de acetonitrilo, ácido trifluoroacético, y agua destilada. El sobrenadante fue recuperado, liofilizado y almacenado a -80°C hasta su utilización. La cantidad de muestra de veneno total se obtuvo mediante diferencia de peso seco en el tubo de recolección.

2.2 Fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP)

El veneno liofilizado se resuspendió en agua destilada para su fraccionamiento mediante RP-HPLC en un cromatógrafo Agilent 1220 Series LC System, con una precolumna y columna analítica C18. Se cargaron 5 mg del extracto de veneno total, en un volumen de 200 µl de solución de ácido trifluoroacético al 0.12% (v/v). El flujo de elución fue constante de 1ml/min, con un gradiente lineal de 0 a 60% de solución de acetonitrilo puro con ácido trifluoroacético al 0.10% (v/v) durante 60 minutos. La detección de los péptidos se realizó por absorbancia a una longitud de onda de 230 nm. Se colectaron las fracciones cada 5 minutos, obteniendo 13 fracciones por cada corrida, mismas que fueron liofilizadas y almacenadas a 4°C hasta su utilización.

2.3 Conotoxinas

Las conotoxinas empleadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Dr. Alexei Licea Navarro (Departamento de Innovación Biomédica, CICESE). Se emplearon las versiones sintéticas adquiridas en

Ontores Biotechnologies. Ltd. (China), correspondientes a: Cal14.2b, antagonista de los nAChR $\alpha 9$ (Biggs et al., 2010); lmlb, antagonista de nAChR $\alpha 7$ (Mei et al., 2015); Xm1b, antagonista de nAChR $\alpha 7$ (Bernáldez, 2013); y Vc1.1 antagonista de nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Sandall et al., 2003).

a) **Xm1b**



Enlace disulfuro:
Cys1 ↔ Cys3
Cys2 ↔ Cys4

b) **lmlb**



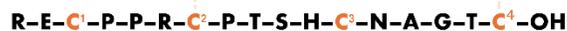
Enlace disulfuro:
Cys1 ↔ Cys3
Cys2 ↔ Cys4

c) **Vc1.1**



Enlace disulfuro:
Cys1 ↔ Cys3
Cys2 ↔ Cys4

d) **Cal14.2b**



Enlace disulfuro:
Cys1 ↔ Cys3
Cys2 ↔ Cys4

Figura 4. Secuencia de aminoácidos de las conotoxinas sintéticas. Las conotoxinas Xm1b, lmlb y Vc1.1 presentan amidación en el extremo C-terminal (-NH₂), mientras que Cal14.2b no está amidada (termina en -OH).

2.4 Mantenimiento de ratones

Los protocolos de manipulación de ratones se realizaron conforme a la norma mexicana NOM-062-Z00-1999. Los ratones BALB/c fueron obtenidos a partir de cruces realizadas en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica del CICESE, originalmente obtenidos de la empresa Envigo. Los ratones se mantuvieron en grupos de 4 por jaula (con un área de base aproximada de 34.3 × 29.2 cm y 15.5 cm de altura) del sistema Optimice (Animal Care Systems), en las que se colocó cama de aserrín (Teklad). Los ratones recibieron agua y comida *ad libitum*. El agua de los bebederos fue renovada cada 7 días (o antes si era necesario). Cada 3 días se verificó la disponibilidad de pienso (Harlan Teklad) y los ratones fueron cambiados de jaula cada 14 días. Como enriquecedores de ambiente, se colocó pañuelos desechables y tubos de cartón. La temperatura ambiente fue controlada a 24°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas.

Para fines reproductivos, se siguió un formato de tríos donde dos hembras se mantenían en la misma caja con un macho durante 15 días. Posteriormente las hembras fueron colocadas en cajas independientes y monitoreadas, hasta obtener la fecha de nacimiento de las crías. Las crías se mantuvieron con las hembras entre 3 a 4 semanas (hasta confirmar que son capaces de alimentarse solos), posteriormente fueron separados por sexo.

2.5 Evaluación del efecto de las fracciones en la viabilidad de celular

Las células RAW264.7 son macrófagos murinos que pueden diferenciarse en osteoclastos al ser tratados con RANKL (Hsu et al., 1999). El efecto de las fracciones del veneno en la proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de MTT (método colorimétrico del thiazolyl blue tetrazolium bromide). La reducción del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en las células viables produce un compuesto azul (formazan), cuya absorbancia fue leída a 570 nm, en el lector de placa EPOCH (BioTeck). Las células RAW264.7 fueron cultivadas con distintas concentraciones de cada fracción del veneno o con veneno total, al finalizar el tiempo de tratamiento (3 y 6 días) se adicionó el reactivo MTT, transcurridas 5 horas de incubación a 37°C se añadió buffer de lisis, y se incubó nuevamente, para posteriormente realizar las lecturas de absorbancia.

2.6 Modelo de osteoclastogénesis a partir de células de médula ósea de ratón

Las células de médula ósea se aislaron, en condiciones de esterilidad, de huesos largos de ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad (Halper et al., 2021). La médula ósea total fue cultivada durante 48 horas en medio α -MEM 1X, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, antibiótico/antimicótico (Ab/Am) 1%. Posteriormente se recuperó el medio de cultivo que tenía en suspensión las células no adherentes, y fue centrifugado durante 10 minutos a 350 g, el sobrenadante fue descartado y el pellet de células se resuspendió en solución de lisis de eritrocitos (Biolegend), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células recuperadas fueron sembradas por triplicado o cuadruplicado, a 4×10^4 células/200 μ l, por grupo de estudio, en placa de 96 pozos. Como medio de diferenciación, el medio de cultivo α -MEM 1X fue suplementado FBS al 10%, Ab/Am al 1%, L-glutamina 2 mM, factor estimulante de colonias de macrófagos murino 25 ng/ml (muM-CSF, PeproTech), y RANKL murino (PeproTech) 25 ng/ml. Para los diferentes tratamientos el medio de diferenciación fue complementado con las conotoxinas a evaluar. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada dos días durante 7 días, retirando únicamente la mitad del medio de cultivo de cada pozo.

Transcurrido el tiempo de diferenciación, las células fueron fijadas y teñidas con el kit Acid Phosphatase, Leukocyte (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los osteoclastos identificados como células grandes, TRAP positivas con presencia de 3 o más núcleos, fueron cuantificados. Se contó el total de osteoclastos por pozo utilizando un microscopio de campo claro Zeiss Axio Scope A1 microscope y la cámara AxioCam 505 color (Zeiss).

2.7 Ensayo de resorción de área por osteoclastos

El efecto de las conotoxinas en la actividad de los osteoclastos se evaluó mediante ensayos de resorción de área en placas Osteo Assay Surface (Corning), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células de médula ósea fueron sembradas por cuadruplicado empleando 4×10^4 células/200 μ l por pozo, en medio de cultivo α -MEM 1X suplementado con FBS al 10%, Ab/Am al 1%, L-glutamina 2 mM, M-CSF a 25 ng/ml, y RANKL a 25ng/ml, complementado con conotoxinas a evaluar. Cada dos días se realizó el cambio de medio durante 10 días. Después se retiró el medio de cultivo, y las células fueron lisadas usando una solución de hipoclorito de sodio 10%. Posteriormente se tomaron fotografías de las áreas resorbidas utilizando el microscopio de campo claro Zeiss Axio Scope A1 microscope y la cámara AxioCam 505 color (Zeiss) y se cuantificaron empleando el software ImageJ (NIH).

2.8 Evaluación de conotoxinas en osteoclastos humanos diferenciados a partir de aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

El siguiente procedimiento para la obtención de osteoclastos a partir de PBMC se adaptó de lo descrito por (Merrild et al., 2015).

La sangre fue colectada en tubos con EDTA como anticoagulante. Posteriormente fue diluida 1:1 con PBS, y centrifugada a 800 g durante 30 minutos, utilizando Ficoll-paque (Cytiva) como medio de separación. La capa intermedia de color blanco, la cual contiene las PBMC, se colectó y se le adicionó PBS, para ser centrifugada nuevamente a 300 g durante 5 minutos, el proceso se repitió dos veces más. Las células se resuspendieron en medio α -MEM complementado (FBS 10%, Ab/Am al 1%) y fueron sembradas a una densidad de 750,000 PBMC por cm^2 , en medio α -MEM complementado al cual se adicionó M-CSF humano (hM-CSF, PeproTech) a 25 ng/ml.

Después de 72 horas, las células adheridas (macrófagos dependientes de hM-CSF) se tripsinizaron y cuantificaron y posteriormente se sembraron en placas de 96 pozos a 12×10^3 células por pozo en 200 μ l, por cuadruplicado para cada tratamiento, y se cultivaron durante 24 horas. Las condiciones de cultivo fueron, medio α -MEM complementado y adicionado con hM-CSF a 25 ng/ml, a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO_2 . Después de las 24 horas de cultivo, se realizó un cambio del medio de cultivo para inducir la diferenciación a osteoclastos, con medio α -MEM complementado, adicionado con hM-CSF

(25 ng/ml), RANKL humano (hRANKL, PeproTech) a 25 ng/ml, y las conotoxinas (0.1 µg/ml). El 50% del medio de cultivo de cada pozo fue renovado cada dos días durante 8 días.

Al finalizar el tiempo de diferenciación las células fueron fijadas y teñidas con el kit Acid Phosphatase, Leukocyte (Sigma). Se tomaron imágenes representativas de cada pozo empleando el microscopio de campo claro Zeiss Axio Scope A1 microscope y la cámara AxioCam 505 color (Zeiss). Se cuantificaron todos los osteoclastos por pozo, para ello se identificaron células TRAP positivas, grandes y con presencia de 3 o más núcleos.

2.9 Ensayo de osteoblastogénesis a partir de células de médula ósea de ratón

La metodología empleada para la diferenciación de células de médula ósea de ratón a osteoblastos se basó en un protocolo proporcionado por la Dra. Lilian Plotkin (Indiana University School of Medicine) empleado habitualmente en su laboratorio de investigación.

El aislamiento de células precursoras de osteoblastos se realizó a partir de huesos largos de ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad. La médula ósea total fue cultivada en medio α -MEM (FBS al 10% y Ab/Am al 1%) durante tres días. Después las células no adherentes se tripsinizaron y fueron sembradas en placas de 96 pozos a 8×10^4 células por pozo en 200 µl, por triplicado o cuadruplicado. Las células recuperadas se cultivaron durante 24 horas en medio α -MEM (FBS al 10% y Ab/Am al 1%) sin ácido ascórbico, a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se realizó cambio de medio, complementado con ácido ascórbico 25 µg/ml y β -glicerofosfato 5 mM, y las conotoxinas o fracciones. El medio de cultivo se renovó cada tercer día durante 21 días. Posteriormente se realizó la tinción de Alizarin Red (40 mM, pH 4.2) para teñir las áreas calcificadas por los osteoblastos, en las áreas positivas se forma un quelato, que se aprecia por la aparición de coloración anaranjado-rojo. Las imágenes de las áreas mineralizadas fueron tomadas con el microscopio de campo claro Zeiss Axio Scope A1 microscope y la cámara AxioCam 505 color (Zeiss) y se cuantificaron empleando el software ImageJ (NIH).

2.10 Modelo de tejido óseo enriquecido en osteocitos

El procedimiento para la obtención de tejido enriquecido en osteocitos fue adaptado del protocolo publicado por (Bellido & Delgado-Calle, 2020).

Como primer paso, en condiciones estériles se realizó la disección de fémures y tibias de ratones BALB/c de 8 semanas de edad. Una vez retirado todo el tejido adherido a los huesos, se cortó la epífisis, y usando PBS se quitó la médula ósea de los huesos. Cada uno de los huesos colectados fue colocado en un pozo de una placa de 24 pozos al cual se le adicionó 1.5 ml de solución de colagenasa (0.2 mg/ml de colagenasa IA (Sigma), en medio α -MEM, 1% de BSA), y se incubaron durante 25 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO₂, con agitación. Transcurrido el tiempo se recolectó y desechó la solución de digestión. Este proceso fue repetido tres veces. Posteriormente se adicionó 1.5 ml de la solución de EDTA (solución de EDTA a 5 mM, pH 7.4, en PBS 1X, 1% BSA), los huesos fueron incubados durante 25 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO₂. Después se descartó la solución de EDTA y el proceso fue repetido 6 veces más, alternando entre solución de colagenasa y de EDTA. Al finalizar los huesos fueron lavados con PBS 1X, y cultivados en medio α -MEM complementado con FBS 10%, antibiótico/antimicótico al 1%, y las conotoxinas a 0.1 μ g/ml, durante 72 horas. Los tejidos enriquecidos en osteocitos fueron almacenados a -80°C hasta la extracción de RNA para evaluar la expresión de genes marcadores de osteocitos mediante RT-qPCR, se emplearon 4 tejidos por condición.

2.11 Evaluación de conotoxinas en el modelo de cultivo *ex vivo* de calvarias de ratón neonato

El procedimiento para la disección y procesamiento histológico de los tejidos de calvaria se basó en el protocolo publicado por (Cuero et al., 2020). En condiciones estériles se realizó la disección de la calvaria de ratones neonatos (4-5 días de edad). Cada calvaria se cortó a la mitad, y los tejidos fueron cultivados durante 7 días en medio α -MEM, 10 % FBS, 1% antibiótico/antimicótico, así como conotoxinas a 0.1 μ g/ml, a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% de CO₂, el cambio de medio de cultivo se realizó cada 2 días. Se emplearon 4 hemi-calvarias por condición para análisis histológico y cuatro hemi-calvarias para evaluar la expresión de genes mediante RT-qPCR.

2.11.1 Procesamiento para análisis histológico de hemi-calvarias

Las hemi-calvarias fueron colocadas en casetes para histología envueltos en papel de china y sumergidos en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas a 4°C. Después de retirar la formalina los tejidos fueron enjuagados con PBS 1X y colocados en solución de EDTA 10% (pH 8) para desmineralizarlos durante

48 horas. Finalmente se retiró la solución de EDTA, se lavaron las calvarias con PBS 1X, y se agregó etanol al 70% y se mantuvieron así hasta su procesamiento histológico.

El procesamiento histológico de las muestras fue el siguiente: los tejidos fueron sumergidos de manera consecutiva en etanol al 96% y 100%, xileno al 100%, y embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm de grosor, que fueron transferidos a un baño de agua con gelatina, colocados en portaobjetos e incubados en una estufa a 60°C durante 20 minutos. El proceso de rehidratación de los tejidos fue de la siguiente manera, xileno al 100% (5 minutos x2), etanol al 100, 70 y 50% (durante 1 minuto en cada solución), y por último agua. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina durante 20 segundos, se enjuagaron con agua, se sumergieron en etanol ácido por 1.5 minutos y solución saturada de carbonato de litio por 2 minutos. Posteriormente, se enjuagaron con agua, para ser sumergidas en etanol al 96%, después las laminillas fueron teñidas con eosina-Orange G por 1 minuto. Finalmente, los tejidos fueron deshidratados con etanol al 96 y 100%, y colocados en xileno por 5 minutos. Las muestras fueron observadas en microscopio de campo claro para la obtención de imágenes representativas. El análisis histomorfométrico y la cuantificación de osteoclastos se realizó empleando el software ImageJ.

2.11.2 Procesamiento de muestras para evaluar la expresión de genes

2.11.2.1 Extracción de RNA de hemi-calvarias

Las hemi-calvarias recolectadas y almacenadas a -80°C, en solución de lisis del kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma), fueron descongeladas en hielo, a cada tubo se le adicionó 100 mg de perlas de óxido de zirconio (MP Biomedicals), y se homogeneizaron empleando el equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals). El proceso de homogenización consistió en 2 ciclos de 30 segundos con una velocidad de 6.0 m/s cada uno, las muestras se colocaron en hielo 5 minutos entre cada ciclo. Después de la homogeneización las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y la extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep.

2.11.2.2 Extracción de RNA de tejidos enriquecidos en osteocitos

En cada uno de los tubos que contenían los tejidos enriquecidos en osteocitos, se colocó una perla de zirconio de 5.5 mm y se adicionó el reactivo TRI (Sigma). El proceso de homogeneización consistió en 4 ciclos de 30 segundos con una velocidad de 6.0 m/s cada uno en el equipo FastPrep-24, las muestras se colocaron en hielo 5 minutos entre cada ciclo. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. La extracción del RNA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el reactivo TRI.

2.11.2.3 Extracción de RNA de osteoclastos y osteoblastos

Para la extracción de RNA proveniente de osteoclastos y osteoblastos cultivados *in vitro*, las células fueron diferenciadas en placas de 6 pozos por triplicado, el último día del tiempo de tratamiento se realizó la extracción de RNA de acuerdo con las indicaciones del fabricante empleando el kit GenElute Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma).

Para todas las muestras la cantidad de RNA extraída se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop LITE (Thermo Scientific), mientras que, empleando electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se evaluó la integridad del RNA. Las muestras de RNA se almacenaron a -80°C.

2.11.3 PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR)

Partiendo de 500 ng de RNA se realizó la síntesis de cDNA utilizando Oligo (dT)₂₀ (25 ng/μl, Thermo Fisher Scientific), dNTPs (500 μM) y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El cDNA de cada muestra se analizó por triplicado mediante PCR en tiempo real, empleando QuantiTect SYBR[®] Green Master Mix (Qiagen). La expresión génica se normalizó utilizando *Rp132* como gen de referencia. La PCR se realizó en un termociclador 7500 (Applied Biosystems), y el software 7500 (v2.0.6). En la siguiente tabla se muestran los oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión de genes.

Tabla 4. Secuencias sentido y antisentido de los oligonucleótidos empleados para evaluar expresión de genes.

	Sentido	Antisentido
<i>Rpl32</i>	5'-CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG-3'	5'-CTTAGAGGACACATTGTGAGCAATC-3'
<i>Chrna7</i>	5'-CACATTCCACACCAACGTCTT-3'	5'-AAAAGGGAACCAGCGTACATC-3'
<i>Chrna9</i>	5'-GGAACCAGGTGGACATATTCAAT-3'	5'-GCAGCCGTAGGAGATGACG-3'
<i>Nfatc1</i>	5'-GGAGAGTCCGAGAATCGAGAT-3'	5'-TTGCAGCTAGGAAGTACGTCT-3'
<i>Oscar</i>	5'-CCTGGCACCTACTGTTGCTA-3'	5'-TGGAGTTGATGTCCCCTGGT-3'
<i>Trap</i>	5'-CTGGTATGTGCTGGCTGGAA-3'	5'-CCCAGGTCTCGAGGCATTTT-3'
<i>Ctsk</i>	5'-GAGGGCCAACTCAAGAAGAA-3'	5'-GCCGTGGCGTTATACATACA-3'
<i>Tnfrsf11a*</i>	5'-TGTGTGTTGCTCCACATTT-3'	5'-TCCCATGGAGCTGGAGTTAC-3'
<i>Runx2</i>	5'-GGCACAGACAGAAGCTTGATGA-3'	5'-GAATGCGCCCTAAATCACTGA-3'
<i>Alpl</i>	5'-CACAGATCCCAAAGCACCT-3'	5'-GGGATGGAGGAGAGAAGGTC-3'
<i>Col1a1</i>	5'-CCTGGATGCCATCAAAGTCT-3'	5'-CGCCATACTCGAACTGGAAT-3'
<i>Bglap</i>	5'-CTTGCTTCTGACTGGGTGT-3'	5'-GGCCACTTACCAAGGTAGC-3'
<i>Tnfsf11**</i>	5'-TGTGTGTTGCTCCACATTT-3'	5'-TCCCATGGAGCTGGAGTTAC-3'
<i>Tnfrsf11b***</i>	5'-CCAAGCATGCTGAGTGAGAA-3'	5'-CAGCTGTGAGGAGAGGAAGG-3'
<i>Dmp1</i>	5'-CATTCTCCTGTGTTCTTTGGG-3'	5'-TGTGGTCACTATTGCCTGTG-3'
<i>Mepe</i>	5'-GTCTGTTGGACTGCTCCTT-3'	5'-CACCGTGGGATCAGGATACA-3'
<i>Sost</i>	5'-AGCCTCAGGAATGATGCCAC-3'	5'-CTTTGGCGTCATAGGGATGGT-3'

*En adelante referido como *Rank*, ** En adelante referido como *Rankl*, *** En adelante referido como *Opg*.

2.12 Preparación de muestras para análisis transcriptómico y análisis de datos

Se aisló el RNA total de osteoclastos obtenidos de médula ósea de ratón a los 7 días de diferenciación, mientras que de osteoblastos el RNA total fue aislado a los 21 días de diferenciación, empleando el kit RNeasy Mini (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total se cuantificó con un fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen).

La preparación de las muestras para el análisis bioinformático se realizó con el apoyo de la Dra. Claudia Ventura, mientras que el análisis de los datos fue llevado a cabo por el Dr. Pavel Galindo, la metodología seguida se describe a continuación. La integridad del RNA se analizó en un equipo Bioanalyzer (Agilent). Como lineamiento de calidad, solo las muestras de RNA con un número de integridad del RNA (RIN) superior a 8 fueron almacenadas a -80 °C y empleadas para la preparación de bibliotecas. Para la preparación de bibliotecas se siguieron las instrucciones del fabricante empleando el kit TruSeq Stranded

mRNA, las bibliotecas fueron amplificadas empleando PCR, cuantificadas en Qubit y evaluadas con un Bioanalyzer.

Las bibliotecas fueron enviadas a Novogene UC Davis Sequencing Center para su secuenciación en una plataforma HiSeq (Illumina). Todas las lecturas sin procesar se depositaron en la base de datos Short Read Archive (SRA) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con el número de acceso: PRJNA1108864. La calidad de los datos secuenciados fue inicialmente evaluada empleando FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Posteriormente, utilizando Trimmomatic 0.39v (Bolger et al., 2014) se removieron los adaptadores Illumina, los índices y las lecturas de baja calidad (lecturas con una puntuación phred33 < 30 y una longitud inferior a 36 pb). Se utilizó el programa MultiQc (Ewels et al., 2016) para agrupar los resultados obtenidos de FastQC antes y después del procesamiento de adaptadores. Las lecturas de cada biblioteca se pseudoalinearon con el transcriptoma de *Mus musculus* (GRmc39) empleando Kallisto V. 0.46.1 (Bray et al., 2016). La expresión diferencial de genes se realizó con Differential Expression and Pathway analysis (iDEP.92) (Ge et al., 2018) empleando los valores predeterminados. Los genes con un recuento mínimo por millón (CPM) ≥ 1 en al menos una biblioteca fueron conservados. El análisis diferencial de expresión génica fue con el paquete DESeq2 (Love et al., 2014). Se conservaron los genes con un valor de corte de FDR < 0.1 y un $\log_2FC > 2$.

2.13 Análisis estadístico

Para la comparación de dos grupos no pareados se utilizó Shapiro-Wilks como prueba de normalidad, la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, y la prueba t, de Student para comparación entre grupos. Para comparaciones de más de dos grupos se empleó ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Dunnett. Cuando la distribución de los datos no siguió los supuestos estadísticos de distribución normal se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparación de dos grupos, y para comparación de más de dos grupos la prueba de Kruskal-Wallis, al observar significancia en la diferencia de al menos dos grupos, se empleó U de Mann-Whitney.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Evaluación de las fracciones de *C. ximenes* en células óseas

3.1.1 Extracción y fraccionamiento por HPLC del veneno total del *C. ximenes*

En Bahía de los Ángeles, San Quintín, Baja California, fueron recolectados un total de 138 especímenes de *C. ximenes*. De los organismos colectados se realizó la disección del conducto venenoso y mismo que fueron homogeneizado en una solución de ácido trifluoroacético al 0.12% (v/v). Los tejidos homogeneizados fueron centrifugados por 5 minutos a 10,000 g, y el sobrenadante fue colectado y liofilizado. Se obtuvieron 52.55 mg de veneno total, el cual se almacenó a -20 °C hasta su fraccionamiento.

El veneno total liofilizado se resuspendió para ser fraccionado empleando cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (HPLC). En cada corrida de fraccionamiento se cargaron 5 mg de veneno en 200 µl de agua con ácido trifluoroacético al 0.12%. El fraccionamiento fue realizado con un flujo constante de 1 ml/min, empleando un gradiente lineal de elución de 0 a 60% de solución de acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.10% (v/v) durante 60 minutos. Se realizó un lavado de 5 minutos previo al inicio del gradiente. La detección de los péptidos se realizó por absorbancia a una longitud de onda de 230 nm. Se recolectaron fracciones cada 5 minutos, obteniendo 13 fracciones (la fracción 1 corresponde al lavado inicial) por cada corrida. En el perfil cromatográfico se pueden apreciar uno o múltiples picos dentro de cada fracción colectada (identificadas como F1 hasta F13), cada pico corresponde a un péptido o mezcla de ellos eluidos en distintos tiempos dependiendo de su hidrofobicidad (Figura 5). Las fracciones colectadas fueron liofilizadas y almacenadas a 4°C hasta su evaluación *in vitro*.

3.1.2 Efecto de las fracciones del veneno de *C. ximenes* en la viabilidad de células RAW264.7

Después del fraccionamiento del veneno de *C. ximenes*, se evaluó el efecto del veneno total y de las 13 fracciones en la viabilidad celular a distintas concentraciones, mediante el ensayo colorimétrico de MTT en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7. El protocolo de diferenciación de células RAW264.7

a osteoclastos se completa en un lapso de 7 días, por ello se decidió evaluar el efecto citotóxico a los 3 y 6 días de tratamiento.

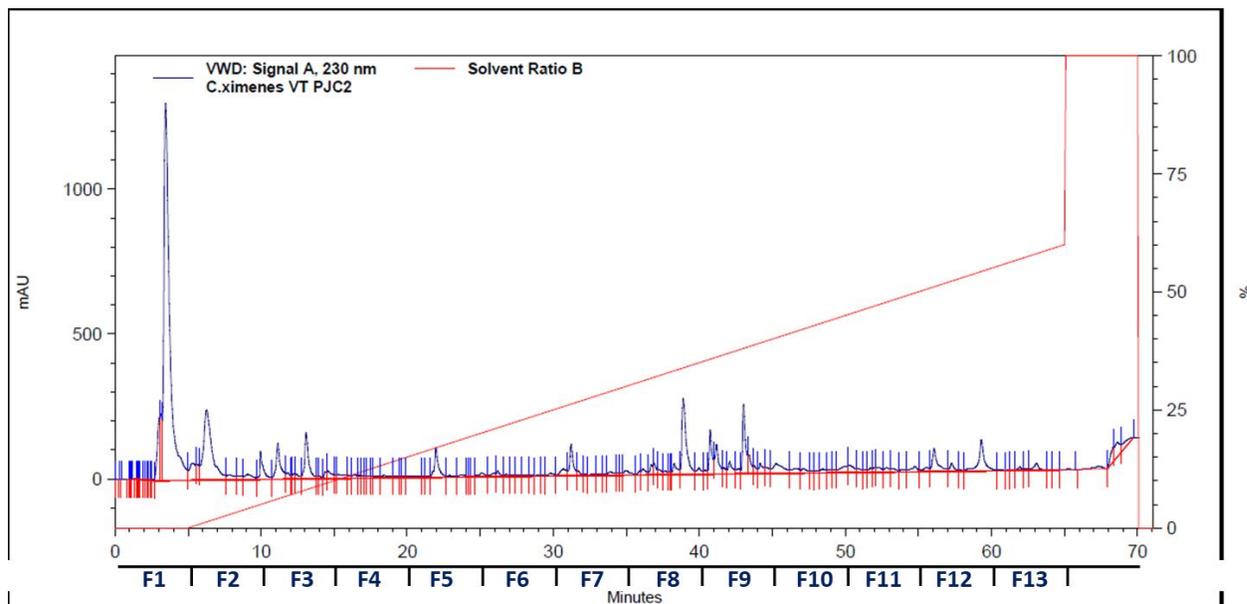


Figura 5. Cromatograma del fraccionamiento del veneno total de *C. ximenes*. Empleando RP-HPLC se fraccionó el veneno total de *C. ximenes*. En cada fraccionamiento se cargaron 5 mg de veneno total, en un volumen de 200 μ l de solución de ácido trifluoroacético al 0.12% (v/v). La línea azul representa el perfil de absorbancia a 230 nm, correspondiente a la detección de los componentes peptídicos, mientras que en rojo se indica el gradiente de elución. Se colectaron las fracciones cada 5 minutos, incluyendo los primeros 5 minutos de lavado, obteniendo un total de 13 fracciones por cada corrida.

A través del método colorimétrico MTT se observó que a los tres días de tratamiento hubo una disminución en la viabilidad celular en los grupos tratados con las fracciones F1 y F3 a 0.1 μ g/ml, así como con F4 a 50 μ g/ml. Al día 6, las fracciones F5 (0.1, 1, 25 μ g/ml), F8 (0.1 μ g/ml), F9 (10 μ g/ml) y F10 (50 μ g/ml) también tuvieron un efecto en la viabilidad celular. Sin embargo, la disminución en la viabilidad celular apreciada no se consideró como biológicamente significativa, ya que los valores más bajos permanecieron superiores al 85% de supervivencia. Este resultado sugiere que, en las condiciones evaluadas, las fracciones no presentan un efecto nocivo en la viabilidad celular sobre las células RAW264.7. Como consiguiente, se seleccionaron aquellas fracciones que teníamos en mayor cantidad para ser evaluadas en ensayos de diferenciación de células RAW264.7 a osteoclastos.

3.1.3 Efecto de las fracciones del veneno de *C. ximenes* en la diferenciación de células óseas

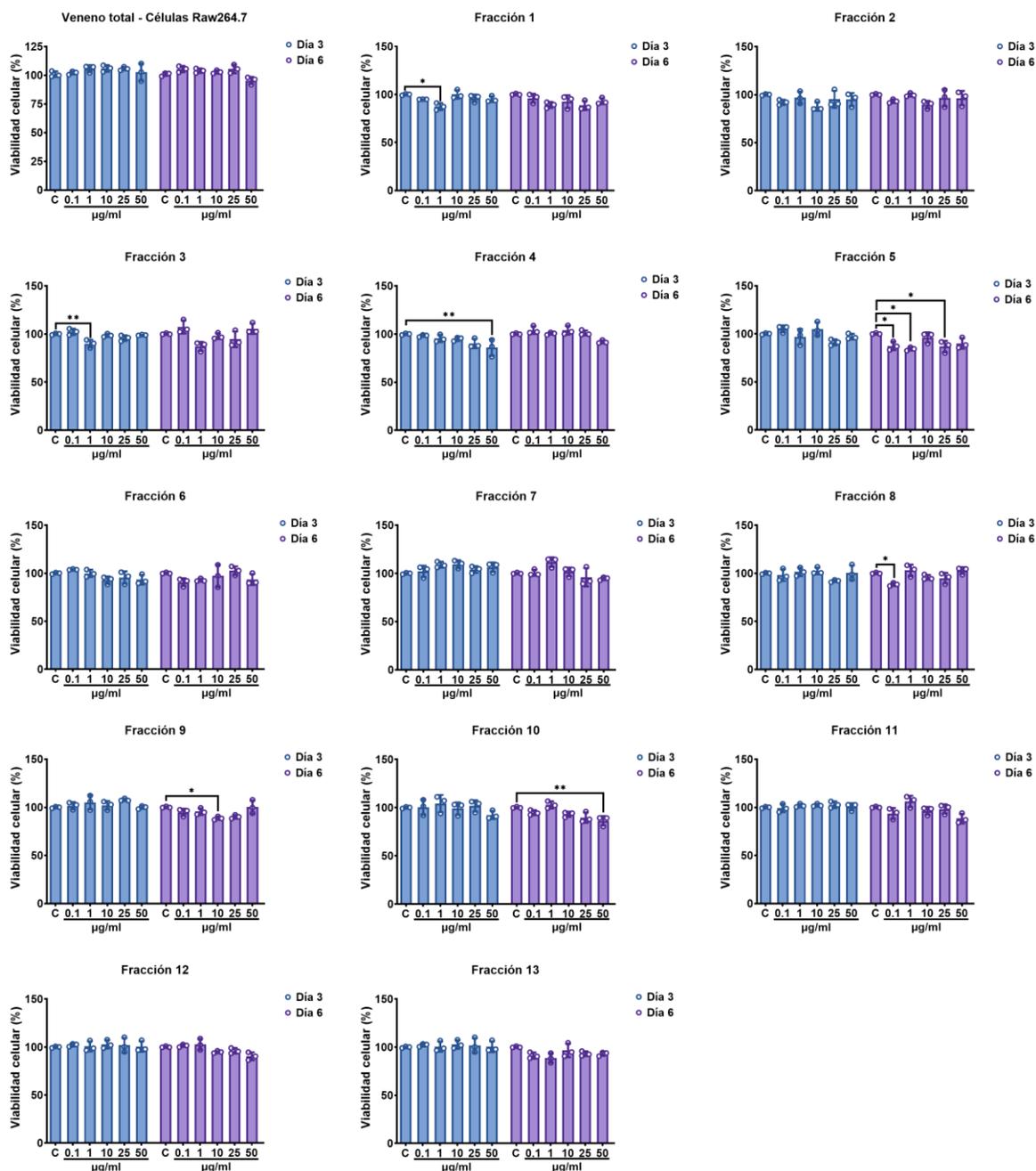


Figura 6. Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones del veneno de *C. ximenes* en células RAW264.7. El efecto citotóxico de las fracciones del veneno de *C. ximenes* fue evaluado a los 3 y 6 días de cultivo en células RAW264.7, mediante el ensayo de MTT. Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad celular respecto al grupo control. *P<0.05, **P<0.01, ANOVA de 1 vía con post-test de Dunnett. C = Control.

3.1.3.1 Evaluación de fracciones del veneno de *C. ximenes* en osteoclastogénesis

Se evaluaron siete fracciones (F1, F2, F3, F5, F7, F8 y F9) con el fin de evaluar su efecto en la osteoclastogénesis, con base en la cantidad disponible. Estas se probaron a 50 µg/ml, concentración correspondiente a la mayor dosis evaluada que no afectó la viabilidad celular.

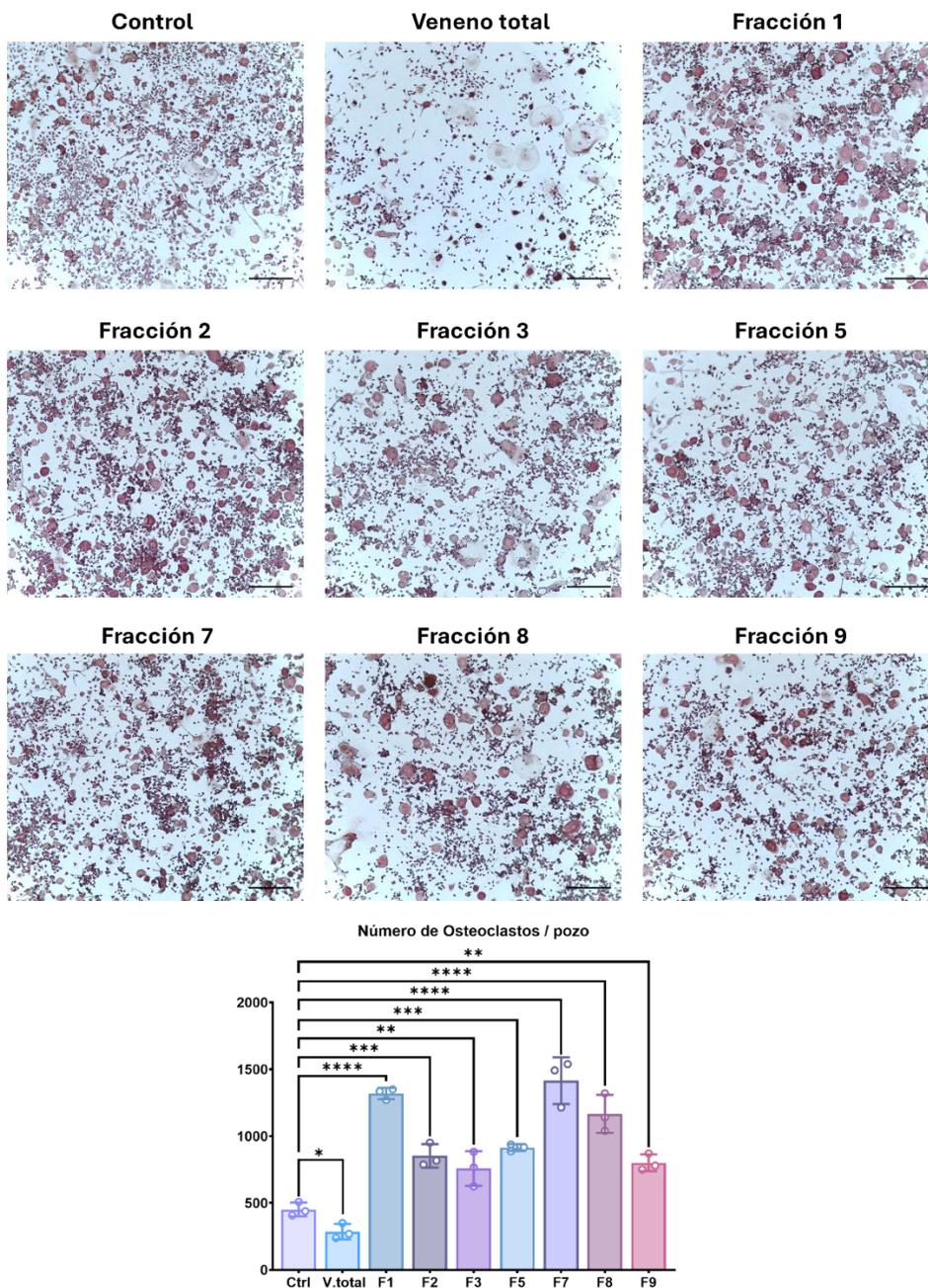


Figura 7. Efecto de las fracciones del veneno de *C. ximenes* en osteoclastogénesis. Las células RAW264.7 fueron cultivadas en presencia de RANKL (12.5 ng/ml) y veneno total o la fracción de veneno indicada (50µg/ml). Después de 7 días de cultivo se realizó una tinción TRAP y se cuantificó el número de osteoclastos por pozo. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, ANOVA de una vía con post test de Dunnett.

Los resultados del ensayo mostraron que el tratamiento con veneno total redujo significativamente la osteoclastogénesis en un 37% ($P < 0.05$) aproximadamente respecto al grupo control (Figura 7). En contraste, todas las fracciones evaluadas promovieron un incremento en el número de osteoclastos. La fracción F7 indujo más del doble de osteoclastos frente al control. También se observaron incrementos relevantes con F1 (190%) y F8 (162%); mientras que F2 (88%), F3 (67%), F5 (98%) y F9 (80%) mostraron efectos positivos más moderados, pero también aumentos significativos respecto al control. En conjunto, estos resultados muestran que el veneno total contiene componentes con actividad inhibitoria de la diferenciación de células RAW264.7 a osteoclastos, mientras que sugiere la presencia de péptidos con actividad pro-osteoclastogénica en fracciones del veneno de *C. ximenes*.

3.1.3.2 Evaluación de las fracciones del veneno de *C. ximenes* en osteoblastogénesis

De las 13 fracciones obtenidas del veneno de *C. ximenes* mediante RP-HPLC, se tomaron de la 1 a la 12 para evaluar su efecto en osteoblastogénesis. Para ello, la diferenciación de células de médula ósea de ratón hacia osteoblastos fue inducida con ácido ascórbico (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y β -glicerofosfato (5 mM), y tratadas con tres concentraciones distintas de cada fracción (1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 21 días. Una vez concluido el periodo de diferenciación, se realizó una tinción con Alizarin Red para identificar las zonas de matriz mineralizada, las áreas teñidas fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ.

La cuantificación de la mineralización mostró distintos efectos en la mineralización según la fracción y concentración evaluada. Por un lado, las fracciones F1, F2, F3 (Figura 8), F5, F6, F7, F8 (Figura 9), F9, F11, y F12 (Figura 10), no promovieron cambios significativos en la mineralización de los osteoblastos, sugiriendo que, bajo las condiciones evaluadas, los componentes de estas fracciones no tienen un efecto modulador de la mineralización.

La fracción 4 (Figura 8) mostró un efecto bifásico, la mayor concentración (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) disminuyó el área mineralizada con una reducción cercana al 80% ($P < 0.01$), el efecto observado en la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no fue significativo, pero se observó una tendencia a la baja, mientras que la menor concentración (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) promovió casi el doble de mineralización respecto al control. El tratamiento con la fracción 5 (Figura 9) únicamente a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, causó una disminución alrededor del 70% ($P < 0.01$) en la mineralización.

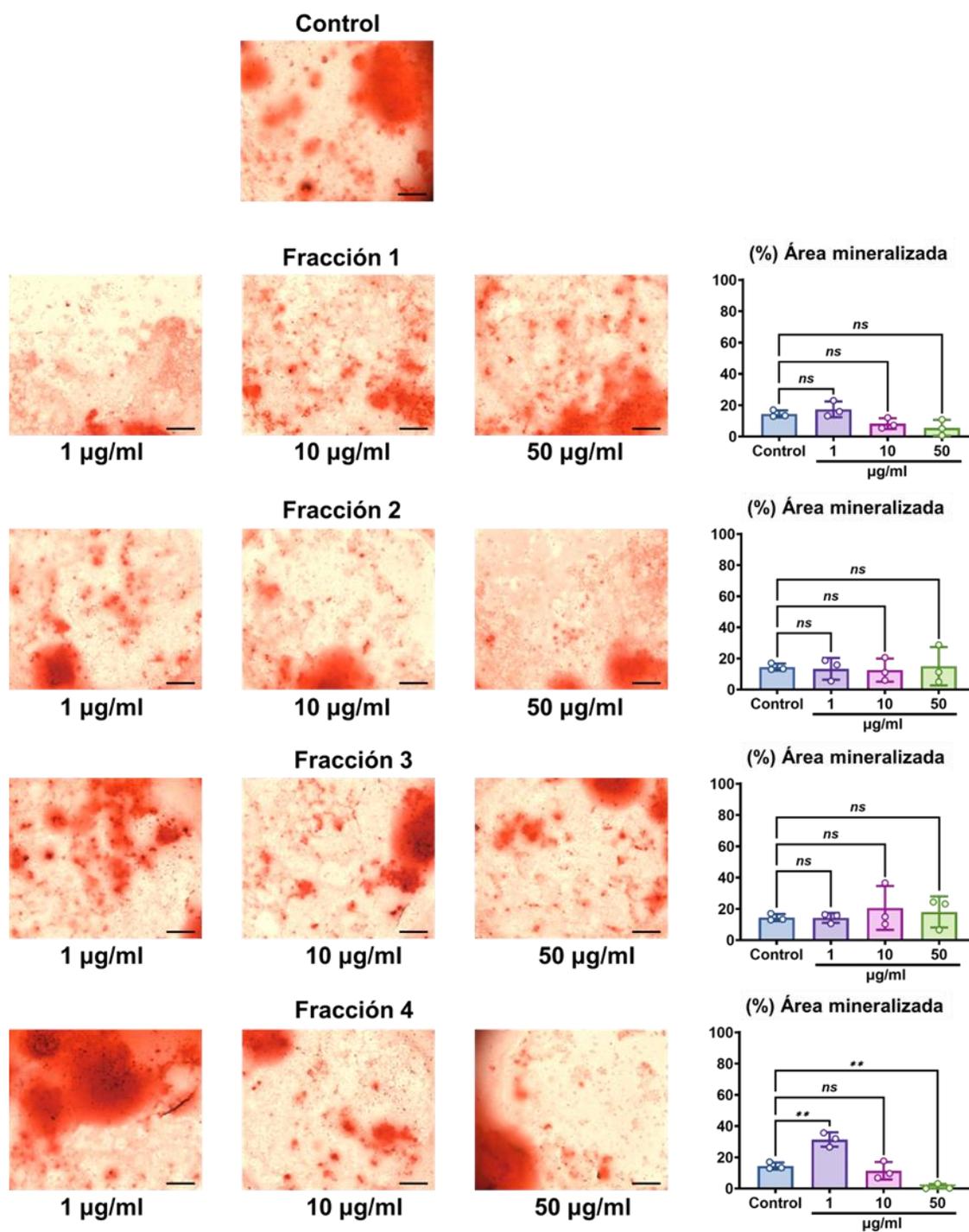


Figura 8. Efectos de las fracciones 1 a 5 del veneno de *C. ximenes* en la mineralización de osteoblastos. Las células de médula ósea fueron diferenciadas a osteoblastos (ácido ascórbico 25 µg/ml, y β-glicerofosfato 5 mM) y tratadas con distintas concentraciones de de la fracción 1 a 5. Después de 28 días de cultivo, los osteoblastos se fijaron y se tiñeron con Alizarin Red S. *P<0.05, **P<0.01, ANOVA de una 1 vía con post-test de Dunnett. Barra de escala = 200 µm.

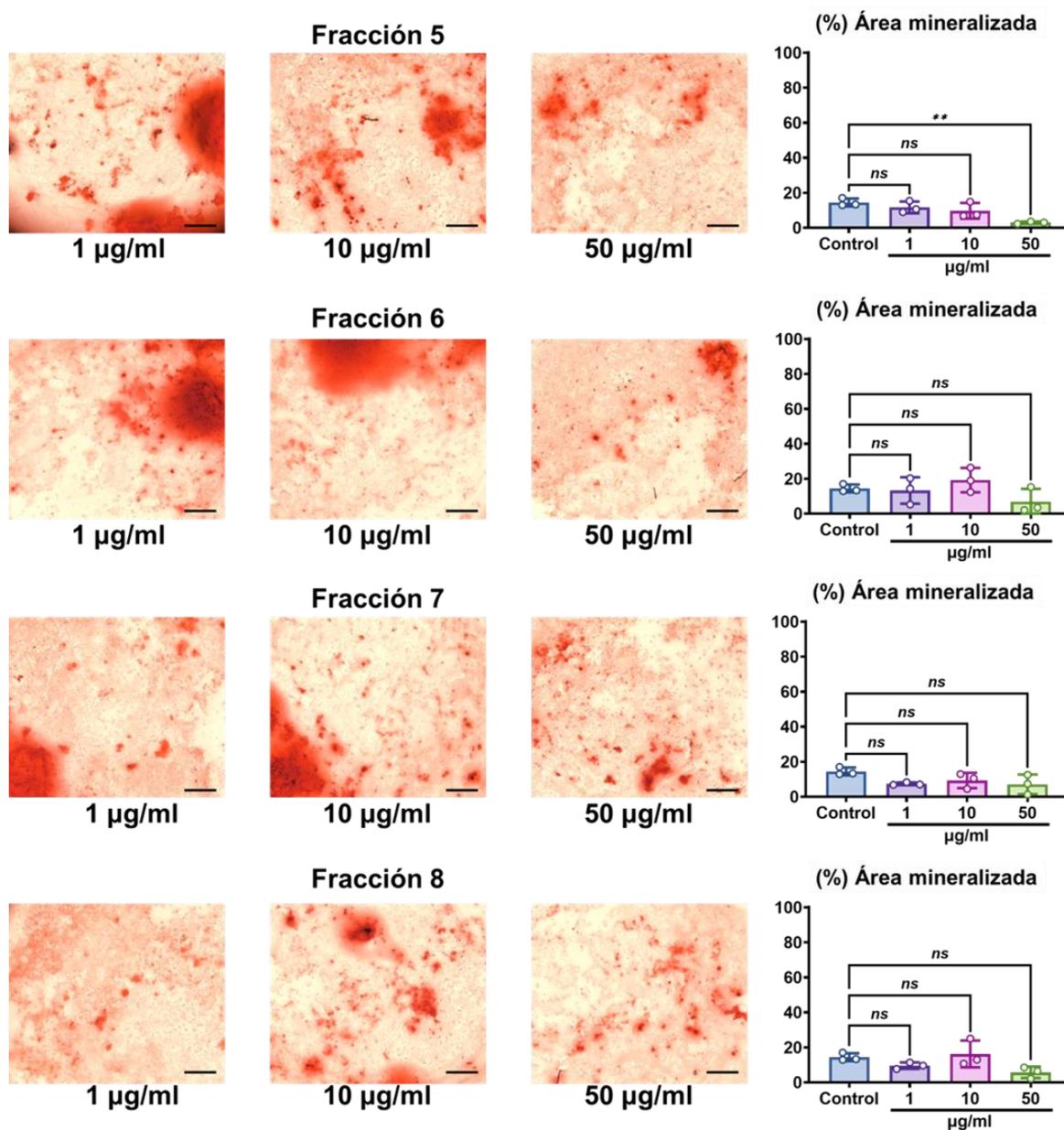


Figura 9. Efectos de las fracciones 5 a 8 del veneno de *C. ximenes* en la mineralización de osteoblastos. Las células de médula ósea fueron diferenciadas a osteoblastos (ácido ascórbico 25 µg/ml, y β-glicerofosfato 5 mM) y tratadas con distintas concentraciones de cada fracción (F5 a F8). Después de 28 días de cultivo, los osteoblastos se fijaron y se tiñeron con Alizarin Red S. *P<0.05, **P<0.01, ANOVA de una 1 vía con post-test de Dunnett. Barra de escala = 200 µm.

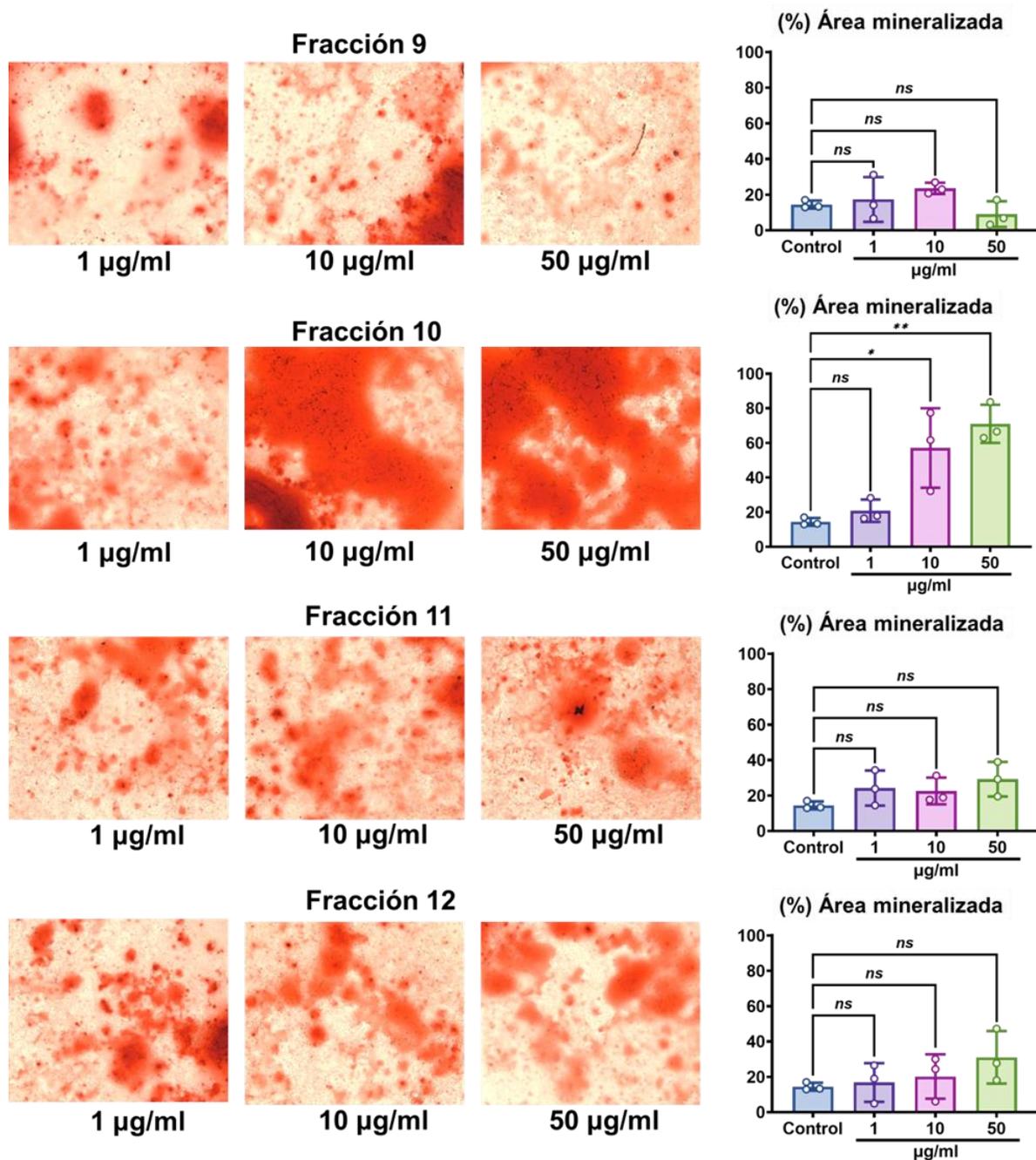


Figura 10. Efectos de las fracciones 9 a 12 del veneno de *C. ximenes* en la mineralización de osteoblastos. Las células de médula ósea fueron diferenciadas a osteoblastos (ácido ascórbico 25 µg/ml, y β-glicerofosfato 5 mM) y tratadas con distintas concentraciones de cada fracción (F9 a F12). Después de 28 días de cultivo, los osteoblastos se fijaron y se tiñeron con Alizarin Red S. *P<0.05, **P<0.01, ANOVA de una 1 vía con post-test de Dunnett. Barra de escala = 200 µm.

Por el contrario, la fracción 10 (Figura 10) mostró un efecto dosis dependiente, si bien a la menor concentración no se apreciaron cambios detectables en el porcentaje de área mineralizada, a 10 µg/ml la mineralización se incrementó casi tres veces más, y a 50 µg/ml fue casi cuatro veces más el área

mineralizada respecto al control, sugiriendo la presencia de componentes capaces de promover o inhibir la mineralización de los osteoblastos.

En el caso de la fracción 5 se pudo observar que a la concentración de 50 µg/ml, tuvo un efecto pro-osteoclastogénico mientras que disminuyó la mineralización de osteoblastos. Las fracciones 4 y 10 que promovieron la mineralización no fueron evaluadas en osteoclastogénesis. En conjunto, estos resultados indican que los componentes presentes en el veneno total y las fracciones del veneno de *C. ximenes* pueden modular la diferenciación o actividad de osteoclastos y osteoblastos.

3.2 Evaluación de conotoxinas sintéticas en remodelación ósea

3.2.1 Efecto de las conotoxinas sintéticas en la viabilidad celular

Como primer paso para explorar el potencial modulador de la remodelación ósea de las conotoxinas, se evaluó el efecto citotóxico de las conotoxinas sintéticas Xm1b, Vc1.1, lmlb, y Cal14.2b en células de médula ósea de ratón a distintas concentraciones (Tabla 5) y tiempos de cultivo utilizando el ensayo de MTT. Las conotoxinas evaluadas se unen preferentemente a los nAChR $\alpha 7$ (lmlb y Xm1b) (Mei et al., 2015), $\alpha 9$ (Cal14.2b) (Biggs et al., 2010) y $\alpha 9\alpha 10$ (Vc1.1) (Sandall et al., 2003), los cuales son expresados en células óseas y su modulación ha mostrado tener impacto en la integridad del tejido óseo.

Tabla 5. Concentraciones empleadas de las conotoxinas evaluadas

Identificador	Concentración	Xm1b	Vc1.1	lmlb	Cal14.2b
A	0.1 µg/ml	0.0656 µM	0.0552 µM	0.0737 µM	0.0546 µM
B	1 µg/ml	0.656 µM	0.552 µM	0.737 µM	0.546 µM
C	10 µg/ml	6.56 µM	5.52 µM	7.37 µM	5.46 µM
D	25 µg/ml	16.39 µM	13.80 µM	18.42 µM	13.66 µM
E	50 µg/ml	32.78 µM	27.60 µM	36.84 µM	27.32 µM

Los resultados mostraron que la conotoxina Xm1b no afectó la viabilidad celular a los 2 días; sin embargo, a los 4 y 6 días se observó una reducción significativa con los tratamientos a las 6.56, 16.39 y 32.78 µM (Figura 11). La conotoxina Vc1.1 mostró una disminución en la viabilidad desde el día 2, a partir de 5.52 µM. A los días 4 y 6 de evaluación, se observó disminución incluso con 0.0552 µM ($P < 0.05$). En el caso de

la conotoxina Imlb exhibió un efecto negativo en los días 4 y 6, a partir de 0.0737 μM . Finalmente, la conotoxina Cal14.2b, no tuvo un impacto a los 2 días, pero a partir del día 4 produjo una disminución en la viabilidad con las concentraciones de 13.66 y 27.32 μM , mientras que al día 6 este efecto se presentó desde 0.546 μM .

En conjunto, observamos que las cuatro conotoxinas evaluadas afectan la viabilidad de las células de médula ósea de ratón de manera dependiente de concentración y tiempo de exposición. Las conotoxinas Imlb y Vc1.1 fueron quienes mostraron un mayor efecto citotóxico. Esta caracterización nos permitió identificar que concentraciones más bajas evaluadas (concentraciones A y B, Tabla 5) para cada conotoxina no tienen un efecto biológicamente significativo en la viabilidad de estas células. En consecuencia, dichas concentraciones se consideraron adecuados para empleadas en los ensayos posteriores.

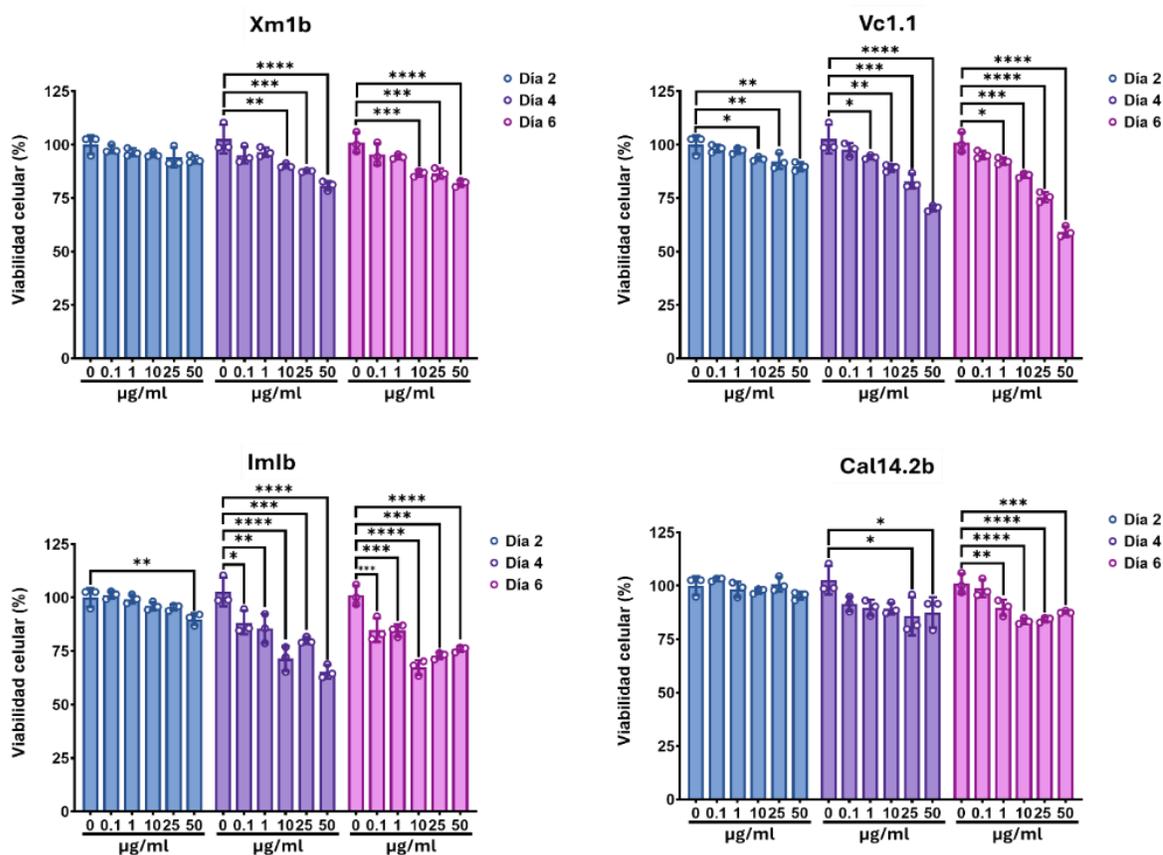


Figura 11. Evaluación de conotoxinas en la viabilidad celular de células de médula ósea de ratón mediante ensayo MTT. Las células de médula ósea fueron cultivadas en presencia de M-CSF (50ng/ml) y las concentraciones indicadas de cada conotoxina, durante 2, 4 y 6 días. La viabilidad fue determinada mediante ensayo MTT. Resultados presentados como porcentaje de viabilidad celular respecto al control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, ANOVA de 1 vía con post-test de Dunnett.

3.2.2 Evaluación de conotoxinas en la osteoclastogénesis

3.2.2.1 Evaluación de conotoxinas en la diferenciación de osteoclastos de ratón

Tras realizar los ensayos de viabilidad celular, se seleccionaron las concentraciones A y B de cada conotoxina (Tabla 5), para evaluar su efecto en osteoclastogénesis. Para ello, se indujo la diferenciación de células de médula ósea a osteoclastos empleando RANKL (25 ng/ml), M-CSF (25 ng/ml) y simultáneamente tratadas con las conotoxinas.

Después de 7 días de cultivo, los osteoclastos se fijaron, y se tiñeron con una tinción TRAP, y finalmente se cuantificó el número total de osteoclastos por pozo, identificándolos como células grandes, TRAP positivas, con tres o más núcleos. De manera general observamos que las cuatro conotoxinas a la menor concentración de evaluada promovieron la formación de osteoclastos, en comparación con el grupo control (Figura 12).

En el caso de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1, ambas incrementaron el número de osteoclastos por pozo en ambas concentraciones evaluadas respecto al grupo control, mientras que no se apreciaron diferencias significativas entre concentraciones (Figura 12). La conotoxina lmlb estimuló la osteoclastogénesis a 0.0737 μ M y 0.737 μ M, siendo esta última concentración donde se apreció un mayor efecto ($P=0.0181$). Para la conotoxina Cal14.2b, únicamente se observó un incremento significativo en la diferenciación a osteoclastos a la concentración de 0.0546 μ M ($P=0.0027$).

De manera general, observamos que las cuatro conotoxinas promueven la osteoclastogénesis, principalmente a la menor concentración evaluada. Sin embargo, también observamos un aumento progresivo en la cantidad de osteoclastos con la concentración de lmlb, mientras que para Cal14.2b a mayor concentración menor número de osteoclastos. Estos resultados sugieren que cada conotoxina evaluada tiene un efecto pro-osteoclastogénico a las concentraciones evaluadas.

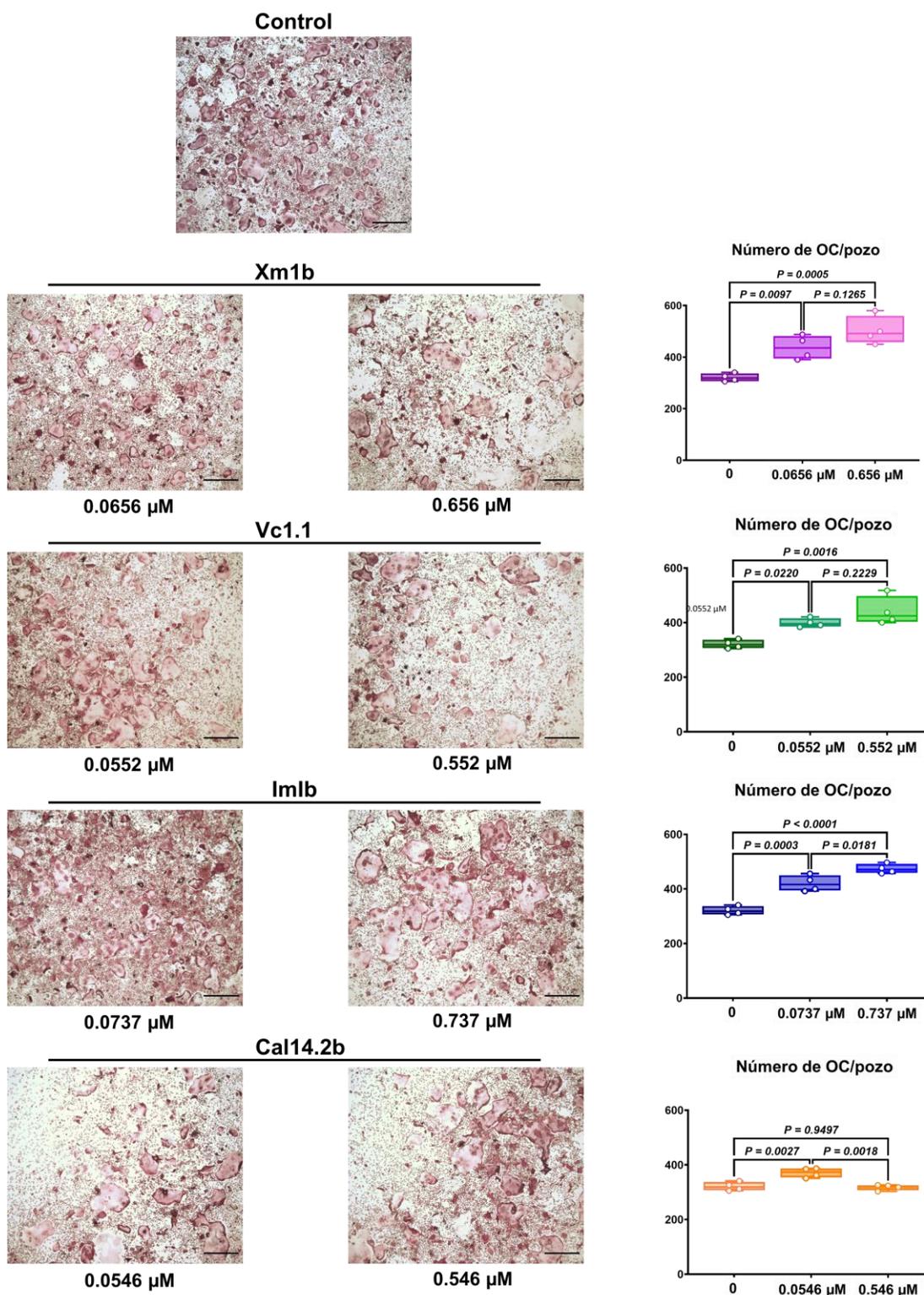


Figura 12. Efecto de conotoxinas en la diferenciación de osteoclastos de ratón. Las células de médula ósea de ratón se cultivaron en condiciones de diferenciación a osteoclastos (RANKL 25 ng/ml y M-CSF 25 ng/ml) y se trataron con las conotoxinas durante 7 días. Los osteoclastos se fijaron y se tiñeron con TRAP. Se cuantificaron células grandes multinucleadas, TRAP positivas (tres o más núcleos). ANOVA de 1 vía con post-test de Dunnett. OC: Osteoclastos. Barra de escala = 200 μ m.

3.2.2.2 Evaluación de conotoxinas en la diferenciación de osteoclastos humanos

Con el objetivo de evaluar si el efecto pro-osteoclastogénico de las conotoxinas observado en el modelo murino se mantenía o era consistente en un modelo de osteoclastos humanos, se decidió evaluar su efecto en la diferenciación de PBMC a osteoclastos.

Para la obtención de osteoclastos humanos, se aisló de sangre periférica total la porción correspondiente a las células mononucleares. Las células aisladas fueron cultivadas durante 14 días con RANKL, y M-CSF para inducir su diferenciación a osteoclastos, y tratadas a la par durante este periodo con las conotoxinas a las siguientes concentraciones: 0.0656 μM para Xm1b, Vc1.1 a 0.0552 μM , Im1b a 0.0737 μM y Cal14.2b a 0.0546 μM . Posteriormente, se llevó a cabo la tinción TRAP y la cuantificación total de osteoclastos por pozo (Figura 13). Los resultados indicaron que las cuatro conotoxinas promovieron un incremento significativo en la diferenciación hacia osteoclastos de las células mononucleares de sangre periférica bajo las condiciones evaluadas.

Los resultados observados tanto en el modelo murino de osteoclastogénesis como el modelo de osteoclastos humanos, muestran que las cuatro conotoxinas evaluadas promueven la diferenciación a osteoclastos en conjunto con la estimulación de RANKL y M-CSF. Lo que sugiere que conservan su efecto de manera independiente a las posibles diferencias que puedan existir en sus blancos moleculares entre las especies.

3.2.2.3 Evaluación del efecto de conotoxinas en osteoclastogénesis ¿dependiente o independiente de RANKL?

Una vez determinado que las conotoxinas promueven la osteoclastogénesis, se decidió evaluar si el efecto observado era dependiente de RANKL. Para ello las células de médula ósea se cultivaron en presencia de M-CSF, y en presencia o ausencias de RANKL y las conotoxinas sintéticas. Al término del período de diferenciación se realizó tinción TRAP para poder visualizar la presencia o ausencia de osteoclastos (Figura 14).

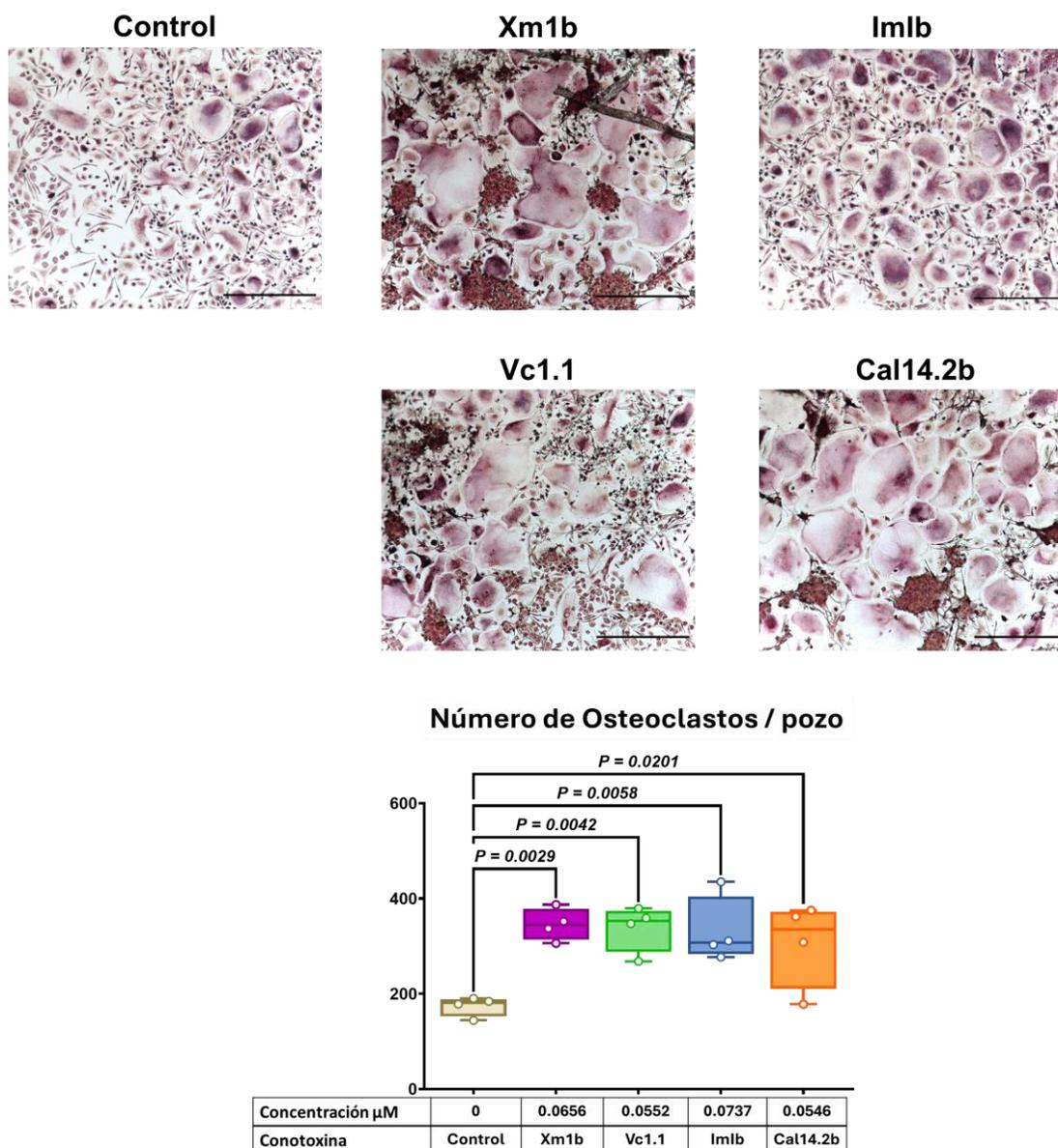


Figura 13. Efectos de las conotoxinas en la diferenciación de PBMC humanas en osteoclastos. Se aislaron PBMC humanas de muestras de sangre total y se cultivaron en condiciones de diferenciación a osteoclastos (RANKL 25 ng/ml y M-CSF 25 ng/ml) y las conotoxinas. Después de 14 días de cultivo, los osteoclastos se fijaron y tiñeron para TRAP. Se cuantificaron las células multinucleadas grandes (tres o más núcleos) positivas para TRAP. ANOVA de 1 vía con post-test de Dunnett. Barra de escala = 500 μm .

Los resultados muestran que, en ausencia de RANKL, las conotoxinas no son capaces de promover osteoclastogénesis. Únicamente en las condiciones en que RANKL se encontraba en el medio de cultivo se observaron osteoclastos, lo que indica que el efecto modulador de la osteoclastogénesis por parte de las conotoxinas requiere de esta señalización y no ocurre de manera independiente.

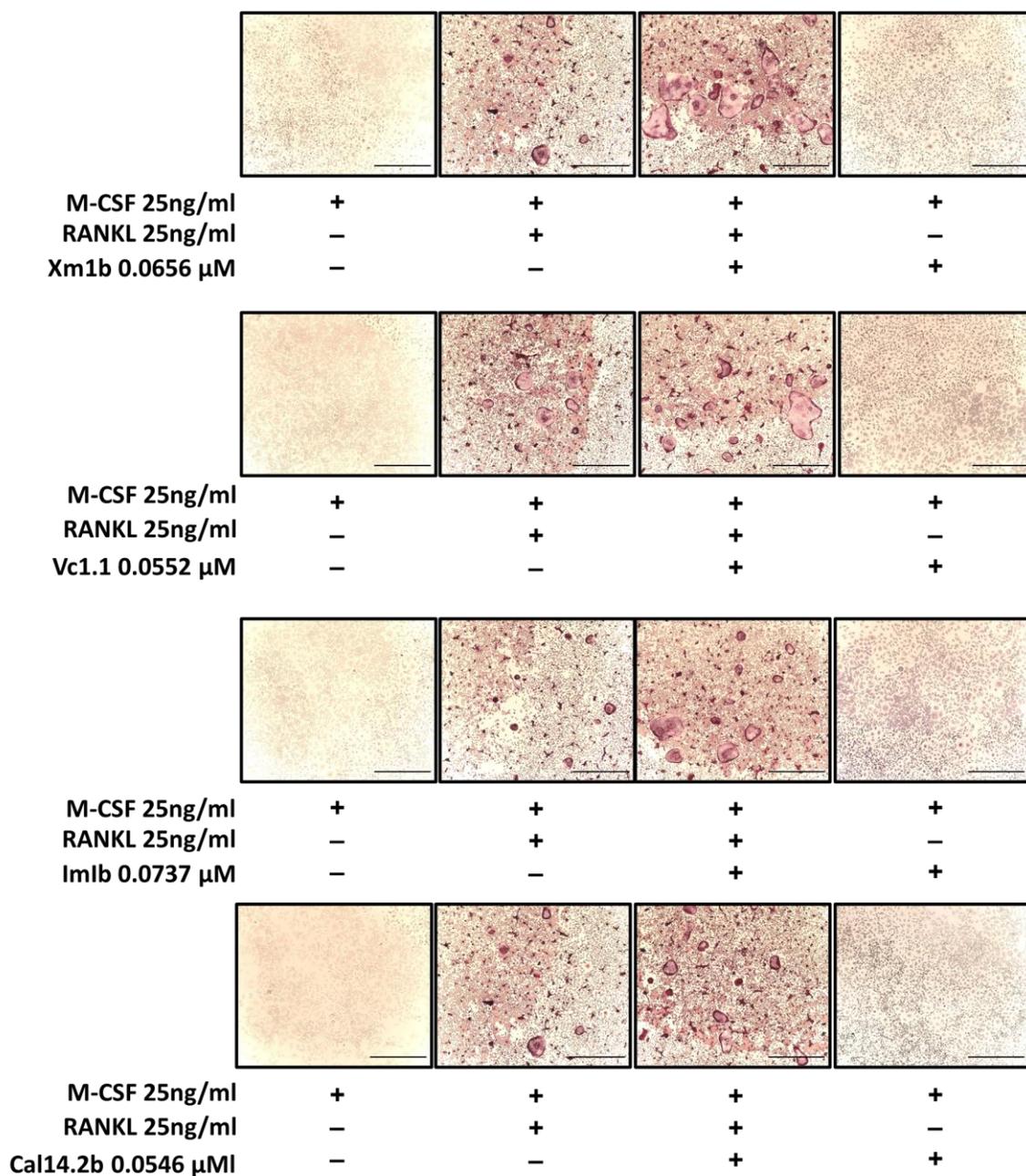


Figura 14. La diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclastos inducida por conotoxinas depende de RANKL. Las células de médula ósea se cultivaron con M-CSF (25 ng/ml) y presencia o ausencia de RANKL (25 ng/ml), así como presencia o ausencia de cada conotoxina. Después de 7 días de cultivo, los osteoclastos se fijaron y se tiñeron para TRAP. Barra = 500 μ m

3.2.2.4 Efecto de conotoxinas en la resorción por osteoclastos

A partir de las evaluaciones previas, identificamos que las conotoxinas estimulan la osteoclastogénesis, así que, se decidió evaluar si también tienen el potencial de modular la actividad de resorción de los osteoclastos. Para ello se indujo la diferenciación de células de la médula ósea de ratón en osteoclastos durante 4 días con RANKL y M-CSF, posteriormente, las conotoxinas se adicionaron al medio de cultivo durante dos días. Estos ajustes en el ensayo de osteoclastogénesis se realizaron con el fin de descartar que los cambios en la actividad de resorción fueran únicamente atribuibles a la cantidad de osteoclastos formados. Al realizar la tinción TRAP tanto en grupos tratados con toxinas como el grupo control, confirmamos que no había cambios significativos en la cantidad de osteoclastos formados respecto al grupo control (Figura 15).

Posteriormente, los osteoclastos diferenciados fueron eliminados de la superficie de las placas con una solución de hipoclorito, para poder cuantificar las áreas de resorción (Figura 15). Nuestros resultados indicaron que el área resorbida en los grupos tratados con conotoxinas fue mayor en comparación con el grupo control.

Las conotoxinas Xm1b, Vc1.1, Im1b y Cal14.2b, además de promover la osteoclastogénesis, aumentaron la actividad de resorción de los osteoclastos, en cultivos diferenciados a partir de médula ósea de ratón. Lo que muestra su capacidad de promover la actividad resorptiva de los osteoclastos ya diferenciados.

3.2.2.5 Efecto de las conotoxinas en la expresión de genes de osteoclastos

Con el fin de identificar posibles vías involucradas en la modulación de la diferenciación y actividad de osteoclastos, se evaluó el efecto de las conotoxinas en la expresión de genes marcadores de diferenciación y actividad de osteoclastos. Por tanto, se evaluó la expresión de los genes *Trap*, *Nfatc1*, *Rank*, *Ctsk* y los receptores nicotínicos $\alpha 7$ (*Chrna7*) y $\alpha 9$ (*Chrna9*) mediante RT-qPCR. La extracción de RNA total se realizó a los 7 días de diferenciación y la expresión génica fue normalizada con *Rpl32*.

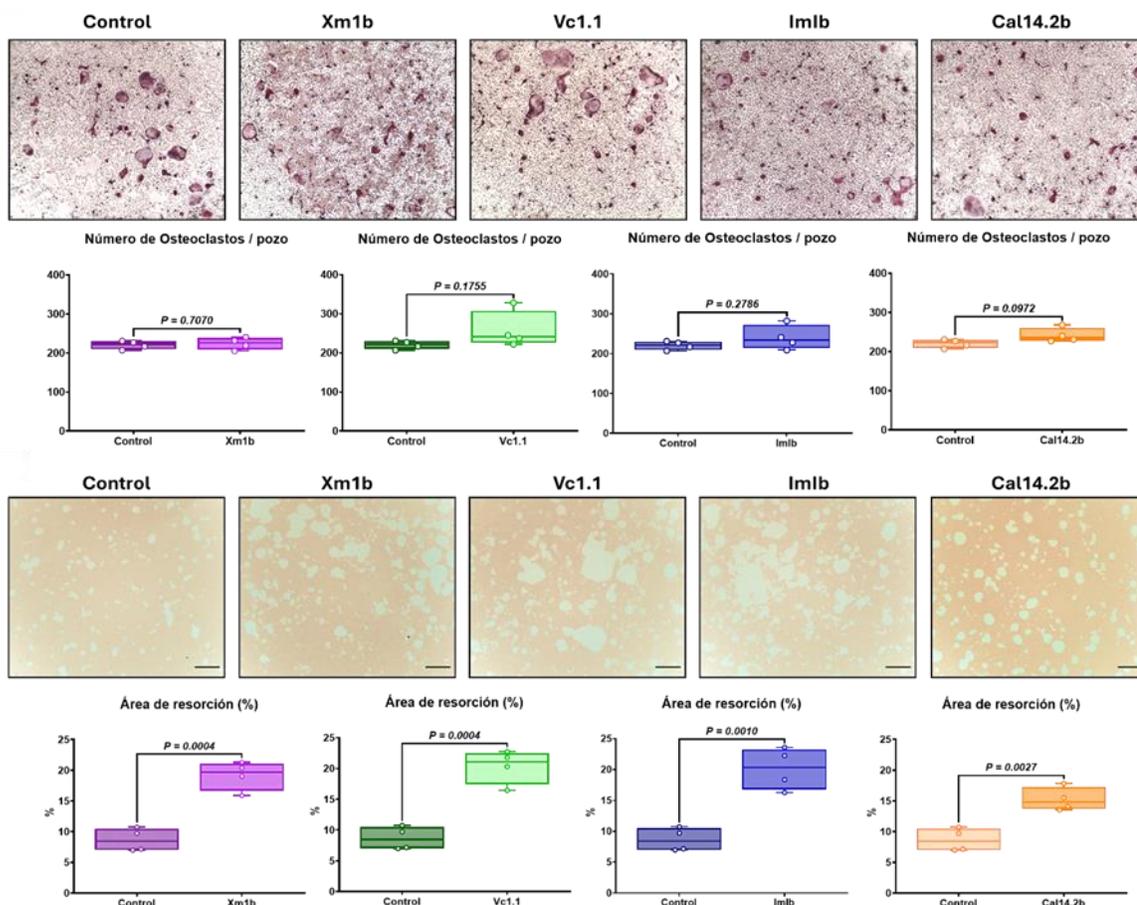


Figura 15. Las conotoxinas modulan la actividad de resorción de osteoclastos. Se indujo la diferenciación de células de la médula ósea de ratón en osteoclastos durante 4 días. Posteriormente, los osteoclastos se expusieron a las conotoxinas durante 2 días. Panel superior: Cuantificación de osteoclastos. Panel inferior: Imágenes de las áreas resorbidas por osteoclastos. Las áreas se midieron con el software ImageJ (NIH), y los resultados fueron expresados como porcentaje del área total del pozo. Prueba U de Mann-Whitney. Barra = 200 μ m

Los osteoclastos diferenciados bajo tratamiento con las conotoxinas Xm1b (Figura 16) e lmlb (Figura 17), toxinas que se unen principalmente a los nAChR $\alpha 7$, no se observaron cambios significativos en la expresión génica de *Trap*, *Rank* y *Ctsk*. Únicamente la conotoxina Xm1b estimuló la expresión de *Nfatc1* ($P=0.0149$) y *Chrna7* ($P=0.0230$), mientras que para lmlb no se apreciaron cambios significativos en los genes evaluados. Para la conotoxina Cal14.2b (Figura 17) se observó modulación positiva de *Nfatc1* ($P=0.0349$) y *Rank* ($P=0.0147$). Finalmente, la conotoxina Vc1.1 (Figura 16) incremento la expresión de *Chrna9* ($P=0.0093$) y *Rank* ($P=0.0476$), para esta toxina no se evaluó la expresión de la subunidad $\alpha 10$.

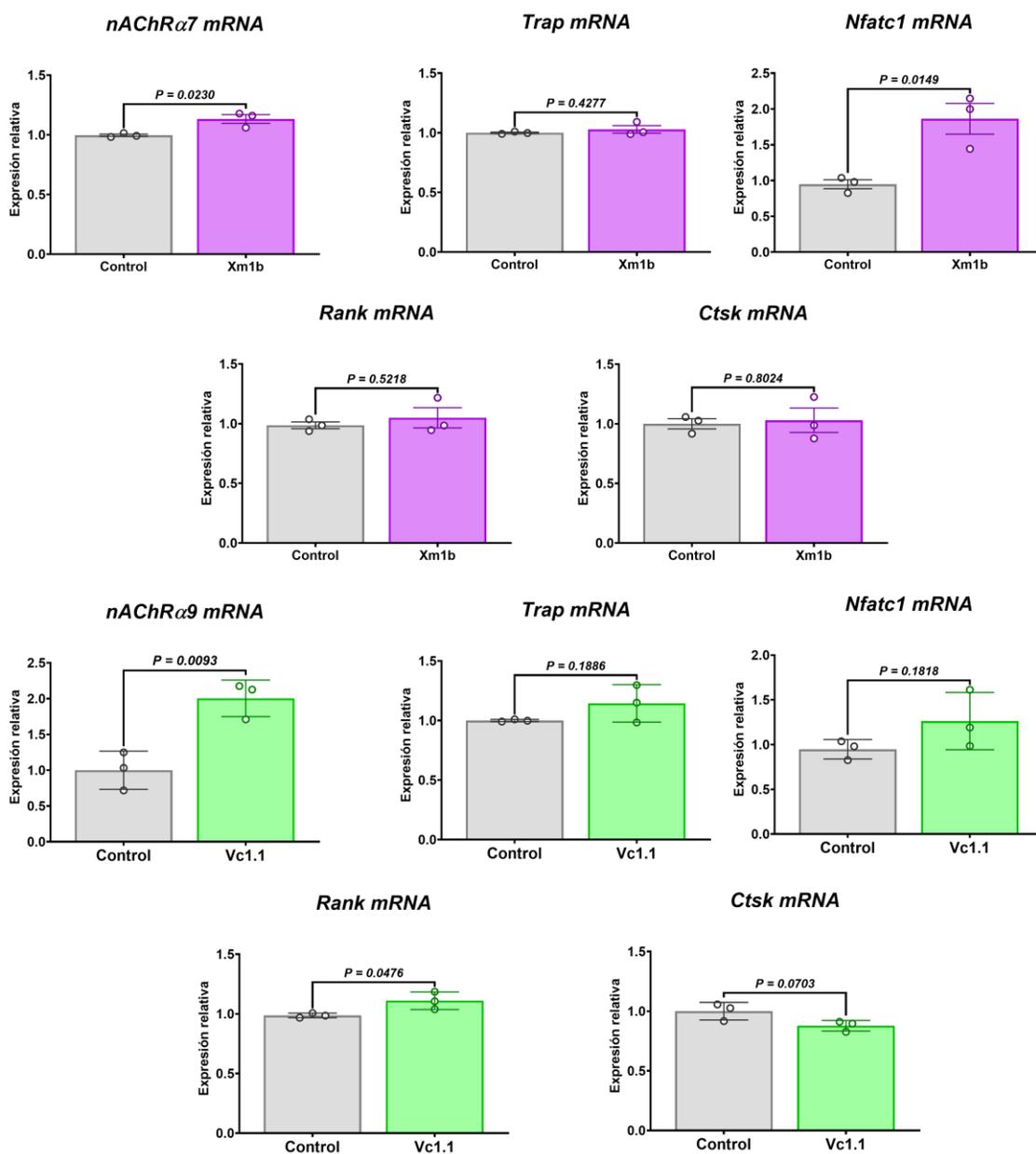


Figura 16. Efectos de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 en la expresión de genes osteoclastos. La expresión de genes asociados a diferenciación y actividad de osteoclastos fue modulada bajo el tratamiento de las células óseas con conotoxinas Xm1b (0.0656 μ M) y Vc1.1 (0.0552 μ M). Analizado con la Prueba U de Mann-Whitney, la gráfica representa media \pm desviación estándar.

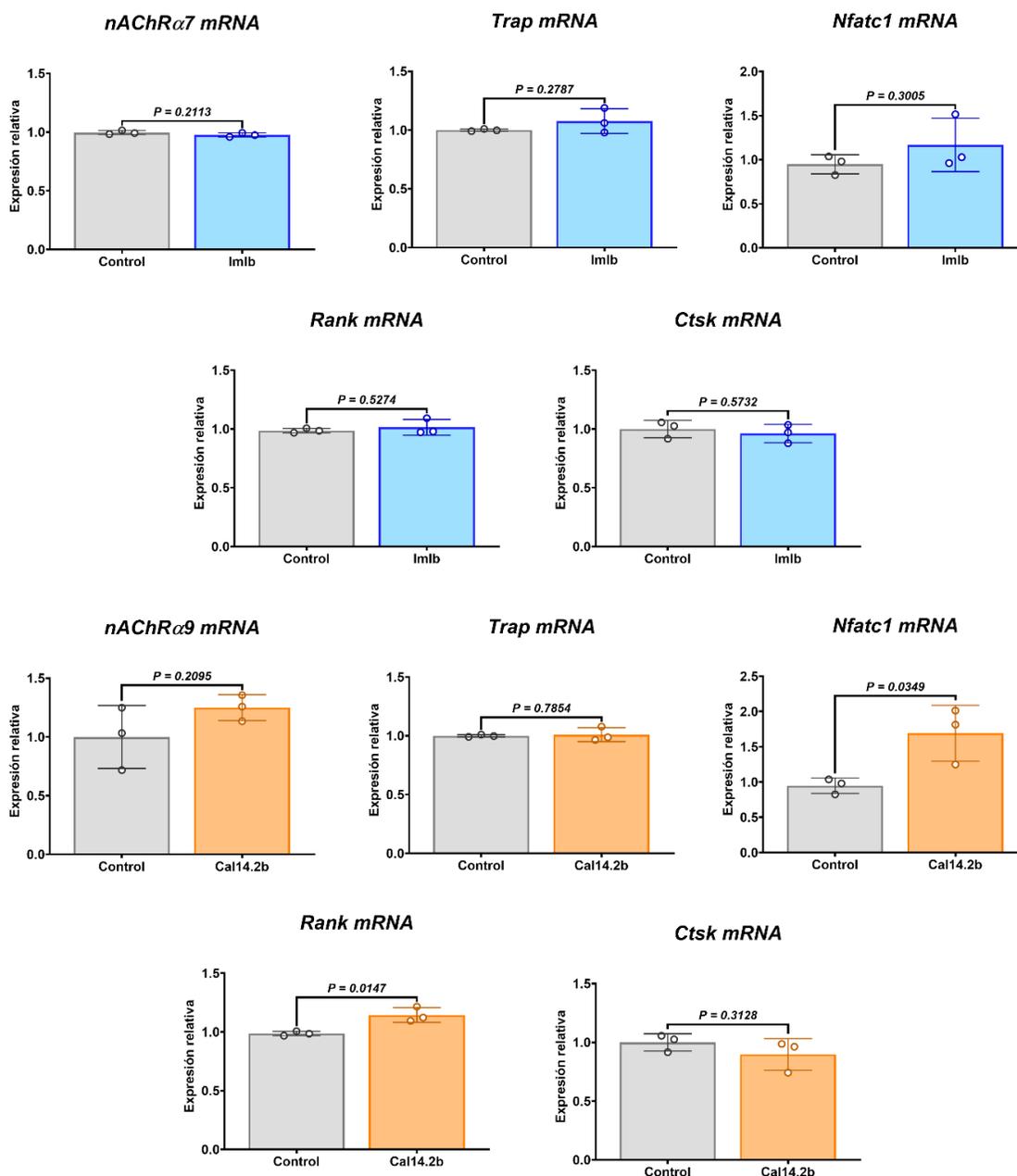


Figura 17. Efectos de las conotoxinas Imlb y Cal14.2b en la expresión de genes osteoclastos. La expresión de genes asociados a diferenciación y actividad de osteoclastos fue modulada bajo el tratamiento de las células óseas con conotoxinas Imlb (0.0737 μ M) y Cal14.2b (0.0546 μ M). Analizado con la Prueba U de Mann-Whitney, la gráfica representa media \pm desviación estándar.

En conjunto, el análisis de la expresión génica de osteoclastos diferenciados bajo tratamiento con conotoxinas mostró que tienen efectos distintos sobre la regulación transcripcional de los genes evaluados. Por un lado, no se observaron cambios en la expresión de *Trap* y *Ctsk*, mientras que la modulación de la expresión de *Rank* por Vc1.1 y Cal14.2b, y de *Nfatc1* por Xm1b y Cal14.2b, puede

asociarse con una señalización de activación de genes necesarios para etapas tempranas de diferenciación, y demuestra el potencial de las conotoxinas para modular la osteoclastogénesis.

3.2.2.6 Efecto de las conotoxinas en la diferenciación de osteoblastos

Tras evaluar el efecto de las conotoxinas en modelos de osteoclastogénesis, a continuación, se exploró su potencial de modulación de la osteoblastogénesis. Se estimuló la diferenciación de cultivos derivados de médula ósea de ratón, mediante ácido ascórbico y β -glicerofosfato, durante 21 días de cultivo, dentro de los cuales se evaluaron distintas concentraciones (Tabla 5) de las conotoxinas Xm1b, Vc1.1, lmlb, y Cal14.2b.

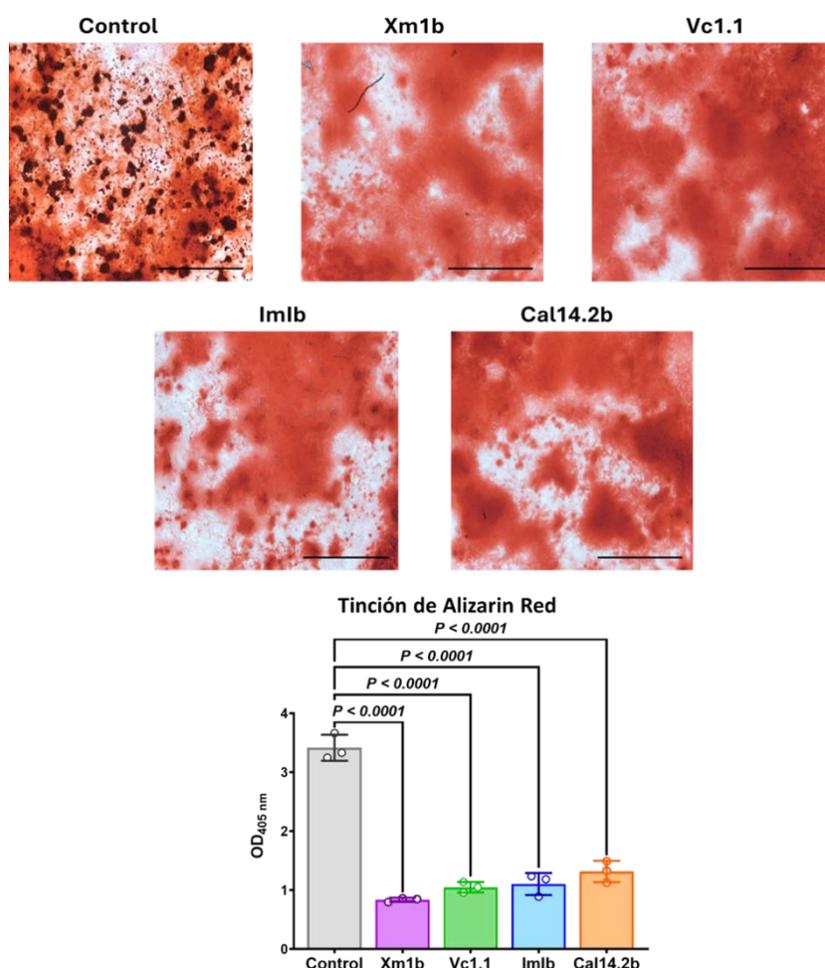


Figura 18. Efectos de las conotoxinas en la mineralización de osteoblastos. Las células de médula ósea fueron cultivadas con ácido ascórbico (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), β -glicerofosfato (5 mM) y cada conotoxina la concentración: 0.0656 μM para Xm1b, 0.0552 μM para Vc1.1, 0.0737 μM para lmlb y para Cal14.2b de 0.0546 μM . Después de 21 días de cultivo, los osteoblastos se fijaron y se tiñeron con Alizarin Red S. Imágenes representativas. ANOVA de 1 vía con post-test de Dunnett. Escala de barra = 200 μm

Concluido el periodo de diferenciación se realizó una tinción con Alizarin Red para identificar las áreas de matriz mineralizada por los osteoblastos, posteriormente la tinción fue extraída y cuantificada. Visualmente, los grupos tratados presentaron una mineralización más tenue, sin la formación de nódulos densos como en el grupo control (Figura 18). La cuantificación de la mineralización fue consistente con la observación visual, encontrando que todas las concentraciones evaluadas disminuyeron la deposición de componente mineral sobre la matriz producida por los osteoblastos ($P < 0.0001$).

A diferencia de lo observado en los modelos de osteoclastos, donde encontramos un efecto pro-osteoclastogénico y una mayor actividad, las conotoxinas disminuyeron la mineralización de los osteoblastos, sugiriendo un efecto inhibitorio sobre la actividad de los osteoblastos.

3.2.2.7 Efecto de las conotoxinas en la expresión de genes de osteoblastos

Considerando que las conotoxinas disminuyeron la mineralización de los osteoblastos, se decidió analizar su efecto en la regulación de la expresión de genes asociados a la diferenciación y actividad de los osteoblastos, como primer paso, para explorar los posibles mecanismos moleculares afectados tras el estímulo con las conotoxinas. Para el ensayo de diferenciación las células fueron tratadas con 0.0656 μM para Xm1b, 0.0552 μM para Vc1.1, 0.0737 μM para lmlb y para Cal14.2b de 0.0546 μM .

Tras 21 días de diferenciación se evaluó la expresión de *Runx2*, *Alpl*, *Col1a1*, *Bglap*, *Rankl*, *Opg*, así como los genes que codifican para las subunidades $\alpha 7$ (*Chrna7*) y $\alpha 9$ (*Chrna9*). Las conotoxinas Xm1b (Figura 19) e lmlb (Figura 20) promovieron un aumento en la expresión del nAChR $\alpha 7$, mientras que disminuyeron significativamente la expresión de *Runx2*, *Alpl*, *Col1a1* y *Bglap*, sin que se observaran cambios en la proporción de la expresión *Rankl/Opg*.

En el caso de la conotoxina Vc1.1 (Figura 19) que principalmente se une a los nAChR $\alpha 9\alpha 10$, se detectó un aumento en la expresión de *Chrna9* ($P=0.0040$), se encontró una regulación negativa en la expresión de los genes *Alpl*, *Col1a1* y *Bglap*, sin observarse cambios en la expresión de *Runx2* y en la tasa *Rankl/Opg*. Finalmente, Cal14.2b (Figura 20) con afinidad por nAChR $\alpha 9$, también indujo la expresión de *Chrna9*, *Runx2* mostró una tendencia a la baja ($P=0.0596$), sin cambios en *Rankl/Opg*. En contraste se apreció una disminución en la expresión de *Alpl*, *Col1a1* y *Bglap* ($P<0.0001$).

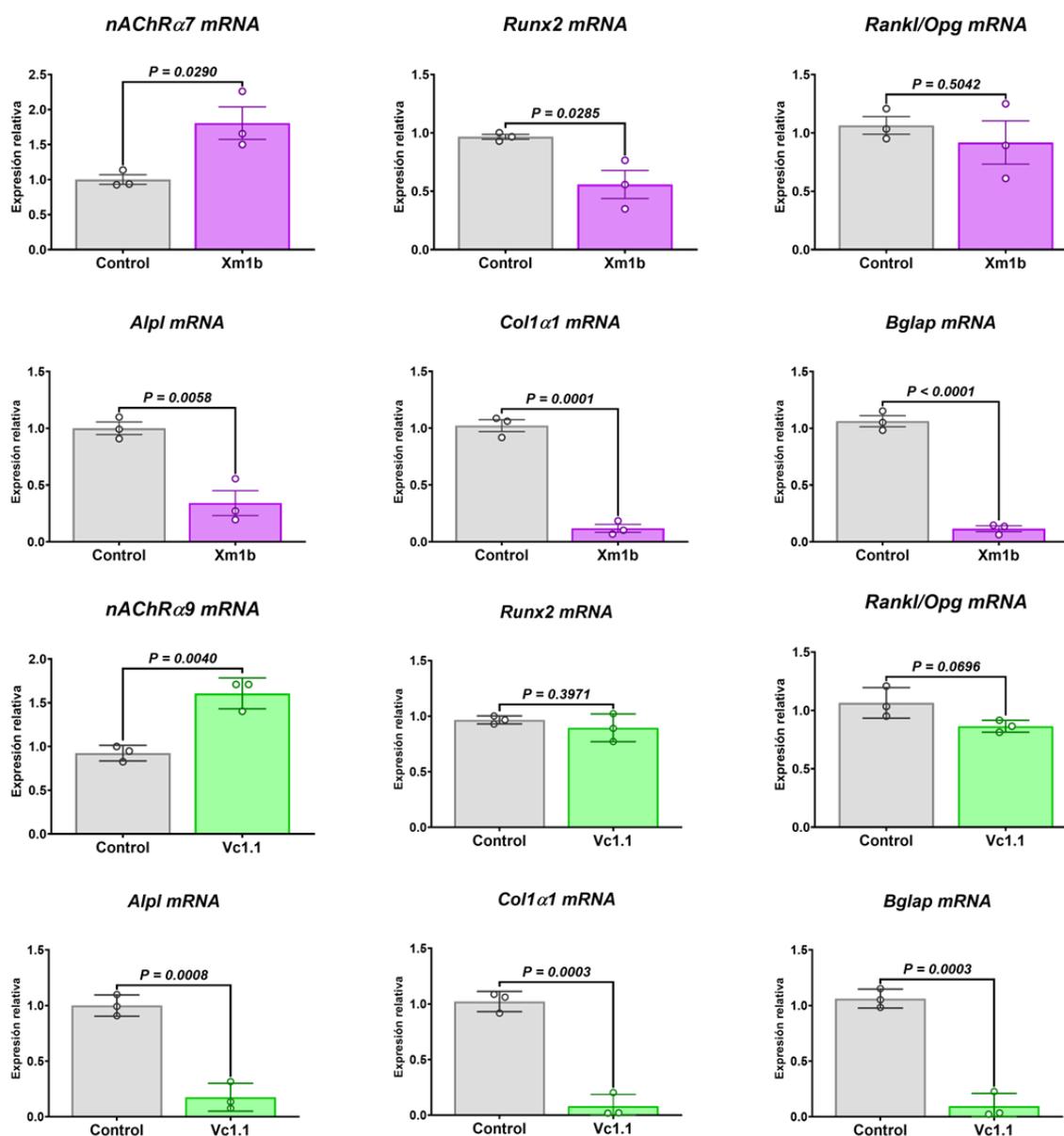


Figura 19. Efectos de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 en la expresión de genes osteoblastos. La expresión de genes asociados a diferenciación y actividad de osteoblastos fue modulada bajo el tratamiento de las células óseas con conotoxinas Xm1b (0.0656 μ M) y Vc1.1 (0.0552 μ M). Analizado con la prueba U de Mann-Whitney, la gráfica representa media \pm desviación estándar.

Consistente con lo que observamos en los ensayos de mineralización, las conotoxinas regularon negativamente la expresión de genes marcadores de diferenciación (*Runx2*) y actividad osteoblástica (*Alpl*, *Col1a1* y *Bglap*). La disminución en la expresión de *Alpl*, *Col1a1* y *Bglap*, podría indicar un efecto sobre la maduración de los osteoblastos, interfiriendo con la mineralización de la matriz ósea. Al disminuir la expresión de *Runx2*, un regulador maestro de la diferenciación de los osteoblastos sugiere un efecto desde el proceso de diferenciación y no solo en la actividad, para los casos como Im1b y Xm1b, donde hubo una

modulación de *Runx2* en conjunto con *Alpl*, *Col1 α 1* y *Bglap*. La ausencia en la modulación de *Rankl/Opg*, podría sugerir que las conotoxinas no afectan el potencial de los osteoblastos para regular la diferenciación de osteoclastos a través de estas vías.

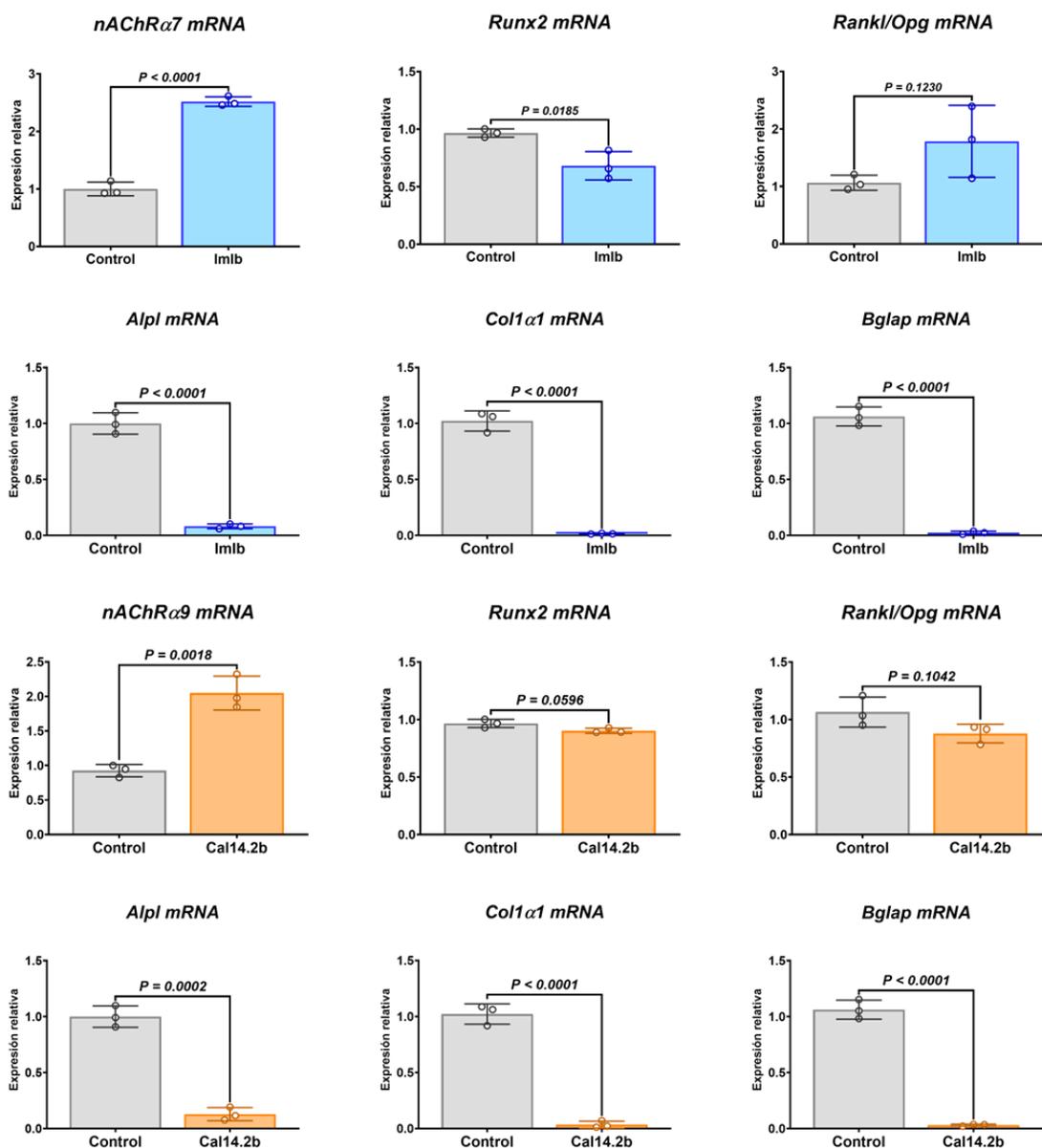


Figura 20. Efectos de las conotoxinas Imlb y Cal14.2b en la expresión de genes osteoblastos. La expresión de genes asociados a diferenciación y actividad de osteoblastos fue modulada bajo el tratamiento de las células óseas con conotoxinas Imlb (0.0737 μ M) y Cal14.2b (0.0546 μ M). Analizado con la prueba U de Mann-Whitney, la gráfica representa media \pm desviación estándar.

3.2.2.8 Evaluación de conotoxinas en tejido enriquecido en osteocitos

Cuando los osteoblastos producen y mineralizan la nueva matriz ósea, estos pueden quedar embebidos en ella y diferenciarse terminalmente a osteocitos. Los osteocitos son las células más abundantes del tejido óseo, y cumplen funciones claves en la regulación de la remodelación ósea. Dada la importancia de los osteocitos en el mantenimiento del tejido óseo y los efectos que observamos en osteoclastos y osteoblastos, decidimos evaluar el efecto de las conotoxinas en osteocitos.

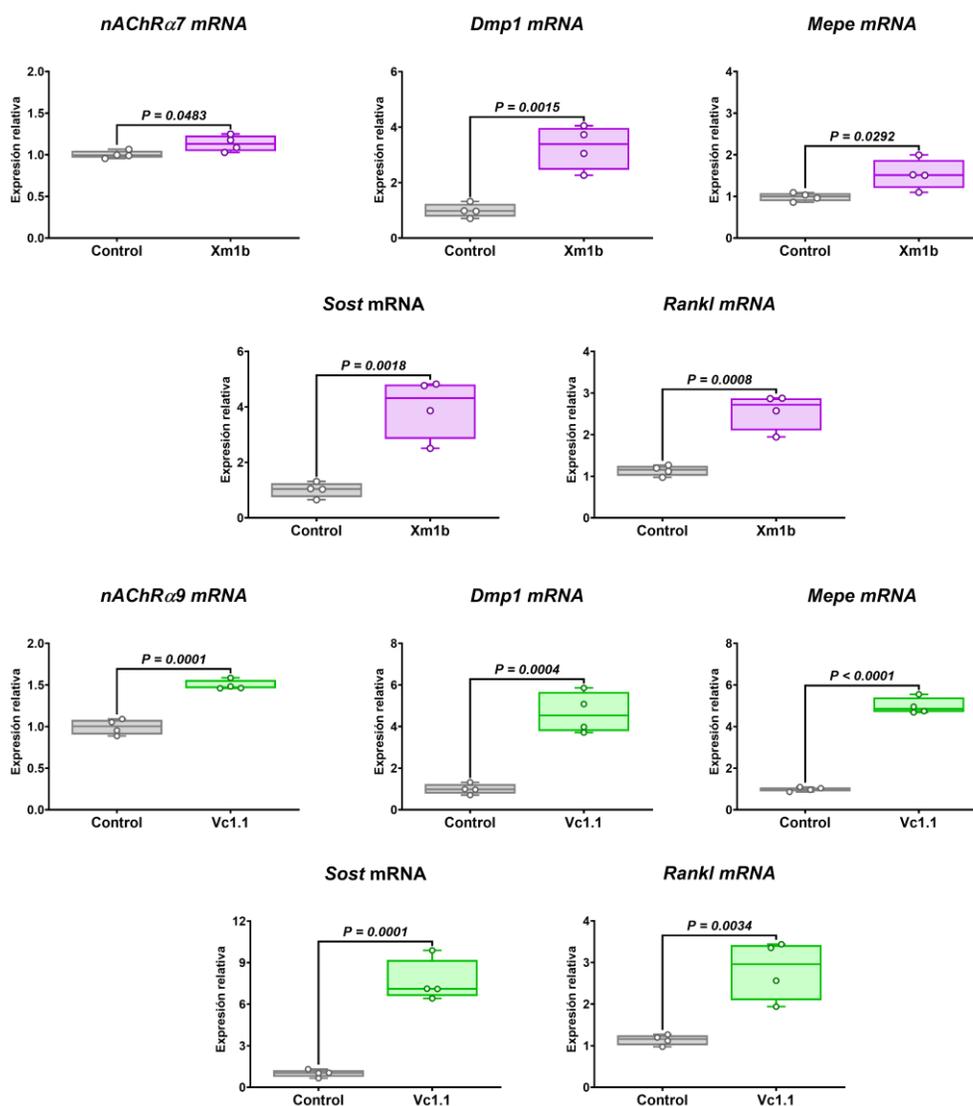


Figura 21. Efecto de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 sobre la expresión génica de osteocitos. Los huesos enriquecidos con osteocitos se cultivaron *ex vivo* y tratados con la conotoxina Xm1b y Vc1.1. Después de 72 horas de cultivo, se extrajo el RNA total y se midió la expresión de *Dmp1*, *Mepe*, *Rankl*, *Sost*, *nAChR α 7* y *nAChR α 9* mediante RT-qPCR. Analizado la prueba con U de Mann-Whitney

Para ello, se empleó un modelo de cultivo *ex vivo* de tejido óseo enriquecido en osteocitos, los tejidos fueron cultivados durante 72 horas y tratados con Xm1b (0.0656 μ M), Vc1.1 (0.0552 μ M) (Figura 21), Im1b (0.0737 μ M), y Cal14.2b (0.0546 μ M) (Figura 22). Tras el tratamiento se realizó la extracción de RNA total y medimos la expresión de genes marcadores funcionales de osteocitos *Dmp1*, *Mepe*, *Sost* y *Rankl*, además de los receptores nicotínicos *Chrna7* y *Chrna9* mediante RT-qPCR.

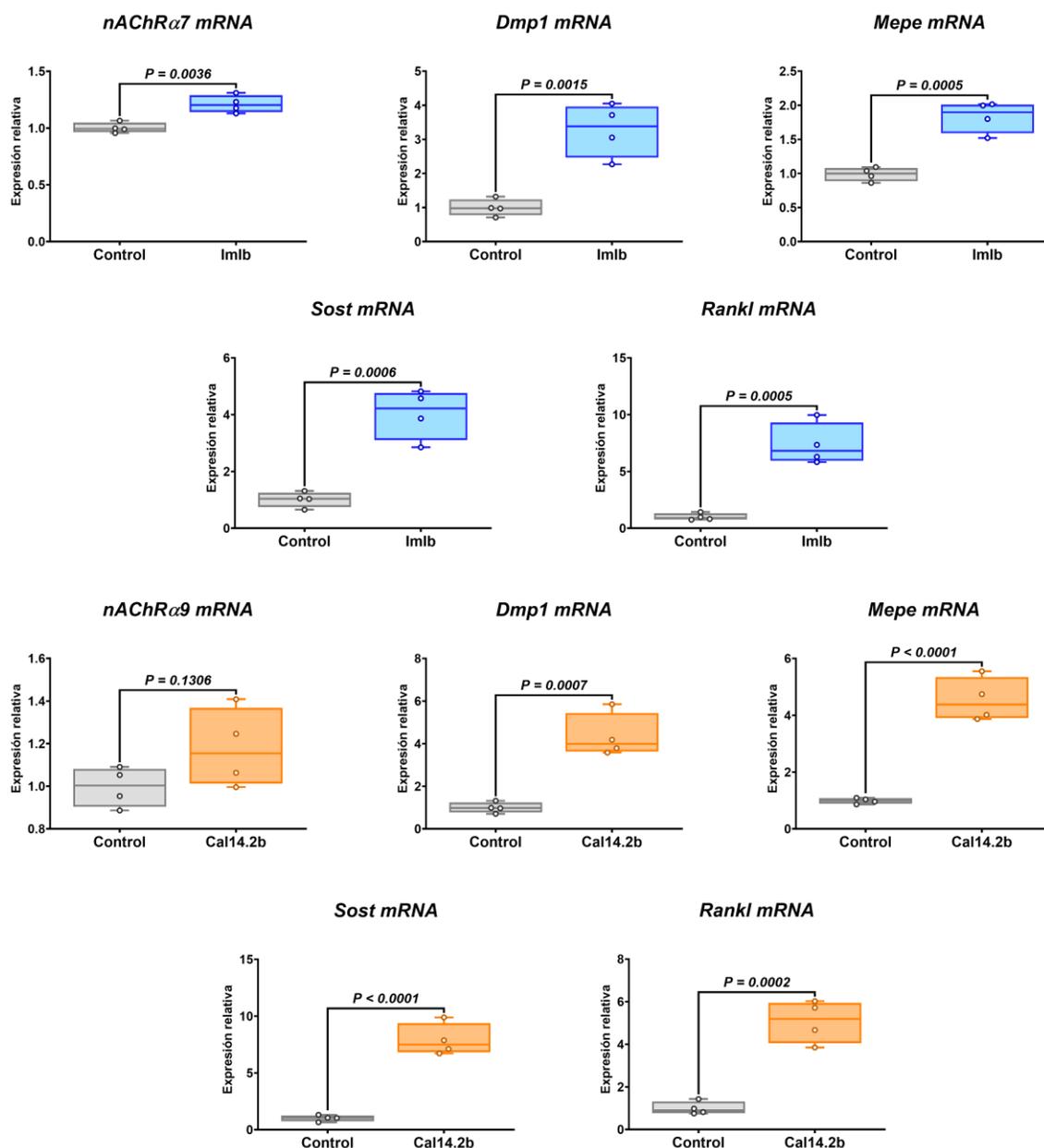


Figura 22. Efecto de las conotoxinas Im1b y Cal14.2b en la expresión génica de osteocitos. Los huesos enriquecidos con osteocitos fueron cultivados *ex vivo* y tratados con la conotoxina Im1b y Cal14.2b. Después de 72 horas de cultivo, se extrajo el RNA total y se midió la expresión de *Dmp1*, *Mepe*, *Rankl*, *Sost*, *nAChRα7* y *nAChRα9* mediante RT-qPCR. Analizado la prueba con U de Mann-Whitney

En los tejidos tratados con las conotoxinas que se unen a nAChR $\alpha 7$, Xm1b e Imlb, se observó un aumento significativo de la expresión de los genes evaluados *Dmp1*, *Mepe*, *Rankl*, *Sost*, y *Chrna7*. De manera similar, las conotoxinas Vc1.1 y Cal14.2b incrementaron la expresión de *Dmp1*, *Mepe*, *Rankl*, *Sost*, en los huesos tratados. La conotoxina Vc1.1 indujo una regulación positiva del gen *Chrna9* ($P=0.0001$), mientras que Cal14.2b no promovió una variación significativa en la expresión ($P=0.1306$). El tratamiento con las conotoxinas promovió en todos los casos una regulación positiva en la expresión de genes asociados con maduración y actividad de los osteocitos, lo que sugiere una modulación por parte de las conotoxinas en la actividad de los osteocitos.

3.2.2.9 Análisis transcriptómico de osteoclastos bajo tratamiento con conotoxinas

Con la finalidad de comprender los mecanismos moleculares modulados en la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos por las conotoxinas, seleccionamos dos conotoxinas para realizar análisis transcriptómico, la Conotoxina Xm1b que principalmente se une a los nAChR $\alpha 7$ y la conotoxina Vc1.1 que se une a los receptores nAChR $\alpha 9\alpha 10$.

Se colectaron muestras de RNA el día 7 de los osteoclastos diferenciados a partir de células de médula ósea de ratón mediante inducción con RANKL y M-CSF y tratados con las conotoxinas. El ensayo de diferenciación se realizó por triplicado, obteniendo 3 bibliotecas de cada condición, todas las réplicas pasaron las medidas de control de calidad fueron incluidas en los análisis posteriores.

En el análisis transcriptómico de osteoclastos (Figura 23, panel izquierdo), en el grupo tratado con la conotoxina Xm1b identificamos la expresión diferencial de 19 genes (7 regulados negativamente y 12 regulados positivamente). Mediante el análisis de enriquecimiento funcional, técnica que permite agrupar los genes diferencialmente expresados en procesos biológicos, empleando categorías definidas por el Gen Ontology (GO), no fue posible asociar los genes modulados por Xm1b a un proceso.

Mientras que para las células tratadas con conotoxina Vc1.1, observamos una expresión diferencial significativa en 443 genes (185 regulados negativamente y 258 regulados positivamente) (Figura 23, panel derecho). En los gráficos de puntos que muestran los términos GO enriquecidos, podemos observar en la parte inferior el *fold enrichment*, que indica cuantas veces un término está más o menos representado en el conjunto de genes modulados. Cada punto en el gráfico corresponde a un proceso enriquecido, mientras que el tamaño indica el número de genes involucrados, el color denota la significancia estadística.

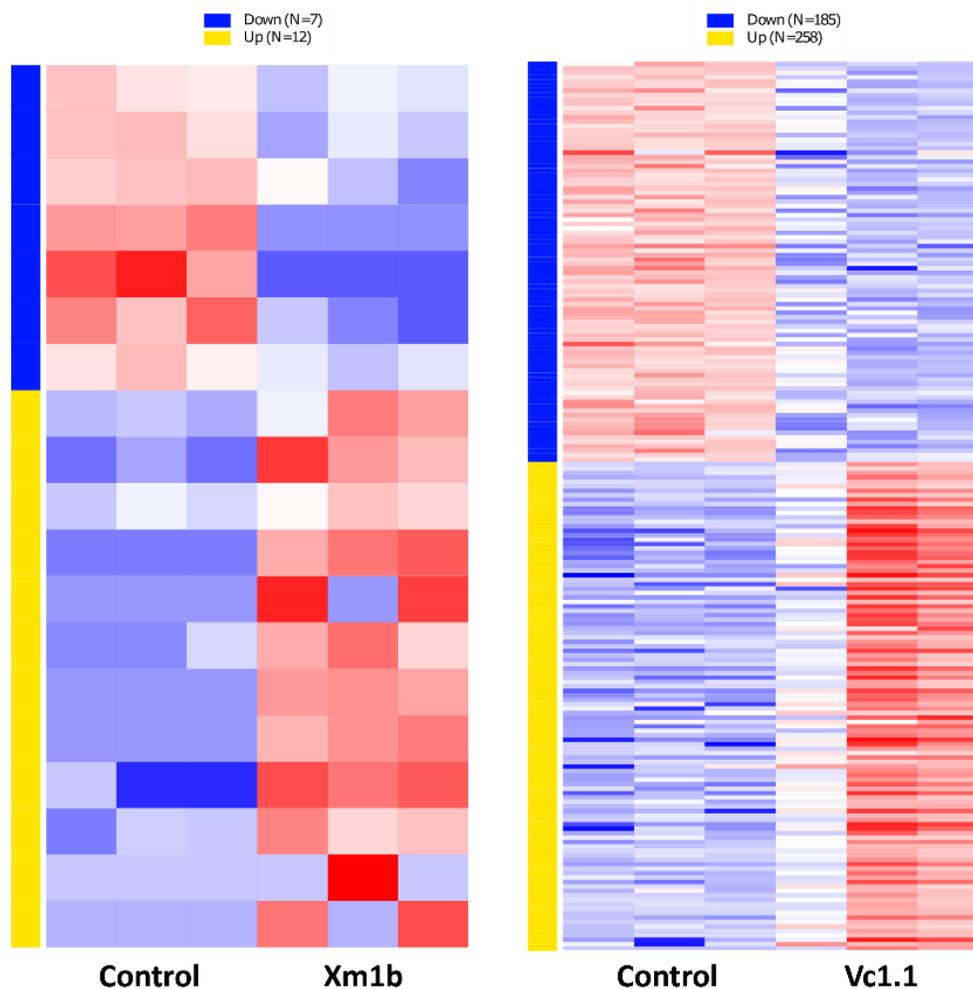


Figura 23. Efecto de las conotoxinas sobre la expresión génica de osteoclastos. El análisis de RNAseq se realizó en osteoclastos (7 días) tratados con conotoxina Xm1b (derecha) y Vc1.1 (izquierda), se empleó para generar mapas de calor que muestran los genes expresados diferencialmente. El mapa de calor ilustra la expresión ($\text{Log}_2\text{FC} > 2$) de genes relacionados con osteoclastos. La escala de color indica el nivel relativo de expresión, donde rojo indica genes significativamente aumentados, mientras que azul corresponde a los genes regulados a la baja. Las barras laterales indican el tipo de regulación, azul representa el grupo de genes cuya expresión fue disminuida, en amarillo se agrupan los genes regulados al alza. Utilizando DEseq2, se consideraron genes que cumplieran con $\text{FDR} < 0,1$ y $\text{Log}_2\text{FC} > 2$, y todos los demás análisis utilizaron parámetros predeterminados en iDEP.92.

En los osteoclastos tratados con Vc1.1 observamos que los genes expresados diferencialmente (Figura 24, panel superior) se asociaron con procesos del "ciclo celular" ($n = 127$ genes), "división celular" ($n = 74$ genes) y "regulación del ciclo celular" ($n = 69$ genes). Por el contrario, los genes regulados negativamente se relacionaron principalmente con la "respuesta celular al estímulo químico" ($n = 74$ genes), el "desarrollo del sistema circulatorio" ($n = 51$ genes), el "desarrollo de la vasculatura" ($n = 46$ genes) y el "desarrollo de los vasos sanguíneos" ($n = 45$ genes) (Figura 24, panel inferior). Estos resultados sugieren que Vc1.1

además de inducir la osteoclastogénesis, induce la activación transcripcional relacionada a procesos de proliferación y ciclo celular, además de favorecer un fenotipo resortivo.

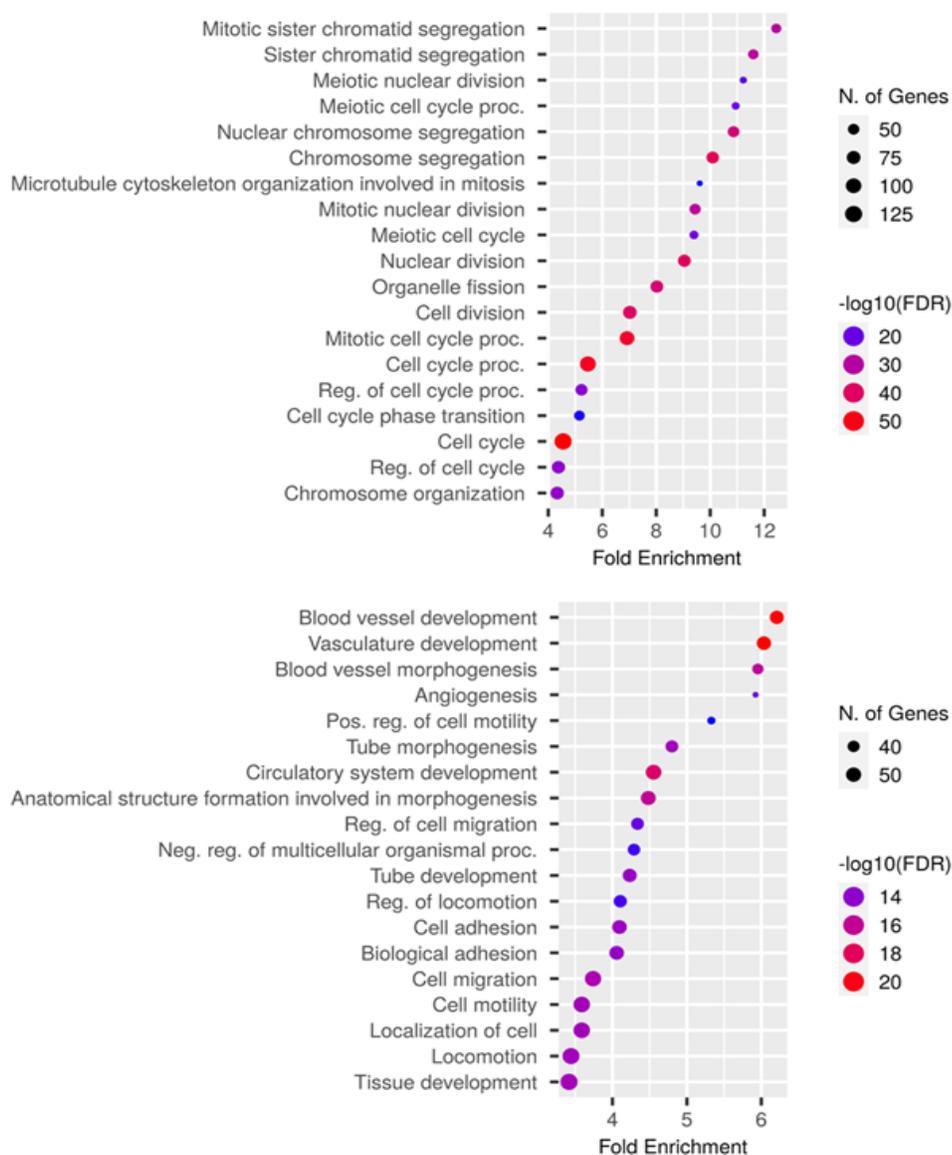


Figura 24. Términos GO asociados a la modulación transcripcional en osteoclastos por Vc1.1. Visualización de diagramas de puntos de términos GO regulados hacia arriba (gráfica superior) y hacia abajo (gráfica inferior) de procesos biológicos para osteoclastos tratados con Vc1.1. El tamaño del punto representa el recuento de genes enriquecidos en cada proceso biológico, y el color del punto indica la tasa de descubrimiento falso ($FDR < 0,1$).

3.2.2.10 Análisis transcripcional de osteoblastos bajo tratamiento con conotoxinas

En el análisis del transcriptoma de osteoblastos, observamos que el tratamiento con la conotoxina Xm1b moduló la expresión diferencial de 501 genes (301 regulados negativamente y 200 regulados

positivamente) (Figura 25, panel izquierdo). El análisis de ontología de genes mostró que los genes sobreexpresados en los osteoblastos tratados con Xm1b se asociaron principalmente con procesos de "ciclo celular" (n = 58 genes), el "proceso del ciclo celular" (n = 49) y la "respuesta celular al estrés" (n = 42) (Figura 26, panel superior). Por el contrario, los procesos regulados a la baja se asociaron con el "desarrollo de vasos sanguíneos" (n = 32), "desarrollo de la vasculatura" (n = 32), "desarrollo del cartílago" (n = 12) y la "diferenciación de condrocitos" (n = 10) (Figura 26, panel inferior).

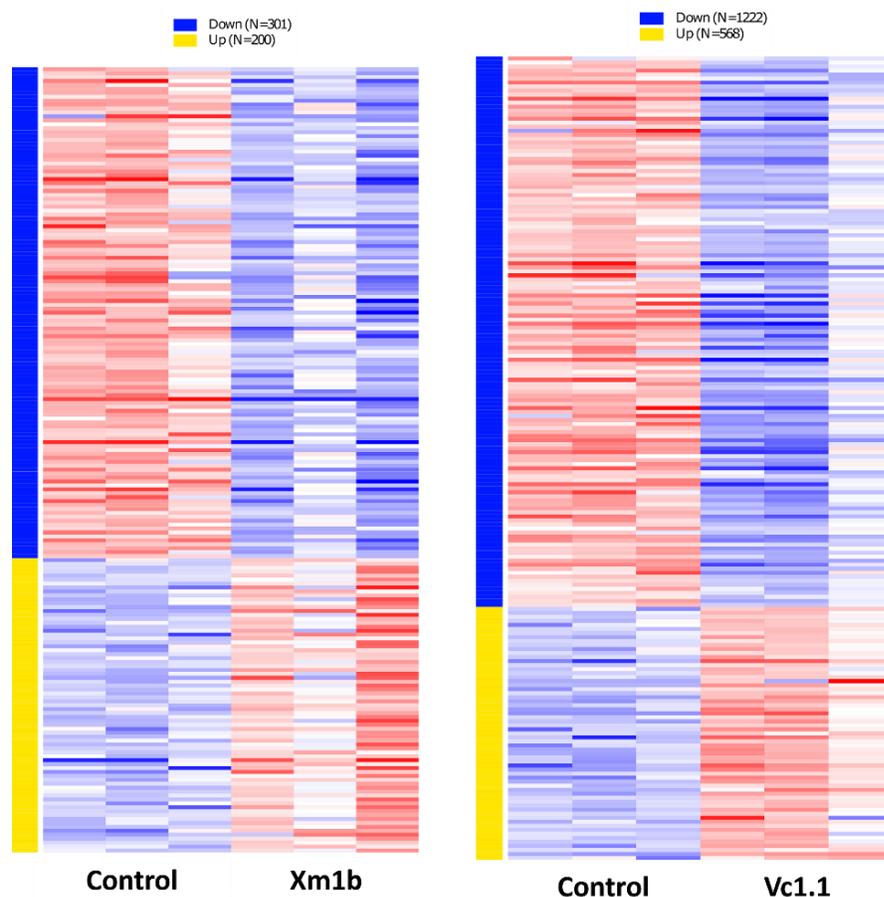


Figura 25. Efecto de las conotoxinas sobre la expresión génica de osteoblastos. El análisis de RNAseq se realizó en osteoblastos a los 21 días de diferenciación, tratados con conotoxina Xm1b (izquierda) y Vc1.1 (derecha), se empleó para generar mapas de calor que muestran los genes expresados diferencialmente. El mapa de calor ilustra la expresión ($\text{Log}_2\text{FC} > 2$) de genes relacionados con osteoclastos. Utilizando DEseq2, se consideraron genes que cumplían con $\text{FDR} < 0,1$ y $\text{Log}_2\text{FC} > 2$, y todos los demás análisis utilizaron parámetros predeterminados en iDEP.92.

Estos resultados indican que Xm1b afecta procesos asociados con proliferación y adaptación de los osteoblastos de manera positiva, mientras que inhibe procesos asociados con la maduración.

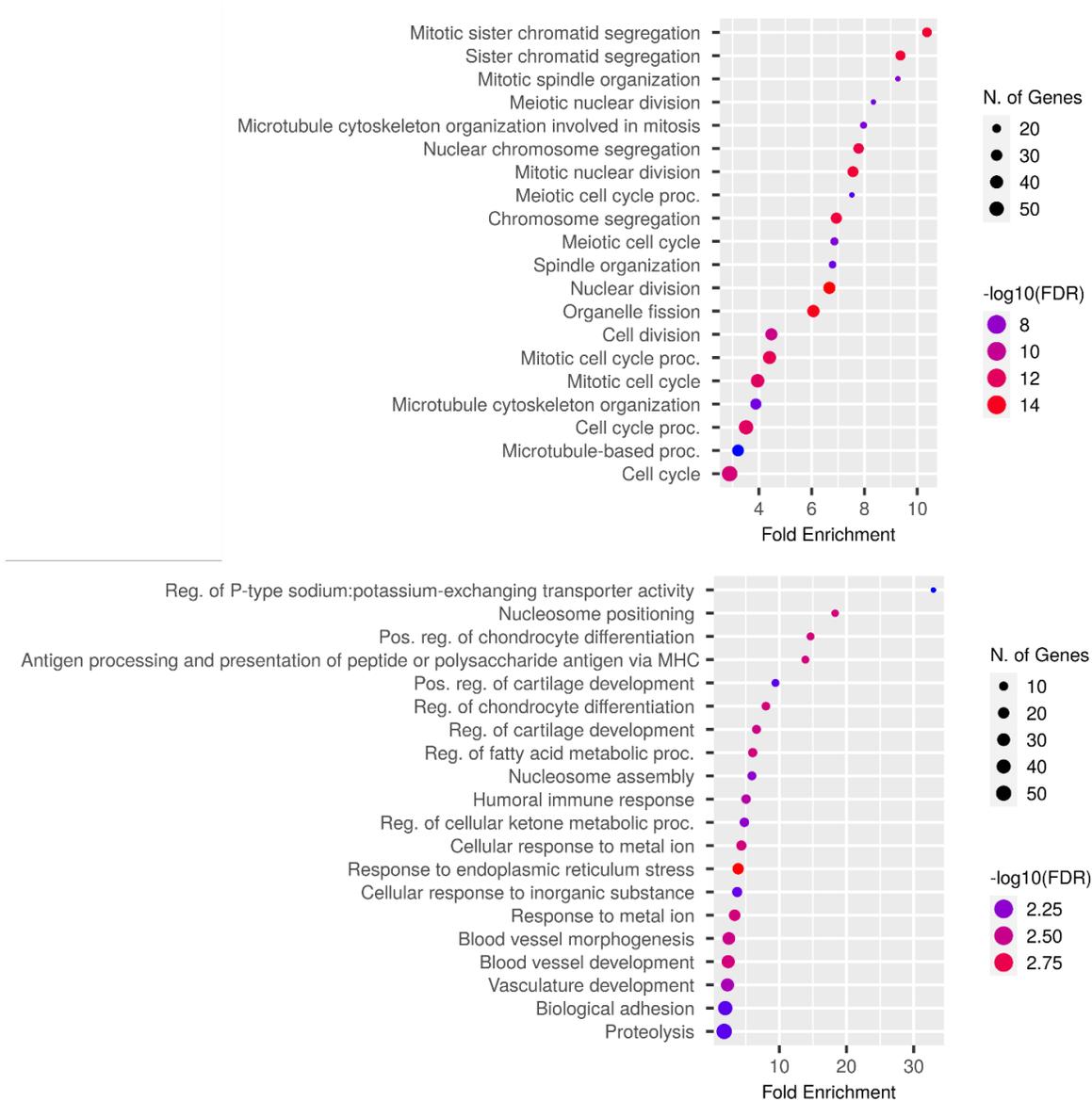


Figura 26. Términos GO asociados a la modulación transcriptómica en osteoblastos por Xm1b. Visualización de diagramas de puntos de términos GO regulados hacia arriba y hacia abajo de procesos biológicos para osteoblastos tratados con Xm1b. El tamaño del punto representa el recuento de genes enriquecidos en cada proceso biológico, y el color del punto indica la tasa de descubrimiento falso (FDR <0,1).

Para el caso de los osteoblastos tratados con Vc1.1 (Figura 25, panel derecho) observamos la modulación de 1790 genes, 1222 de estos genes fueron regulados negativamente y 568 genes regulados positivamente. Los genes modulados en osteoblastos por Vc1.1 (Figura 27) fueron anotados a procesos como "ciclo celular" (n = 162 genes), el "proceso del ciclo celular" (n = 133) y la "respuesta celular al estrés" (n = 120). Por el contrario, indujo una regulación negativa de términos enriquecidos relacionados con "adhesión celular" (n=170), "desarrollo del sistema esquelético" (n=92), "transporte de membrana iónica"

(n=85), “osificación” (n=77), “desarrollo de cartilago” (n=47), “diferenciación de osteoblastos” (n=40), “desarrollo óseo” (n=38), “diferenciación de condrocitos” (n=30) y “proceso metabólico del colágeno” (n = 28).

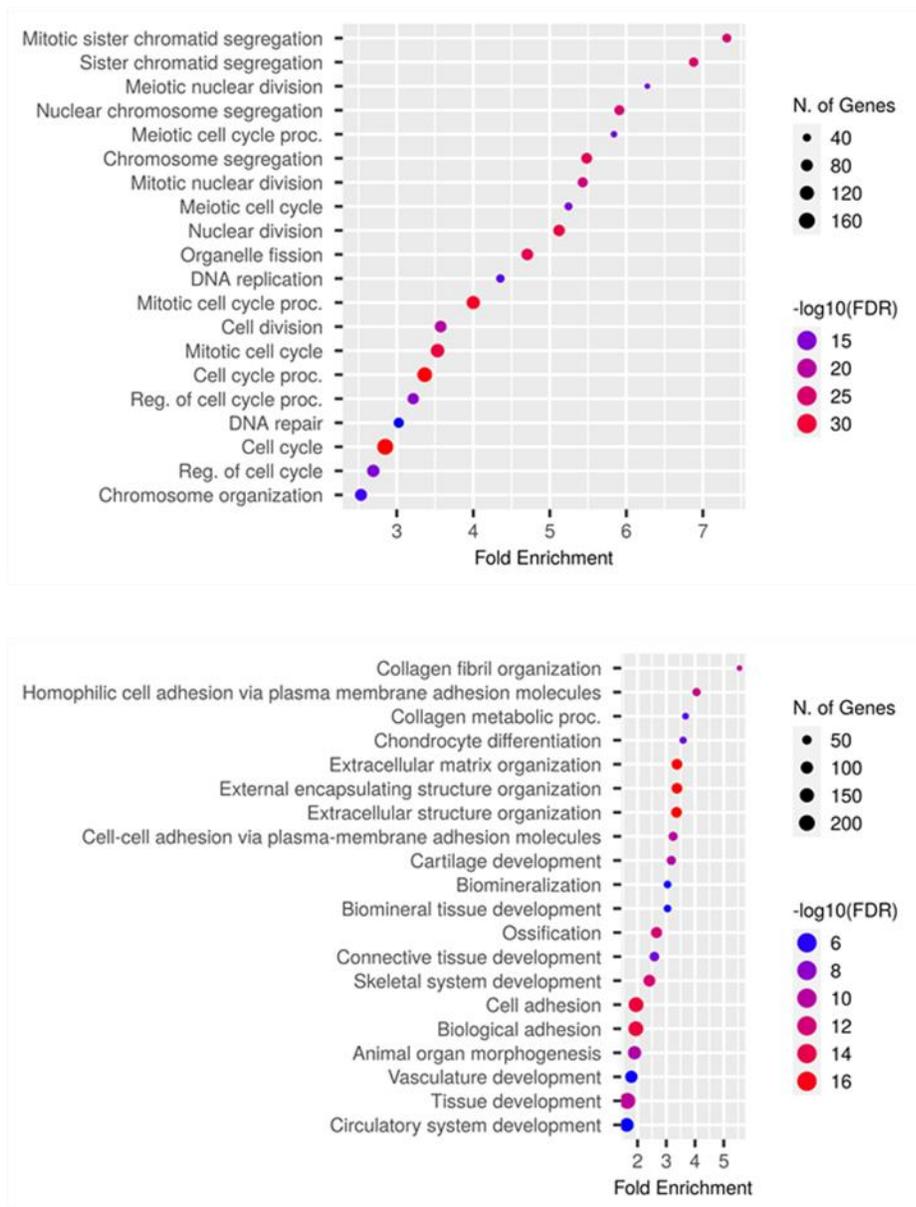


Figura 27. Términos GO asociados a la modulación transcriptómica en osteoblastos por Vc1.1. Visualización de diagramas de puntos de términos GO regulados hacia arriba (panel superior) y hacia abajo (panel inferior) de procesos biológicos para osteoblastos Vc1.1. El tamaño del punto representa el recuento de genes enriquecidos en cada proceso biológico, y el color del punto indica la tasa de descubrimiento falso ($\text{FDR} < 0,1$).

Los resultados transcriptómicos de osteoblastos tratados con Vc1.1 mostraron que, la conotoxina afecta procesos asociados al ciclo celular, respuesta al estrés, así como aquellos procesos relacionados a la

diferenciación y mineralización de las células osteogénicas. Sugiriendo que esta conotoxina afecta etapas de la maduración osteoblástica, afectando su actividad de mineralización.

El análisis de genes regulados negativamente por Xm1b y Vc1.1 (Figura 28), nos permitió identificar la modulación de genes asociados a la formación ósea, incluyendo componentes estructurales de la matriz ósea (*Col16a1*, *Col15a1*, *Col1a1*, *Col11a1*, *Col1a2*, *y *Bgn*). La regulación de miembros de la vía Wnt/ β -Catenina y miembros de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), sugieren supresión de rutas críticas para la diferenciación y maduración de los osteoblastos. Estos resultados son consistentes con los observados en la evaluación funcional donde cuantificamos una menor mineralización por parte de los osteoblastos tratados con las conotoxinas Xm1b y Vc1.1.*

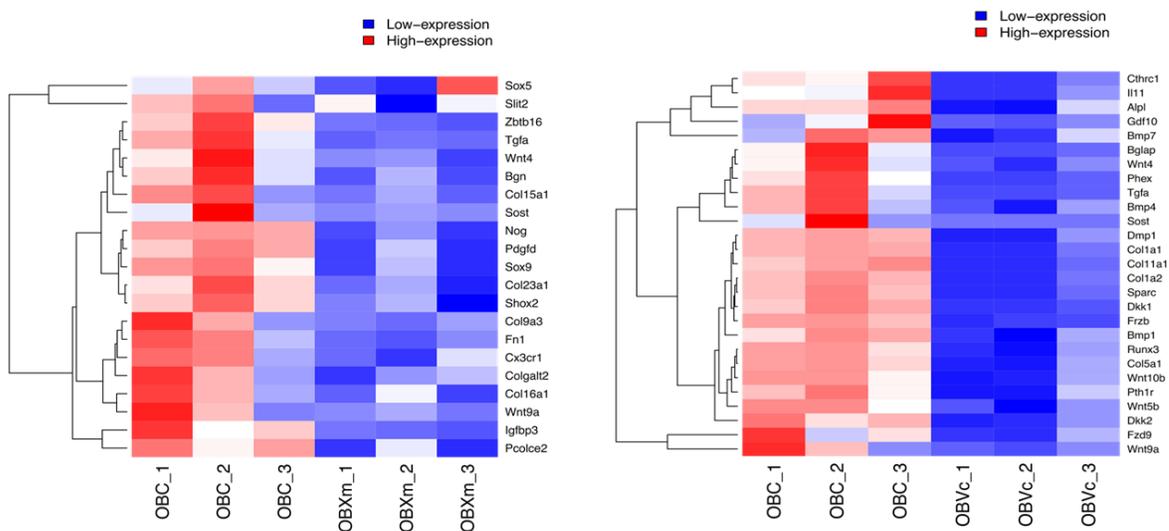


Figura 28. Principales genes regulados a la baja en los osteoblastos. Conotoxina Xm1b (izquierda) y conotoxina Vc1.1 (derecha). El análisis de expresión diferencial utilizó el paquete DESeq2, manteniéndose los genes que cumplieran con los criterios de $FDR < 0,1$ y $Log2FC > 2$. Todos los análisis restantes se realizaron con parámetros predeterminados en iDEP.92.

3.2.2.11 Evaluación de conotoxinas en el cultivo ex vivo de calvarias

Con el fin de evaluar el efecto de las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 en la remodelación ósea, utilizamos un modelo de cultivo *ex vivo* de tejido óseo empleando hemi-calvarias de ratón. Las hemi-calvarias fueron cultivadas durante 7 días y tratadas las conotoxinas a una concentración de $0.0656 \mu\text{M}$ para Xm1b y $0.0552 \mu\text{M}$ para Vc1.1. Transcurrido el tiempo de cultivo se realizó análisis histológico y de expresión génica de los tejidos.

En el análisis histológico del tejido óseo observamos una disminución significativa del área ósea (Figura 29, panel superior e inferior izquierdo) para las calvarias tratadas con Xm1b ($P=0.0053$) así como Vc1.1 ($P=0.0461$), estos cambios fueron acompañados con un mayor número de osteoclastos por superficie ósea (Figura 29, panel inferior derecho). Estos resultados sugieren un incremento en el proceso de resorción ósea.

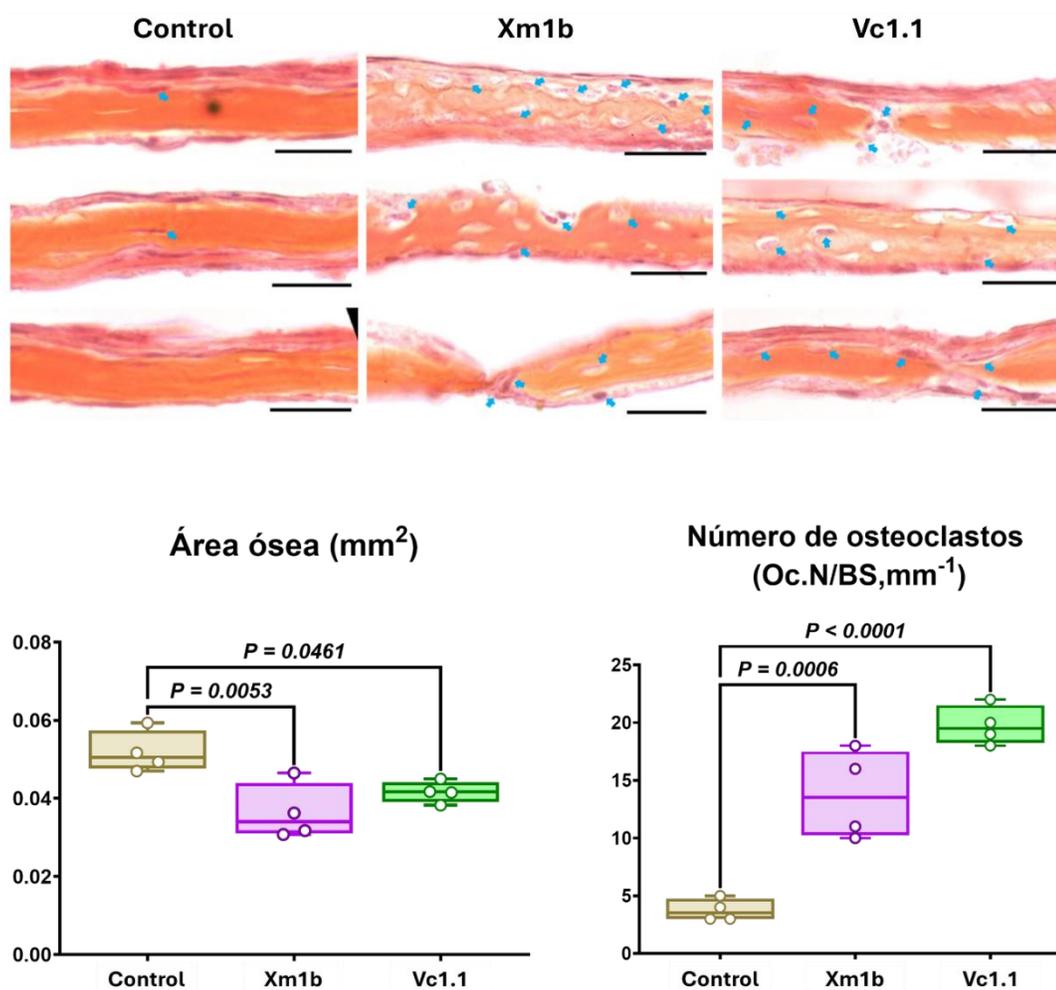


Figura 29. Efecto de las conotoxinas en el cultivo de calvaria *ex vivo*. Se cultivaron hemi-calvarias de ratones recién nacidos *ex vivo* con o sin conotoxina Xm1b o Vc1.1. Después de 7 días de cultivo, se fijó el tejido óseo y se preparó para el análisis histológico. Secciones representativas teñidas con H&E de calvarias de ratón (las flechas indican osteoclastos) (panel superior), Barra de escala = 100 μ m. Medida histomorfométrica del área ósea (panel inferior izquierdo) y Cuantificación del número de osteoclastos en la superficie ósea (panel inferior derecho). ANOVA de 1 vía con post-test de Dunnett.

A nivel molecular, las hemi-calvarias tratadas con Xm1b mostraron una disminución significativa en la expresión de *Runx2*, un regulador maestro de la diferenciación de osteoblastos, junto con la reducción de *Opg* y un incremento de *Rankl* (Figura 30). La proporción aumentada de la expresión de *Rankl/Opg*, en conjunto con la regulación positiva de *Sost* y *Ctsk*, genes asociados a la inhibición de la diferenciación de osteoblastos y esencial para la degradación de la matriz ósea, respectivamente, indica un microambiente óseo que favorece la osteoclastogénesis y potencia la resorción.

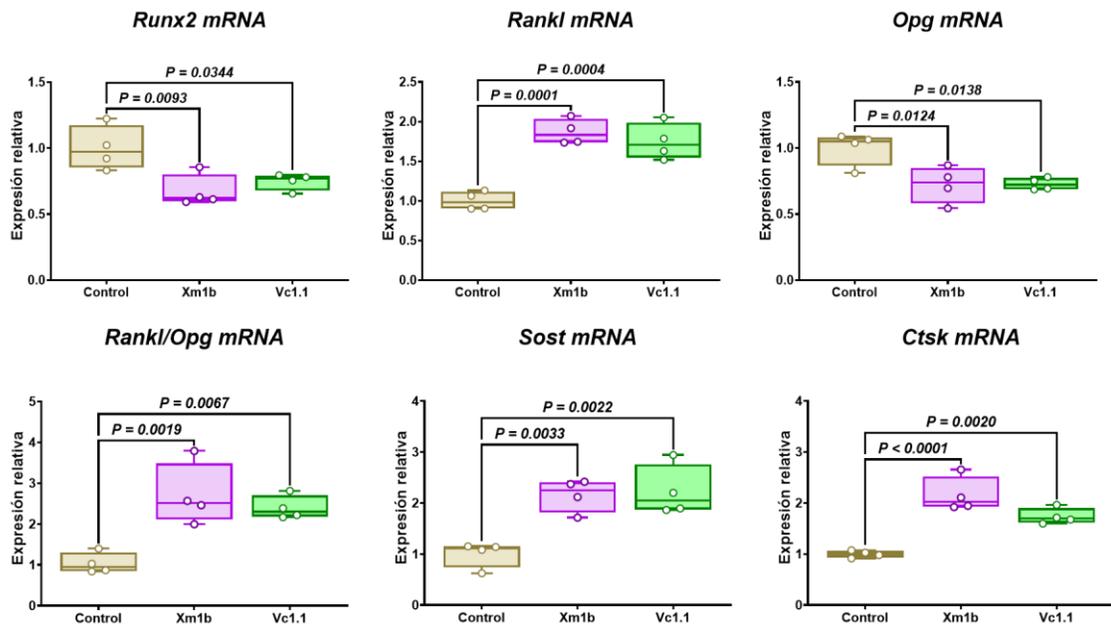


Figura 30. Efecto de las conotoxinas en el cultivo de calvaria *ex vivo*. Se cultivaron hemi-calvarias de ratones recién nacidos *ex vivo* con o sin conotoxina Xm1b o Vc1.1. Después de 7 días de cultivo se extrajo el RNA total del tejido calvaria para evaluar el efecto de Xm1b y Vc1.1 en la expresión de los genes *Runx2*, *Rankl*, *Opg*, *Sost* y *Ctsk* usando RT-qPCR. ANOVA de 1 vía con post-test de Dunnett.

La modulación en la expresión de genes observado en las calvarias tratadas con la conotoxina Vc1.1 detectaron una reducción en *Runx2* y *Opg*, y un incremento en *Rankl*, *Sost* y *Ctsk*. Estos resultados sugieren el potencial de Vc1.1 para alterar la remodelación ósea y favoreciendo la destrucción del tejido óseo.

Estos resultados sugieren que las conotoxinas Xm1b y Vc1.1 promueven un microambiente en el tejido óseo que favorece la osteoclastogénesis y la resorción, además que disminuyen la diferenciación de osteoblastos.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Evaluación de las fracciones de *C. ximenes* en células óseas

Los resultados del presente trabajo muestran que los componentes del veneno de *C. ximenes* ejercen efectos sobre la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos. El fraccionamiento del veneno total mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (HPLC-RP) nos permitió obtener 13 fracciones, que fueron evaluadas en ensayos de osteoclastogénesis y osteoblastogénesis.

Las fracciones evaluadas indujeron un incremento en la diferenciación de las células RAW264.7 a osteoclastos en comparación con el grupo control dependiente RANKL. Mientras que el tratamiento con veneno total disminuyó la cantidad de osteoclastos. Dado que las concentraciones evaluadas en osteoclastogénesis no afectaron la viabilidad de las células RAW264.7 a los 3 y 6 días de tratamiento, es posible que dentro de los componentes del veneno existan aquellos que favorecen la osteoclastogénesis y otros que pueden llegar a regularla de manera negativa. Si bien el fraccionamiento del veneno permitió enriquecer componentes con actividad pro-osteoclastogénica, en un futuro se recomienda evaluar distintas concentraciones de estas para establecer si hay un perfil dosis dependiente, y refraccionar las fracciones evaluadas, con el fin de identificar componentes que favorecen o que inhiben la osteoclastogénesis.

En el modelo de osteoblastogénesis observamos una respuesta más heterogénea ante el tratamiento de las fracciones. La fracción 4 estimuló la mineralización a la menor concentración evaluada, mientras a la mayor concentración disminuyó la mineralización. Por el contrario, la fracción 10 promovió la mineralización en las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de la fracción 5 se pudo observar que tuvo un efecto pro-osteoclastogénico mientras que disminuyó la mineralización de osteoblastos a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Sería relevante evaluar el potencial modulador de osteoclastogénesis de las fracciones 4 y 10, tomando como referencia la fracción 5 que tuvo efecto en ambos modelos. En el cromatograma observamos que en estas fracciones hay más de un pico indicando la presencia de más de un péptido, la variación en la proporción y concentración de estos componentes bioactivos puede ser lo que genera el estímulo o disminución osteogénica. Si bien con las demás fracciones no observamos efectos directos sobre mineralización eso no descarta posibles efectos en la diferenciación, proliferación o la producción de matriz ósea.

Para complementar estos ensayos se sugiere el refraccionamiento de las fracciones y su consecuente evaluación en viabilidad en precursores de osteoclastos y osteoblastos. Además de su evaluación en ensayos de diferenciación de células óseas, con el fin de identificar subfracciones que promuevan la osteoblastogénesis, para eventualmente aislar el o los péptidos responsables.

No hay estudios previos que describan el efecto que los componentes del veneno como conotoxinas puedan tener en la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos. Sin embargo, si ha sido descrito la afinidad que estos componentes presentan por distintos blancos moleculares, incluidos canales iónicos, como canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , y receptores como los receptores nicotínicos de acetilcolina (N. Chen et al., 2018). El uso de la ω -conotoxina MVIIA para el tratamiento del dolor crónico (Schmidtko et al., 2010), o la evaluación en ensayos clínicos de la α -conotoxina Vc1.1 y la χ -conotoxina MrlA, para tratamiento de dolor (Gao et al., 2017), demuestra el potencial que tienen como herramientas terapéuticas.

En este contexto, se estima que en el veneno producido por *Conus* hay entre 100 y 200 péptidos bioactivos (Gao et al., 2017), pertenecientes a distintas familias de conotoxinas (Figura 3), que pueden interactuar con distintos canales iónicos presentes en las células óseas. Por ejemplo, en osteoclastos el flujo de calcio intracelular a través de los canales TRPV4 y TRPV6 se ha asociado a la osteoclastogénesis al modular la expresión de NFATc1 por distintas vías (F. Chen et al., 2014; Kang et al., 2020; Luo et al., 2023). En osteoblastos, la modulación de canales como Cav1.2 estimula la vía de señalización Wnt/ β -catenina favoreciendo la osteoblastogénesis (Fei et al., 2019), mientras que los canales TRPV4 y KCa1.1 estimulan la diferenciación y actividad de los osteoblastos al estimular la expresión de *Runx2*, y otros genes osteogénicos como *Alpl*, *Col1a1* y osteocalcina. Esto hace plausible que los efectos observados en nuestros resultados sean a través de la modulación de canales iónicos presentes en las células óseas cuya activación está involucrada en rutas de diferenciación.

En conjunto, estos resultados preliminares indican que las fracciones del veneno de *C. ximenes* poseen componentes bioactivos con capacidad de afectar la diferenciación o actividad de osteoclastos y osteoblastos, lo que constituye un punto de partida para el estudio de péptidos presentes en este veneno como candidatos a modular la remodelación ósea.

4.2 Evaluación de conotoxinas sintéticas en la remodelación ósea

La remodelación ósea es un proceso complejo que implica la destrucción y formación del tejido óseo. El

desarrollo de estrategias para abordar afecciones caracterizadas por una formación o destrucción excesiva ósea requiere una comprensión profunda de los mecanismos que modulan este proceso (Sims & Martin, 2014). Entre estos diversos mecanismos, los canales iónicos tienen un papel central, la regulación de flujo de iones a través de estos se ha asociado con procesos celulares de diferenciación, proliferación, mecanotransducción, y apoptosis (Becchetti et al., 2013).

Para poder llevar a cabo la resorción ósea los osteoclastos requieren regular el flujo de iones como H^+ , Cl^- , Ca^{2+} y K^+ , con el fin de acidificar las lagunas de Howship y desmineralizar la matriz ósea, lo que permite la posterior degradación proteica por enzimas como la cathepsina K. Por otro lado, los osteoblastos requieren el flujo de calcio para liberar las vesículas que contienen los componentes para llevar a cabo la mineralización (entre estos están calcio y fosfato inorgánico), además de regular su diferenciación y proliferación (F. Chen et al., 2014; Kang et al., 2020). Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) son canales iónicos activados por ligando. Se abren o se cierran dependiendo de la unión de un ligando que permiten el flujo de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .

Las conotoxinas son péptidos presentes en el veneno producido por los caracoles marinos del género *Conus*, fueron desarrolladas evolutivamente para poder paralizar a las presas de los caracoles y para su defensa ante depredadores. Se caracterizan por su alta especificidad y afinidad sobre distintos canales iónicos, receptores neuronales, y transportadores. La presencia estructural de enlaces disulfuro brinda estabilidad y resistencia a degradación (Li et al., 2025). Estas características han convertido a las conotoxinas en herramientas de investigación terapéutico para diversas patologías como dolor crónico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia (Gao et al., 2017), cardioprotección (Lubbers et al., 2005), cáncer (Oroz-Parra et al., 2016, 2020) y diabetes tipo 2 (Lugo-Fabres et al., 2021). La ω -conotoxina MVIIA aislado del veneno de *Conus magus*, actualmente se emplea para el tratamiento de dolor crónico (M. McIntosh et al., 1982; Schmidtko et al., 2010). Las α -conotoxinas son uno de los grupos de conotoxinas más estudiados por su capacidad de unirse a los nAChR (N. Chen et al., 2018).

La α -conotoxina Xm1b fue aislada de la Fracción VI del veneno de *C. ximenes*, representa aproximadamente el 0.4% de los componentes de este veneno. La Fracción VI no fue evaluada en este estudio en ensayos de osteoclastogénesis, pero sí de osteoblastogénesis donde observamos una disminución de la mineralización por parte de los osteoblastos, este efecto también fue observado al evaluar la conotoxina Xm1b. La conotoxina Xm1b se identificó por su potencial para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*, en ensayos in vitro (Bernáldez, 2013), posteriormente fue caracterizada y sintetizada. La versión sintética se evaluó en modelos animales, donde se identificó una buena tolerabilidad a la toxina

encontrando una DL50 mayor a 550 mg/kg por vía intraperitoneal (Díaz, 2015). La α -conotoxina Cal14.2b (Biggs et al., 2010) ha sido evaluada *in vitro* e *in vivo* por su potencial farmacológico para el tratamiento de diabetes tipo 2 al modular la secreción de insulina (Lugo-Fabres et al., 2021). Por otro lado, la versión sintética de la α -conotoxina Vc1.1 (Sandall et al., 2003) ha sido evaluada en ensayos clínicos de fase I y II para el tratamiento de dolor neuropático, informando que su administración en humanos es segura y bien tolerada (Castro et al., 2017). Finalmente, la α -conotoxina lmlb, ha sido evaluada en diversos estudios *in vivo* principalmente como medio de entrega de otros fármacos por su alta selectividad a los nAChR $\alpha 7$ (Mei et al., 2015).

Se ha confirmado que las células óseas, incluidos los osteoclastos, los osteoblastos, los osteocitos y las células del revestimiento óseo, expresan diferentes subtipos de nAChR (Ma et al., 2014; Mandl et al., 2016; Sato et al., 2010). Sin embargo, el efecto de su modulación en la remodelación ósea es poco conocido. Por tanto, el objetivo de este trabajo se centró en evaluar el efecto de cuatro conotoxinas sintéticas en la formación y resorción ósea, las conotoxinas empleadas fueron: Xm1b e lmlb que se unen a los nAChR $\alpha 7$, Vc1.1 con unión a nAChR $\alpha 9\alpha 10$, y Cal14.2b antagonista de los nAChR $\alpha 9$.

Evaluamos el efecto de las conotoxinas en la viabilidad celular empleando cultivos primarios de médula ósea de ratón, un cultivo heterogéneo que contiene células precursoras de osteoclastos y osteoblastos. Se emplearon cinco concentraciones distintas de cada conotoxina (Tabla 5) y la viabilidad fue evaluada a los 2, 4 y 6 días de cultivo. Los resultados sugieren que las cuatro toxinas pueden afectar la viabilidad celular de manera dependiente de concentración y tiempo de exposición, particularmente lmlb y Vc1.1. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó la concentración más baja evaluada de cada conotoxina para los ensayos posteriores. El uso de esta concentración nos permitió explorar los efectos de las conotoxinas sin afectar la viabilidad de los osteoblastos y los osteoclastos.

Al evaluar los efectos de las conotoxinas en la diferenciación de osteoclastos, en un modelo de osteoclastos murinos diferenciados de médula ósea inducida con RANKL y M-CSF, observamos que las cuatro conotoxinas indujeron la diferenciación de osteoclastos. Para la conotoxina lmlb el número de osteoclastos aumentó proporcionalmente con la concentración de la misma, mientras que para Cal14.2b encontramos que a mayor concentración menor número de osteoclastos, aunque esta disminución no fue significativa. El efecto pro-osteoclastogénico de las conotoxinas también fue evaluado en un modelo de diferenciación de PBMC humanas a osteoclastos inducidas con RANKL y M-CSF, permitiendo confirmar que conservan su efecto, dado que todos los péptidos promovieron la osteoclastogénesis en el modelo humano. Sin embargo, ninguna de las conotoxinas fue capaz de promover la diferenciación a osteoclastos

en ausencia de RANKL, indicando que dependen de la vía de señalización RANKL-RANK para inducir su estímulo. La evaluación funcional demostró un aumento en la actividad de resorción en los osteoclastos tratados con conotoxinas, como lo muestra el análisis de los ensayos de resorción del área de la placa. Lo que indica un estímulo sobre la diferenciación y la actividad de resorción de los osteoclastos por parte de las conotoxinas.

El análisis de la expresión de genes marcadores de osteoclastos (*Trap*, *Rank*, *Ctsk* y *Nfatc1*) y de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ (*Chrna7*) y $\alpha 9$ (*Chrna9*), a los 7 días de cultivo mostró que, no hubo cambios relevantes en la expresión de *Trap* y *Ctsk* en las células tratadas con Vc1.1 y Cal14.2b, ambas conotoxinas promovieron la expresión de *Rank*. Xm1b y Cal14.2b incrementaron la expresión de *Nfatc1*. Estos resultados sugieren una modulación en etapas tempranas de diferenciación de los osteoclastos (Desai et al., 2023). *Rank* y *Nfatc1* son considerados marcadores tempranos de la diferenciación de osteoclastos mientras que *Trap* y *Ctsk* marcadores tardíos, por tanto, la modulación de las conotoxinas podría indicar un efecto en el proceso de diferenciación sin afectar etapas de maduración. Asimismo, es posible que el punto seleccionado para la evaluación de la expresión génica no haya coincidido con el mayor punto de expresión de estos genes (Hansen et al., 2024). Si bien, no observamos cambios en la expresión de *Trap* y *Ctsk*, sí encontramos a nivel funcional, un incremento en la actividad de resorción de los osteoclastos inducido por las conotoxinas. Lo que indica que otros mecanismos como acidificación de la zona de resorción, secreción de enzimas, y reorganización del citoesqueleto, podrían estar siendo afectados, o bien la modulación de mecanismos post-transcripcionales que regulan la actividad de los osteoclastos (Hansen et al., 2024; Q. Wang et al., 2022).

Con el fin de evaluar el posible efecto de las conotoxinas en la formación ósea, empleamos un modelo de diferenciación de células de médula ósea de ratón a osteoblastos como aproximación inicial. Después de inducir la diferenciación de las células durante 21 días con ácido ascórbico y β -glicerofosfato, en presencia de diferentes concentraciones de conotoxinas. En todas las condiciones evaluadas las conotoxinas redujeron la mineralización de los osteoblastos.

Las conotoxinas Xm1b, Im1b, Cal14.2b disminuyeron la expresión de *Runx2*, *Alpl*, *Col1a1* y *Bglap*, sin que se observaran cambios en la proporción de la expresión *Rankl/Opg*, además de modular de manera positiva la expresión de su respectivo nAChR. En el caso de la conotoxina Vc1.1 que principalmente se une a los nAChR $\alpha 9\alpha 10$, se encontró una regulación negativa en la expresión de los genes *Alpl*, *Col1a1* y *Bglap*, sin observarse cambios en la expresión de *Runx2* y *Rankl/Opg*, lo que indica una modulación en etapas intermedias a finales de maduración de los osteoblastos. En el análisis transcriptómico de osteoblastos

tratados con Xm1b y Vc1.1 encontramos una regulación negativa de genes (Figura 23) como *Col16a1*, *Col15a1*, *Col1a1*, *Col11a1*, *Col1a2*, *Fn1* y *Bgn*, miembros de la vía Wnt/ β -Catenina (*Wnt4*, *Wnt5b*, *Wnt9a*, *Wnt10b*) y miembros de las BMP (*Bmp4* y *Bmp7*) se asocia con una menor producción de matriz ósea y reducción en la diferenciación osteoblástica (Jensen et al., 2010; Zhu et al., 2024). La reducción de la mineralización de los osteoblastos fue consistente con la regulación negativa de genes asociados tanto a la diferenciación, maduración y actividad de los osteoblastos.

Al analizar la modulación en la expresión de genes en tejido óseo enriquecido en osteocitos y tratados con las conotoxinas, observamos que promovieron la expresión de *Dmp1*, *Mepe*, *Sost* y *Rankl*. La mineralización, maduración y regulación del fosfato se ha asociado a la expresión de *Dmp1* y *Mepe*, lo que indica una activación de fenotipo osteocítico (Dallas et al., 2013; Harris et al., 2007). La expresión del gen *Sost*, se emplea como marcador de osteocitos maduros e inhibición de la diferenciación de osteoblastos, en los tejidos evaluados encontramos un aumento en su expresión (Winkler et al., 2003). Los osteocitos son conocidos como la principal fuente de RANKL (Bellido, 2014), uno de los reguladores de la remodelación ósea, por lo que el aumento en la relación *Rankl/Opg* podría sugerir un cambio pro-osteoclastogénico en el microambiente óseo (Bonewald, 2011).

A fin de obtener una caracterización más detallada del efecto molecular de las conotoxinas en osteoclasto y osteoblastogénesis, seleccionamos la conotoxina Xm1b que principalmente se une a los nAChR $\alpha 7$ y la conotoxina Vc1.1 que se une los receptores nAChR $\alpha 9\alpha 10$ para realizar análisis transcriptómico. Con este acercamiento, identificamos la expresión diferencial de 19 genes en osteoclastos tratados con conotoxina Xm1b, para los que no fue posible realizar anotación a algún proceso biológico. Para osteoclastos tratados con conotoxina Vc1.1 observamos una expresión diferencial significativa detectada en 443 genes, con un enriquecimiento de procesos biológicos, como ciclo celular y su regulación, y división celular, y disminución de genes asociados a vasculogénesis, angiogénesis y respuesta a estímulos químicos. Aunque no observamos un impacto aparente en los procesos biológicos relacionados con la osteoclastogénesis o la resorción ósea, estos resultados sugieren la capacidad de las conotoxinas para modular la expresión genética en cultivos de osteoclastos, pudiendo actuar por rutas alternas que no se pudieron identificar en el análisis GO, o bien por mecanismos postranscripcionales. Se han realizado investigaciones limitadas sobre el papel de los nAChR en la regulación de la formación y actividad de los osteoclastos. Estudios anteriores tienen resultados contradictorios: algunos sugieren una disminución de la osteoclastogénesis cuando se usan agonistas de nAChR, mientras que otros indican un efecto potenciador como lo que observamos nosotros tras tratamiento con las conotoxinas, lo que pareciera indicar que el efecto de la

modulación de los nAChR depende de la concentración y el tiempo de evaluación empleados (Bajayo et al., 2012; Mandl et al., 2016).

En el análisis transcriptómico de osteoblastos, el tratamiento con Xm1b o Vc1.1 dio como resultado la regulación positiva de genes asociados con el ciclo celular y los procesos de división celular. En concreto, con la conotoxina Xm1b observamos una disminución de genes relacionados con la condrogénesis, la formación de cartílago, la producción de matriz ósea y la actividad de los osteoblastos. En los resultados con la conotoxina Vc1.1, observamos un efecto asociado con la regulación negativa de genes relacionados con la diferenciación, la actividad de los osteoblastos y del desarrollo esquelético. La regulación de miembros de la vía Wnt/ β -Catenina y miembros de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), sugieren supresión de rutas críticas para la diferenciación y maduración de los osteoblastos (Jensen et al., 2010; Zhu et al., 2024). En ratones con knockout en nAChR α 9, se observó una disminución en la expresión de fosfatasa alcalina (*Alpl*) y colágeno tipo 1 en osteoblastos, así como menor actividad de (ALPL), también una mayor fragilidad ósea. Por otro lado, la supresión de los nAChR α 10 no afectó de manera significativa la actividad de las células óseas (Baumann et al., 2019), mostrando la implicación de los nAChR en la integridad del tejido óseo. Los resultados sugieren que la señalización desencadenada tras estímulo con las conotoxinas tiene un impacto tanto en vías relacionadas con la diferenciación, maduración y actividad de osteoblastos, afectando de manera negativa la osteogénesis.

Finalmente, la evaluación de Xm1b y Vc1.1 en cultivo ex vivo de hemi-calvarias de ratón observamos una mayor cantidad de osteoclastos en la superficie del tejido óseo después del tratamiento con las conotoxinas. Acompañado de una regulación positiva en la expresión relativa de genes como *Ctsk* y la relación *Rankl/Opg*. *Rankl* juega un papel fundamental en la diferenciación y actividad de los osteoclastos, mientras que *Ctsk* sirve como marcador de función y *OPG*, por su parte, inhibe la osteoclastogénesis al actuar como un receptor señuelo para RANKL (Sims & Martin, 2014). Estos resultados sugieren que las conotoxinas Xm1b y Vc1.1, promueven un microambiente óseo pro-osteoclastogénico y resortivo. Además, la disminución del área ósea total, la regulación negativa de la expresión de *Runx2* (un regulador de la diferenciación de osteoblastos) y el incremento en la expresión del gen *Sost* en las calvarias tratadas con conotoxina, sugieren disminución de la diferenciación y actividad de los osteoblastos (Boyce & Xing, 2007).

Si bien el efecto de acetilcolina o los receptores nicotínicos de acetilcolina en la remodelación ósea ha sido poco explorado, algunos estudios han indicado que, los receptores se encuentran funcionalmente presentes en las células óseas. Por ejemplo, se ha reportado que la activación de nAChR α 7 puede modular

la resorción ósea al afectar la inflamación en el tejido en un modelo de osteoartritis (Courties et al., 2022). Padilla y colaboradores reportaron que la conotoxina lml se une a los nAChR $\alpha 7$ en células RAW264.7, el tratamiento de la línea celular THP-1 (monocitos humanos) y de macrófagos derivados de monocitos humanos con conotoxina lml, estimuló un ambiente pro-inflamatorio, aumentando la secreción de citocinas como TNF- α , IL-8, y TGF- β (Padilla et al., 2017). Las citocinas TNF- α , IL-8, y TGF- β también pueden promover un microambiente favorecedor para la osteoclastogénesis (Bendre et al., 2003; Xia et al., 2022).

Por otro lado, al inducir la diferenciación de osteoblastos y tratar con acetilcolina (ACh) observaron un incremento de la proliferación, pero también una disminución en la actividad, sugiriendo que la modulación de nAChR puede promover la proliferación en etapas tempranas de diferenciación e inhibirla en etapas posteriores (Sato et al., 2010). El knockout de nAChR $\alpha 7$ en ratones disminuyó la formación de osteoclastos, sin observar cambio en la diferenciación o actividad de osteoblastos (Mito et al., 2017), en el presente trabajo identificamos que la modulación de los nAChR $\alpha 7$ con las conotoxinas lmlb y Xm1b, si afecta la actividad y diferenciación de los osteoblastos. Mientras que el knockout de nAChR $\alpha 9$, disminuyó la expresión de fosfatasa alcalina y colágeno tipo 1 en osteoblastos, presentándose en los ratones una mayor fragilidad ósea (Baumann et al., 2019). Estos estudios respaldan el impacto de la modulación de los nAChR en la integridad del tejido óseo. En nuestra evaluación empleamos conotoxinas que actúan de manera selectiva sobre nAChR, y que afectaron la remodelación ósea. Las conotoxinas desequilibraron el ciclo de remodelación ósea al promover la formación de osteoclastos y su actividad de resorción, mientras disminuyen la diferenciación y actividad de mineralización de los osteoblastos. Estos resultados posicionan a las conotoxinas como moduladores de la remodelación ósea.

Futuros trabajos podrían centrarse en determinar si las conotoxinas están interactuando directamente con los receptores nicotínicos de acetilcolina presentes en las células óseas, con el fin de determinar su mecanismo de acción y especificidad en el contexto óseo. Con este fin, durante los ensayos de osteoclastogénesis, se recolectaron muestras de RNA a distintos puntos del proceso de diferenciación. No obstante, se encuentra pendiente realizar el análisis transcriptómico de dichos datos, lo cual permitirá complementar la comprensión de los procesos moleculares involucrados, especialmente considerando que los perfiles de expresión génica obtenidos al día siete de diferenciación no son concluyentes respecto el efecto de las conotoxinas en los osteoclastos. Además, la evaluación *in vivo* de las conotoxinas es crucial para respaldar los resultados encontrados *in vitro* y *ex vivo*, esto nos lleva a proponer si evaluar este efecto pro-osteoclastogénico e inhibidor de la formación ósea se mantienen en un entorno complejo, así como confirmar su seguridad y eficacia terapéutica.

Durante el desarrollo de este trabajo, hemos observado un efecto dual de las conotoxinas, por un lado, favorecen la osteoclastogénesis y la resorción ósea, mientras que, por otro lado, disminuyen la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso.

Como se ha mencionado previamente, dentro de las patologías óseas encontramos aquellas donde el desequilibrio en la remodelación favorece un exceso en la formación, destrucción o ambos eventos (Sims & Martin, 2014). La osteoporosis es la enfermedad ósea más común, se estima que afecta a una de cada tres mujeres y a uno de cada cinco hombres mayores de 50 años. Se caracteriza por una actividad de los osteoclastos incrementada, mientras que los osteoblastos no alcanzan a formar el tejido destruido, generando huesos frágiles y propensos a fracturas (Epidemiology | International Osteoporosis Foundation, 2025).

Uno de los principales tratamientos para la osteoporosis son los bifosfonatos, que se unen a la hidroxiapatita del tejido óseo, inhiben la resorción ósea al inducir la apoptosis en osteoclastos tras inhibir la farnesil pirofosfato sintasa. Por tanto, los bifosfonatos ayudan a desacelerar la pérdida ósea, al inhibir la actividad de los osteoclastos, sin embargo, este remodelado lento, también permite la acumulación de tejido óseo dañado (Drake et al., 2008). En este sentido, el uso transitorio de las conotoxinas podría ser evaluado, para reactivar la resorción ósea disminuida por los bifosfonatos, y de esta manera ayudar a estimular la osteogénesis. La evaluación de las conotoxinas en conjunto con agentes osteoanabólicos (por ejemplo, teriparatida, abaloparatida o romosozumab) podría ser de particular interés.

Se ha observado que, en pacientes con osteoporosis, mientras hay una pérdida de densidad ósea, hay un aumento de calcificación vascular. La mineralización vascular aumenta el riesgo de infarto, accidente cerebrovascular, demencia, entre otras afecciones (Martini et al., 2023). Durante la calcificación vascular, hay una transdiferenciación celular, las células musculares lisas vasculares se rediferencian a un fenotipo osteoblástico, quienes serán las encargadas de mineralizar el tejido vascular. Durante este proceso se requiere la señalización de RUNX2, de proteínas morfogénicas óseas, de Wnt/ β -Catenina, ALPL, osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN) (Liang et al., 2024). Considerando el efecto de las conotoxinas evaluadas en el proceso de diferenciación y actividad osteoblástica, podría ser de interés la evaluación de estas en el proceso de calcificación vascular. De este enfoque podrían surgir nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de la mineralización patológica.

La osificación heterotópica es el proceso anormal por el cual se genera tejido óseo fuera del esqueleto, puede afectar de tejidos blandos, tendones, o en músculos. Es un padecimiento óseo raro, que puede

desarrollarse por traumatismos, cirugías, o quemaduras. Durante el proceso de osificación heterotópica se ha identificado un incremento en la expresión de BMPs, que junto con la activación de Wnt/ β -Catenina promueven un microambiente osteoinductor (O'Brien et al., 2012). Dado el efecto de las conotoxinas en la osteogénesis, la liberación local en las áreas donde hay formación de hueso heterotópico podría presentar una estrategia terapéutica.

En conjunto, los resultados del presente trabajo demuestran que las conotoxinas sintéticas Xm1b, Vc1.1, Im1b y Cal14.2b modulan la remodelación ósea, promoviendo la diferenciación y actividad de los osteoclastos, mientras que en osteoblastos disminuyeron su diferenciación y mineralización. Sugiriendo que la modulación de los nAChR participa en la regulación de la integridad del tejido óseo, y que esta podría ser relevante en un contexto fisiológico y patológico. Al ser potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de otros padecimientos fuera del sistema esquelético, este trabajo también sugiere la vigilancia de la salud ósea para quienes puedan llegar a estar bajo administración terapéutica de conotoxinas.

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que los componentes de las fracciones del veneno de *C. ximenes* tienen potencial para modular la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos. Particularmente las fracciones 4 y 10 son candidatas de interés para refraccionamiento y futuros análisis dada su capacidad para inducir la mineralización de los osteoblastos. El estudio de estas fracciones con el fin de identificar los componentes presentes y responsables en la mineralización ósea podría conducir al descubrimiento de conopéptidos con potencial terapéutico en la modulación de la remodelación y salud ósea.

En conjunto, la evaluación de las conotoxinas sintéticas Xm1b, Vc1.1, lmlb y Cal14.2b, dirigidas a los receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$, tienen la capacidad de modular la remodelación ósea en distintas etapas. Las conotoxinas promovieron la diferenciación y actividad de los osteoclastos, mientras disminuyeron la diferenciación y actividad de los osteoblastos, modulando la expresión de genes necesarios para la diferenciación y producción de matriz ósea. En tejido enriquecido en osteocitos se observó una respuesta génica asociada a un ambiente pro-osteoclástico, así como en el cultivo *ex vivo* de calvarias. Lo que indica el potencial de las conotoxinas como herramientas para la modulación de la remodelación ósea.

Literatura citada

- Abraham, N., Healy, M., Ragnarsson, L., Brust, A., Alewood, P. F., & Lewis, R. J. (2017). Structural mechanisms for α -conotoxin activity at the human $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor. *Scientific Reports*, 7(1), 45466. <https://doi.org/10.1038/srep45466>
- Anderson, P. D., & Bokor, G. (2012). Conotoxins: Potential Weapons from the Sea. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*, 3(3), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2157-2526.1000120>
- Bajayo, A., Bar, A., Denes, A., Bachar, M., Kram, V., Attar-Namdar, M., Zallone, A., Kovács, K. J., Yirmiya, R., & Bab, I. (2012). Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), 15455–15460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206061109>
- Baumann, L., Kauschke, V., Vikman, A., Dürselen, L., Krasteva-Christ, G., Kampschulte, M., Heiss, C., Yee, K. T., Vetter, D. E., & Lips, K. S. (2019). Deletion of nicotinic acetylcholine receptor alpha9 in mice resulted in altered bone structure. *Bone*, 120, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.11.003>
- Becchetti, A., Munaron, L., & Arcangeli, A. (2013). The role of ion channels and transporters in cell proliferation and cancer. *Frontiers in Physiology*, 4, 312. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00312>
- Bellido, T. (2014). Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcified tissue international*, 94(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
- Bellido, T., & Delgado-Calle, J. (2020). Ex Vivo Organ Cultures as Models to Study Bone Biology. *JBMR Plus*, 4(3), 10345. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10345>
- Bendre, M. S., Montague, D. C., Peery, T., Akel, N. S., Gaddy, D., & Suva, L. J. (2003). Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone*, 33(1), 28–37. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(03\)00086-3](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(03)00086-3)
- Bernaldez Sarabia, J. (2013). Aislamiento y caracterización de toxinas de caracoles marinos del género *Conus* con actividad en *Mycobacterium tuberculosis*. [Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3568>
- Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.-P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K. J., Navarro, A. L., Corneli, P. S., & Olivera, B. M. (2010). Evolution of *Conus* Peptide Toxins: Analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Molecular phylogenetics and evolution*, 56(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.029>
- Bohmwald, K., Gálvez, N. M. S., Andrade, C. A., Mora, V. P., Muñoz, J. T., González, P. A., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. (2021). Modulation of Adaptive Immunity and Viral Infections by Ion Channels. *Frontiers in Physiology*, 12, 736681. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.736681>
- Bolamperti, S., Villa, I., & Rubinacci, A. (2022). Bone remodeling: An operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Research*, 10(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8>

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Boyce, B. F., & Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/ar2165>
- Stark, Z., & Savarirayan, R. (2009). Osteopetrosis. *Orphanet journal of rare diseases*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-5>
- Camerino, D. C., Tricarico, D., & Desaphy, J.-F. (2007). Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(2), 184–198. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.01.013>
- Castro, J., Harrington, A. M., Garcia-Caraballo, S., Maddern, J., Grundy, L., Zhang, J., Page, G., Miller, P. E., Craik, D. J., Adams, D. J., & Brierley, S. M. (2017). α -Conotoxin Vc1.1 inhibits human dorsal root ganglion neuroexcitability and mouse colonic nociception via GABAB receptors. *Gut*, 66(6), 1083–1094. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310971>
- Chen, F., Ni, B., Yang, Y. O., Ye, T., & Chen, A. (2014). Knockout of TRPV6 causes osteopenia in mice by increasing osteoclastic differentiation and activity. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 33(3), 796–809. <https://doi.org/10.1159/000358653>
- Chen, N., Xu, S., Zhang, Y., & Wang, F. (2018). Animal protein toxins: Origins and therapeutic applications. *Biophysics Reports*, 4(5), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0067-x>
- Courties, A., Petit, J., Do, A., Legris, M., Kouki, I., Pigenet, A., Sacitharan, P. K., Ehkirch, F.-P., Berenbaum, F., & Sellam, J. (2022). Alpha-7 Nicotinic Receptor Dampens Murine Osteoblastic Response to Inflammation and Age-Related Osteoarthritis. *Frontiers in Immunology*, 13(1), 842538. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842538>
- Cuero, C. N., Iduarte, B., & Juárez, P. (2020). Measuring Bone Remodeling and Recreating the Tumor-Bone Microenvironment Using Calvaria Co-culture and Histomorphometry. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 157(1), 59028. <https://doi.org/10.3791/59028>
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., & Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, 16(25), 5484–5491. <https://doi.org/10.1021/bi00644a014>
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocrine Reviews*, 34(5), 658–690. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>
- Desai, S., Lång, P., Näreoja, T., Windahl, S. H., & Andersson, G. (2023). RANKL-dependent osteoclast differentiation and gene expression in bone marrow-derived cells from adult mice is sexually dimorphic. *Bone Reports*, 19(1), 101697. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2023.101697>

- Díaz Castillo, J. (2015). Pruebas preclínicas de la conotoxina sintética xm1b con actividad contra tuberculosis en un modelo murino. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3569>
- Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S. (2008). Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(9), 1032–1045. <https://doi.org/10.4065/83.9.1032>
- Eng, J., Kleinman, W. A., Singh, L., Singh, G., & Raufman, J. P. (1992). Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 267(11), 7402–7405. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42531-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42531-8)
- Fei, D., Zhang, Y., Wu, J., Zhang, H., Liu, A., He, X., Wang, J., Li, B., Wang, Q., & Jin, Y. (2019). Cav 1.2 regulates osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via canonical Wnt pathway in age-related osteoporosis. *Aging Cell*, 18(4), 12967. <https://doi.org/10.1111/acer.12967>
- Feng, Y., Su, L., Zhong, X., Guohong, W., Xiao, H., Li, Y., & Xiu, L. (2016). Exendin-4 promotes proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts by MAPKs activation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(3), 189–199. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0264>
- Ferreira, S. H., Greene, L. J., Alabaster, V. A., Bakhle, Y. S., & Vane, J. R. (1970). Activity of Various Fractions of Bradykinin Potentiating Factor against Angiotensin I Converting Enzyme. *Nature*, 225(5230), 379–380. <https://doi.org/10.1038/225379a0>
- Figueroa-Montiel, A., Bernáldez, J., Jiménez, S., Ueberhide, B., González, L. J., & Licea-Navarro, A. (2018). Antimycobacterial Activity: A New Pharmacological Target for Conotoxins Found in the First Reported Conotoxin from *Conasprella ximenes*. *Toxins*, 10(2), 51. <https://doi.org/10.3390/toxins10020051>
- Gan, Z. R., Gould, R. J., Jacobs, J. W., Friedman, P. A., & Polokoff, M. A. (1988). Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(36), 19827–19832. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77710-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77710-2)
- Gao, B., Peng, C., Yang, J., Yi, Y., Zhang, J., & Shi, Q. (2017). Cone Snails: A Big Store of Conotoxins for Novel Drug Discovery. *Toxins*, 9(12), 397. <https://doi.org/10.3390/toxins9120397>
- Gorai, B., & Vashisth, H. (2022). Structures and Interactions of Insulin-like Peptides from Cone Snail Venom. *Proteins*, 90(3), 680–690. <https://doi.org/10.1002/prot.26265>
- Gorter, D. J., & ten Dijke, P. (2013). Signal Transduction Cascades Controlling Osteoblast Differentiation. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 8th ed., pp. 15–24. <https://doi.org/10.1002/9781118453926.ch2>
- Gu, Y., Preston, M. R., El Haj, A. J., Howl, J. D., & Publicover, S. J. (2001). Three types of K(+) currents in murine osteocyte-like cells (MLO-Y4). *Bone*, 28(1), 29–37. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(00\)00439-7](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(00)00439-7)
- Halper, J., Madel, M.-B., & Blin-Wakkach, C. (2021). Differentiation and Phenotyping of Murine Osteoclasts from Bone Marrow Progenitors, Monocytes, and Dendritic Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2308, 21–34. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1425-9_2

- IOF International Osteoporosis Foundation. (2025, August 19). *Epidemiology*. <https://www.osteoporosis.foundation/health-professionals/about-osteoporosis/epidemiology>
- Hansen, M. S., Madsen, K., Price, M., S e, K., Omata, Y., Zaiss, M. M., Gorvin, C. M., Frost, M., & Rauch, A. (2024). Transcriptional reprogramming during human osteoclast differentiation identifies regulators of osteoclast activity. *Bone Research*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00312-6>
- Harris, S. E., Gluhak-Heinrich, J., Harris, M. A., Yang, W., Bonewald, L. F., Riha, D., Rowe, P. S. N., Robling, A. G., Turner, C. H., Feng, J. Q., McKee, M. D., & Nicollela, D. (2007). DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: Theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 7(4), 313–315. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3357082/>
- Harvey, N., Dennison, E., & Cooper, C. (2010). Osteoporosis: Impact on health and economics. *Nature Reviews. Rheumatology*, 6(2), 99–105. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.260>
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., & Boyle, W. J. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3540–3545. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3540>
- Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R., & Westendorf, J. J. (2010). Regulation of gene expression in osteoblasts. *BioFactors (Oxford, England)*, 36(1), 25–32. <https://doi.org/10.1002/biof.72>
- Jiménez Flores, S. (2011). Aislamiento y caracterización de toxinas de *Anthopleura* sp y tres caracoles marinos del género *Conus* con efecto en la respuesta nociceptiva. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.] <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2474>
- Kang, J. Y., Kang, N., Yang, Y.-M., Hong, J. H., & Shin, D. M. (2020). The Role of Ca²⁺-NFATc1 Signaling and Its Modulation on Osteoclastogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3646. <https://doi.org/10.3390/ijms21103646>
- Kim, J. H., & Kim, N. (2014). Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *Journal of Bone Metabolism*, 21(4), 233–241. <https://doi.org/10.11005/jbm.2014.21.4.233>
- Kini, R. M. (2019). Toxins for decoding interface selectivity in nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Journal*, 476(10), 1515–1520. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190255>
- Kumari, A., Ameri, S., Ravikrishna, P., Dhayalan, A., Kamala-Kannan, S., Selvankumar, T., & Govarthanam, M. (2020). Isolation and Characterization of Conotoxin Protein from *Conus inscriptus* and Its Potential Anticancer Activity Against Cervical Cancer (HeLa-HPV 16 Associated) Cell Lines. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(2), 1051–1059. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09907-2>
- Lebbe, E. K. M., Peigneur, S., Wijesekara, I., & Tytgat, J. (2014). Conotoxins Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors: An Overview. *Marine Drugs*, 12(5), 2970–3004. <https://doi.org/10.3390/md12052970>

- Lee, M. N., Hwang, H.-S., Oh, S.-H., Roshanzadeh, A., Kim, J.-W., Song, J. H., Kim, E.-S., & Koh, J.-T. (2018). Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Experimental & Molecular Medicine*, *50*(11), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0170-6>
- Lerner, U. H. (2012). Osteoblasts, Osteoclasts, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. *Seminars in Orthodontics*, *18*(4), 237–248. <https://doi.org/10.1053/j.sodo.2012.06.002>
- Li, X., Zhang, C., Vail, C. E., Sherrill, J. T., & Xiong, J. (2025). Piezo1 expression in mature osteocytes is dispensable for the skeletal response to mechanical loading. *Bone*, *190*(1), 117276. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2024.117276>
- Liang, X., Li, Y., Wang, P., & Liu, H. (2024). Key regulators of vascular calcification in chronic kidney disease: Hyperphosphatemia, BMP2, and RUNX2. *PeerJ*, *12*(1), 18063. <https://doi.org/10.7717/peerj.18063>
- Liu, L., Shi, Y., Fan, X., Yao, Y., Wu, W., Tian, Y., Wu, H., Li, Z., Wang, Y., & Xu, C. (2024). The health-care utilization and economic burden in patients with genetic skeletal disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *19*(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13023-024-03102-3>
- Liu, N., Lu, W., Dai, X., Qu, X., & Zhu, C. (2022). The role of TRPV channels in osteoporosis. *Molecular Biology Reports*, *49*(1), 577–585. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06794-z>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lubbers, N. L., Campbell, T. J., Polakowski, J. S., Bulaj, G., Layer, R. T., Moore, J., Gross, G. J., & Cox, B. F. (2005). Postischemic Administration of CGX-1051, a Peptide from Cone Snail Venom, Reduces Infarct Size in Both Rat and Dog Models of Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *46*(2), 141–146. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000167015.84715.27>
- Lugo-Fabres, P. H., Otero-Sastre, L. M., Bernáldez-Sarabia, J., Camacho-Villegas, T. A., Sánchez-Campos, N., Serrano-Bello, J., Medina, L. A., Muñoz-Hernández, S., de la Cruz, L., Arenas, I., Barajas-Martínez, A., García, D. E., Nuñez-García, L., González-Canudas, J., & Licea-Navarro, A. F. (2021). Potential Therapeutic Applications of Synthetic Conotoxin s-cal14.2b, Derived from *Californiconus californicus*, for Treating Type 2 Diabetes. *Biomedicines*, *9*(8), 936. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080936>
- Luo, Z.-H., Ma, J.-X., Zhang, W., Tian, A.-X., Gong, S.-W., Li, Y., Lai, Y.-X., & Ma, X.-L. (2023). Alterations in the microenvironment and the effects produced of TRPV5 in osteoporosis. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04182-8>
- Ma, Y., Li, X., Fu, J., Li, Y., Gao, L., Yang, L., Zhang, P., Shen, J., & Wang, H. (2014). Acetylcholine affects osteocytic MLO-Y4 cells via acetylcholine receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *384*(1–2), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.021>
- Mandl, P., Hayer, S., Karonitsch, T., Scholze, P., Györi, D., Sykoutri, D., Blüml, S., Mócsai, A., Poór, G., Huck, S., Smolen, J. S., & Redlich, K. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors modulate osteoclastogenesis. *Arthritis Research & Therapy*, *18*(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0961-x>

- Manolagas, S. C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 21(2), 115–137. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>
- Marie, P. J., & Cohen-Solal, M. (2018). The Expanding Life and Functions of Osteogenic Cells: From Simple Bone-Making Cells to Multifunctional Cells and Beyond. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 33(2), 199–210. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3356>
- Marino, S., Logan, J. G., Mellis, D., & Capulli, M. (2014). Generation and culture of osteoclasts. *BoneKEY Reports*, 3(1), 570. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.65>
- Martini, N., Streckwall, L., & McCarthy, A. D. (2023). Osteoporosis and vascular calcifications. *Endocrine Connections*, 12(11), 230305. <https://doi.org/10.1530/EC-23-0305>
- McIntosh, J. M., Santos, A. D., & Olivera, B. M. (1999). Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 59–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.59>
- McIntosh, J. M., Yoshikami, D., Mahe, E., Nielsen, D. B., Rivier, J. E., Gray, W. R., & Olivera, B. M. (1994). A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, alpha-conotoxin Iml. *Journal of Biological Chemistry*, 269(24), 16733–16739. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)89452-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)89452-8)
- McIntosh, M., Cruz, L. J., Hunkapiller, M. W., Gray, W. R., & Olivera, B. M. (1982). Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 218(1), 329–334. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90351-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90351-4)
- Mei, D., Lin, Z., Fu, J., He, B., Gao, W., Ma, L., Dai, W., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., Lu, W., Zhou, D., & Zhang, Q. (2015). The use of α -conotoxin Iml to actualize the targeted delivery of paclitaxel micelles to $\alpha 7$ nAChR-overexpressing breast cancer. *Biomaterials*, 42(1), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.044>
- Merrild, D. M., Pirapaharan, D. C., Andreasen, C. M., Kjærsgaard-Andersen, P., Møller, A. M., Ding, M., Delaissé, J.-M., & Sjøe, K. (2015). Pit- and trench-forming osteoclasts: A distinction that matters. *Bone Research*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.32>
- Mito, K., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyamoto, K., Nitta, E., Iwama, A., Matsumoto, M., Nakamura, M., Sato, K., & Miyamoto, T. (2017). The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential negative regulator of bone mass. *Scientific Reports*, 7(1), 45597. <https://doi.org/10.1038/srep45597>
- Nasiripourdori, A., Taly, V., Grutter, T., & Taly, A. (2011). From Toxins Targeting Ligand Gated Ion Channels to Therapeutic Molecules. *Toxins*, 3(3), 260–293. <https://doi.org/10.3390/toxins3030260>
- O'Brien, E. J. O., Frank, C. B., Shrive, N. G., Hallgrímsson, B., & Hart, D. A. (2012). Heterotopic mineralization (ossification or calcification) in tendinopathy or following surgical tendon trauma. *International Journal of Experimental Pathology*, 93(5), 319–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00829.x>
- Olivera, B. M., & Teichert, R. W. (2007). Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: A model for concerted pharmacological discovery. *Molecular Interventions*, 7(5), 251–260. <https://doi.org/10.1124/mi.7.5.7>

- Oroz-Parra, I., Álvarez-Delgado, C., Cervantes-Luevano, K., Dueñas-Espinoza, S., & Licea-Navarro, A. F. (2020). Proapoptotic Index Evaluation of Two Synthetic Peptides Derived from the Coneshell *Californiconus californicus* in Lung Cancer Cell Line H1299. *Marine Drugs*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.3390/md18010010>
- Oroz-Parra, I., Navarro, M., Cervantes-Luevano, K. E., Álvarez-Delgado, C., Salvesen, G., Sanchez-Campos, L. N., & Licea-Navarro, A. F. (2016). Apoptosis Activation in Human Lung Cancer Cell Lines by a Novel Synthetic Peptide Derived from *Conus californicus* Venom. *Toxins*, 8(2), 38. <https://doi.org/10.3390/toxins8020038>
- Padilla, A., Keating, P., Hartmann, J. X., & Marí, F. (2017). Effects of α -conotoxin Iml on TNF- α , IL-8 and TGF- β expression by human macrophage-like cells derived from THP-1 pre-monocytic leukemic cells. *Scientific Reports*, 7(1), 12742. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11586-2>
- Pennington, M. W., Czerwinski, A., & Norton, R. S. (2018). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(10), 2738–2758. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>
- Perin, M., Chinigò, G., Genova, T., Mussano, F., & Munaron, L. (2023). The Impact of Plasma Membrane Ion Channels on Bone Remodeling in Response to Mechanical Stress, Oxidative Imbalance, and Acidosis. *Antioxidants*, 12(3), 689. <https://doi.org/10.3390/antiox12030689>
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
- Rivadeneira, F., & Mäkitie, O. (2016). Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 27(5), 262–281. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.006>
- Ross, F. P. (2013). Osteoclast Biology and Bone Resorption. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 8th ed., pp. 15–24. <https://doi.org/10.1002/9781118453926.ch3>
- Sandall, D. W., Satkunanathan, N., Keays, D. A., Polidano, M. A., Liping, X., Pham, V., Down, J. G., Khalil, Z., Livett, B. G., & Gayler, K. R. (2003). A novel alpha-conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry*, 42(22), 6904–6911. <https://doi.org/10.1021/bi034043e>
- Sato, T., Abe, T., Chida, D., Nakamoto, N., Hori, N., Kokabu, S., Sakata, Y., Tomaru, Y., Iwata, T., Usui, M., Aiko, K., & Yoda, T. (2010). Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Letters*, 584(4), 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.001>
- Scarborough, R. M., Rose, J. W., Hsu, M. A., Phillips, D. R., Fried, V. A., Campbell, A. M., Nannizzi, L., & Charo, I. F. (1991). Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. Barbouri*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(15), 9359–9362. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92826-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92826-7)
- Schmidtko, A., Lötsch, J., Freynhagen, R., & Geisslinger, G. (2010). Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet (London, England)*, 375(9725), 1569–1577. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60354-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60354-6)

- Shen, W.-R., Kimura, K., Ishida, M., Sugisawa, H., Kishikawa, A., Shima, K., Ogawa, S., Qi, J., & Kitaura, H. (2018). The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Exendin-4 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Osteoclast Formation and Bone Resorption via Inhibition of TNF- α Expression in Macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2018(1), 5783639. <https://doi.org/10.1155/2018/5783639>
- Sims, N. A., & Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: A multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKey Reports*, 3(1), 481. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.215>
- Stauber, T., Wartosch, L., Vishnolia, S., Schulz, A., & Kornak, U. (2023). CLCN7, a gene shared by autosomal recessive and autosomal dominant osteopetrosis. *Bone*, 168(1), 116639. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116639>
- Steinecker-Frohnwieser, B., Lohberger, B., Toegel, S., Windhager, R., Glanz, V., Kratschmann, C., Leithner, A., & Weigl, L. (2023). Activation of the Mechanosensitive Ion Channels Piezo1 and TRPV4 in Primary Human Healthy and Osteoarthritic Chondrocytes Exhibits Ion Channel Crosstalk and Modulates Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7868. <https://doi.org/10.3390/ijms24097868>
- Stern, A. R., Stern, M. M., Van Dyke, M. E., Jähn, K., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2012). Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. *BioTechniques*, 52(6), 361–373. <https://doi.org/10.2144/0000113876>
- Terlau, H., & Olivera, B. M. (2004). Conus venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1), 41–68. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2003>
- Tosi, L. L. (2024). Rare genetic skeletal disorders: Evolving terminology, therapies, education and advocacy. *Journal of the Pediatric Orthopaedic Society of North America*, 7(1), 100057. <https://doi.org/10.1016/j.jposna.2024.100057>
- Wang, D., Wang, H., Gao, F., Wang, K., & Dong, F. (2017). CIC-3 Promotes Osteogenic Differentiation in MC3T3-E1 Cell After Dynamic Compression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(6), 1606–1613. <https://doi.org/10.1002/jcb.25823>
- Wang, H., Li, X., Zhangsun, D., Yu, G., Su, R., & Luo, S. (2019). The $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist α O-Conotoxin GeXIVA[1,2] Alleviates and Reverses Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *Marine Drugs*, 17(5), 265. <https://doi.org/10.3390/md17050265>
- Wang, Q., Wang, H., Yan, H., Tian, H., Wang, Y., Yu, W., Dai, Z., Chen, P., Liu, Z., Tang, R., Jiang, C., Fan, S., Liu, X., & Lin, X. (2022). Suppression of osteoclast multinucleation via a posttranscriptional regulation-based spatiotemporally selective delivery system. *Science Advances*, 8(26), 3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn3333>
- Webster, H. (2025). Piezo1 as a therapeutic target for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 21(3), 127. <https://doi.org/10.1038/s41584-024-01215-4>
- Williams, K. M., Leser, J. M., Gould, N. R., Joca, H. C., Lyons, J. S., Khairallah, R. J., Ward, C. W., & Stains, J. P. (2020). TRPV4 calcium influx controls sclerostin protein loss independent of purinergic calcium oscillations. *Bone*, 136(1), 115356. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115356>

- Winkler, D. G., Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J. E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B. R., Staehling-Hampton, K., Appleby, M., Brunkow, M. E., & Latham, J. A. (2003). Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO Journal*, 22(23), 6267–6276. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg599>
- Xia, Y., Inoue, K., Du, Y., Baker, S. J., Reddy, E. P., Greenblatt, M. B., & Zhao, B. (2022). TGF β reprograms TNF stimulation of macrophages towards a non-canonical pathway driving inflammatory osteoclastogenesis. *Nature Communications*, 13(1), 3920. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31475-1>
- Yao, Q., Yu, C., Zhang, X., Zhang, K., Guo, J., & Song, L. (2017). Wnt/ β -catenin signaling in osteoblasts regulates global energy metabolism. *Bone*, 97(1), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.028>
- Zhang, M., Xie, Y., Zhou, Y., Chen, X., Xin, Z., An, J., Hou, J., & Chen, Z. (2019). Exendin-4 enhances proliferation of senescent osteoblasts through activation of the IGF-1/IGF-1R signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516(1), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.112>
- Zhu, S., Chen, W., Masson, A., & Li, Y.-P. (2024). Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discovery*, 10(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41421-024-00689-6>