



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina
Instituto de Fisiología



Laboratorio de Biología Celular
CIBIOR – IMSS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A SOBRE LA
SECRECIÓN VESICULAR MEDIADA POR SV2A DE LA LÍNEA CELULAR DE
CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231**

Tesis para obtener el grado de:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Juan Carlos Espinoza Zepeda

Directora:

D.C. Maricruz Anaya Ruíz

Co-Directora:

D.C. Amira Del Rayo Flores Urbina

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la doctora Maricruz por haberme permitido formar parte de su increíble equipo de trabajo en el Laboratorio de Biología Celular en el CIBIOR, siempre dándome confianza y seguridad para realizar mis proyectos personales y profesionales. Por creer, apoyar, impulsar y dirigir este proyecto que iniciamos con entusiasmo y motivación.

Gracias a la doctora Amira, quien hizo posible mi estancia en el CIBIOR, que con su confianza e incondicional disposición apoyó en todo momento en la administración de este trabajo. También por su apoyo e interés en beneficio de mejorar mi formación académica en el Instituto de Fisiología. A la doctora Lupita que incondicionalmente me apoyó en mis experimentos, guiando y aconsejando sabiamente en todo momento. Gracias por su paciencia, enseñanzas, y su muy valiosa amistad. A Evoli por permitirme aprender de sus conocimientos incluyéndome en sus trabajos y proyectos, por alentar este trabajo al que aportó tanto conocimiento y auxilio cuando lo necesitaba. Mi ejemplo de liderazgo y trabajo en equipo; mi mentora y una gran amiga. A la doctora Dalia del laboratorio de Oncoinmunología por su apoyo incondicional en la planeación y ejecución del trabajo de citometría de flujo, así como a Frida, por su apoyo y amable disposición para instruirme en el uso del citómetro de flujo. Al doctor Lenin por su amable apoyo en programación para realizar el trabajo estadístico. A la doctora Paola del Laboratorio de Bioquímica Metabólica por su enseñanza en la biología del cáncer e interés en mi formación profesional.

A Natalia y Midiam, por haberme acompañado en los momentos más confusos y complicados, porque su compañía es la mejor terapia para hacer que cualquier peso sea más ligero. A mi sincero y estimado amigo y compañero, Job, gracias por apoyarme y escucharme. A Fernando, por su invaluable amistad y convertirse en el aliado y equipo ideal, *gracias*. A mis padres por darme la oportunidad de realizar mis estudios y siempre apoyar mis ideas y proyectos a pesar de los obstáculos, por su esfuerzo y dedicación. A mis hermanos, por haber apoyado las decisiones que me han traído hasta aquí, por su confianza e inspiración, *gracias*.

Ahora entiendo que los límites entre el ruido y el sonido son convenciones, todo límite es una convención a la espera de ser sobrepasada, uno puede sobrepasar cualquier convención si acaso logra el concebir en hacerlo.

Cloud Atlas, 2012

ÍNDICE

ÍNDICE	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
Cáncer de Mama y Subtipos Moleculares.....	6
Cáncer de Mama Triple Negativo.....	9
Microambiente Tumoral	11
Exosomas Como Mensajeros Celulares	12
ANTECEDENTES	15
Secreción Exosomal y Comunicación en Cáncer	15
SV2A y Secreción Vesicular	16
Toxina Botulínica Tipo A (BoNT/A)	18
JUSTIFICACIÓN	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPÓTESIS CIENTÍFICA	21
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Evaluación del Efecto Citotóxico de BoNT/A en los Cultivos Celulares.	22
Determinación de Cambios en la Viabilidad Celular Generados por BoNT/A. ...	23
Evaluación del Efecto Apoptótico/Necrótico de BoNT/A.	23
Identificación de las Poblaciones Celulares CD9 ⁺ , CD63 ⁺ y CD81 ⁺ de los Cultivos Interactuados con BoNT/A a 48 horas.	24
Evaluación de Exosomas del Sobrenadante de los Cultivos Interactuados con BoNT/A por 48h.	26
Cuantificación de Proteínas Totales del Sobrenadante de las Células Interactuadas con BoNT/A por 48h.	29
RESULTADOS	30
La BoNT/A no Afecta la Integridad de la Membrana de las Líneas Celulares MDA-MB-231 y U-87 MG.	30

BoNT/A induce cambios en la morfología de las células después de 48 horas de interacción.	31
La Concentración de 2.5 U/mL de BoNT/A no Induce Muerte Celular Programada en los Cultivos Celulares.....	34
La expresión de Marcadores Exosomales a Nivel Intracelular no Cambia Después de la Interacción con BoNT/A.	36
La Interacción de los Cultivos Celulares a BoNT/A no Cambia la Complejidad ni el Tamaño de las Células.	39
Identificación de Poblaciones Exosomales CD9, CD63 y CD81 de los Sobrenadantes de la línea MDA-MB-231 Después de la Interacción con BoNT/A.	41
La Interacción de las Células con BoNT/A Disminuye la Cantidad de Proteínas Secretadas al Medio.....	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA	49

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las principales causas de mortalidad en mujeres y se caracteriza por el uso de exosomas como mecanismos de supervivencia y diseminación. Estos exosomas transportan proteínas, lípidos y material genético que promueven la formación de nichos metastásicos, la resistencia a fármacos y la evasión inmunitaria. La proteína SV2A, sobreexpresada en diversos tipos de cáncer incluidos colon, próstata y mama, se relaciona con la liberación vesicular y potencia la capacidad metastásica de las células tumorales. La toxina botulínica tipo A (BoNT/A), que ingresa a través de SV2A y escinde SNAP-25, interfiere en la liberación de vesículas sinápticas, lo que sugiere un posible vínculo entre los mecanismos neuronales y la progresión tumoral. Nuestro grupo de investigación ha confirmado la presencia de SV2A en líneas celulares de cáncer de mama, próstata y cerebro, así como en un modelo preclínico de cáncer de mama en ratones BALB/c. Se estudió el papel de SV2A en la progresión tumoral y el efecto de la BoNT/A (como ligando de SV2A) sobre el aumento de la masa tumoral y la sobreexpresión de esta proteína.

En el presente trabajo se evaluó la secreción exosomal al medio de los cultivos de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 y una línea control U-87 MG tras la interacción con BoNT/A a 48 horas, interactuando los cultivos con 2.5, 3.5 y 5 U/mL de BoNT/A. Los resultados demuestran que estas concentraciones de BoNT/A carecen de potencial citotóxico y del potencial para inducir muerte celular programada o necrosis. Además, se observó que a partir de 2.5 U/mL se generaron cambios morfológicos en ambas líneas celulares a partir de las 24 horas de interacción, cambios que se asemejan a la transdiferenciación tumoral. Igualmente se observaron cambios en la concentración de proteínas totales en el sobrenadante de la línea MDA-MB-231 cuando se interactúa con BoNT/A por 48 horas. Sin embargo, la interacción con BoNT/A a 48 horas no genera cambios en la expresión de los marcadores exosomales CD9, CD63 y CD81 de forma intracelular ni en los exosomas secretados al medio.

Estos resultados concuerdan con distintos autores sobre la función de BoNT/A como agente inductor de transdiferenciación celular, pero no sustentan la hipótesis del papel de BoNT/A como regulador de secreción de microvesículas del tipo exosomal en dos líneas celulares que expresan SV2A.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de Mama y Subtipos Moleculares

La mama es el órgano encargado de producir leche materna durante la lactancia, proceso en el que participan diferentes tipos de células especializadas. En el tejido glandular mamario, se encuentran células epiteliales de tipo basal y luminal. Las células basales son del tipo mioepitelial y se localizan en la parte externa de los ductos colectores, realizando la función de soporte estructural y contráctil, ayudando en la expulsión de la leche gracias a sus propiedades contráctiles. Las células lumbales, ubicadas en la parte interna de los ductos, son las responsables directas de la síntesis y secreción de los componentes de la leche.

Las células lumbales tienen un proceso continuo de renovación, ya que su vida útil es relativamente corta, con un ciclo de renovación estimado de 2 a 3 semanas. Este recambio celular es crucial para mantener la salud y funcionalidad de la glándula mamaria (figura 1) (Harbeck et al., 2019).

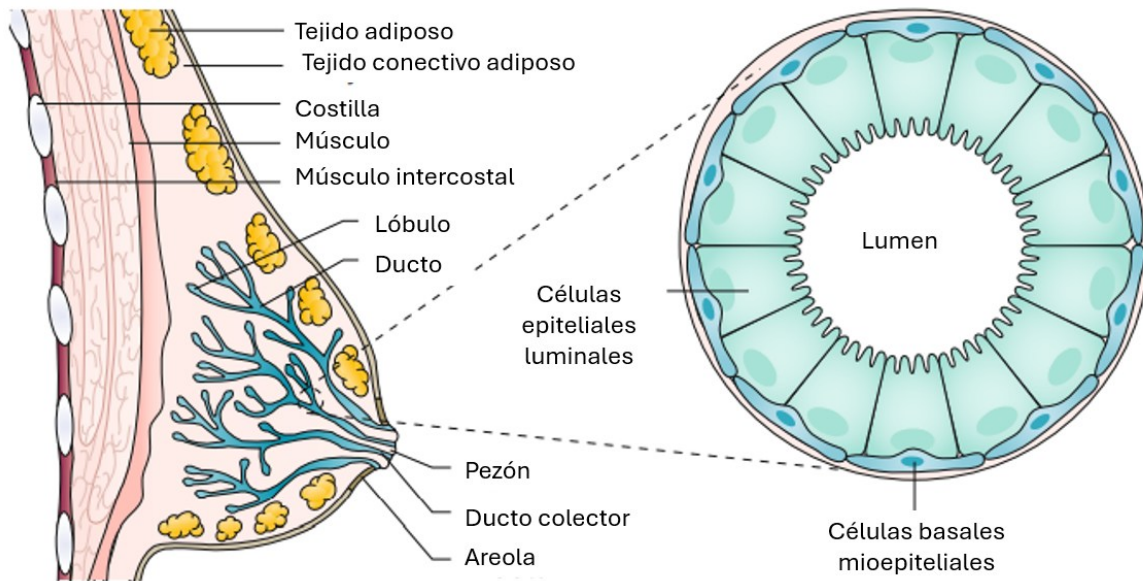


Figura 1. Esquema de la anatomía de la mama. Las células del lóbulo se encuentran en la parte más interna de la mama, produciendo y secretando la leche hacia los ductos y secretarla por el pezón. Las células de los ductos se conforman de células epiteliales luminales en la parte interna del ducto y de células basales mioepiteliales alrededor del ducto que ayudan en la contracción del ducto promoviendo la eyección de la leche hacia el pezón. Tomada y traducida de Harbeck et al., 2019 (Harbeck et al., 2019).

El desarrollo del cáncer proviene de las mutaciones genéticas que adquieren las células, que provocarán la formación de oncogenes que generarán un desequilibrio en la expresión y función de las proteínas, este desequilibrio se lleva hasta los procesos biológicos y fisiológicos vitales de la célula, alterando de esta manera el control del ciclo celular, proliferación, metabolismo, comunicación celular, entre otras, que den paso a la formación de células malignas que inician la formación de tumores (A. Weinberg, 2014).

El cáncer de mama suele originarse en las terminales lobulares de los ductos colectores, donde las células luminales y basales pueden experimentar cambios en su estructura y comportamiento, desencadenando el desarrollo de células malignas que afectan el tejido mamario (Harbeck et al., 2019).

El cáncer de mama está clasificado según los marcadores que presente en tinciones de inmunohistoquímica, esa clasificación es luminal A, luminal B, HER2⁺ y triple negativo, el grado de agresividad del cáncer es de bajo grado a alto grado

respectivamente, el tipo luminal A es positivo a receptor de estrógenos (RE⁺), receptor de progesterona (RP⁺) y negativo al receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER2⁻), el tipo luminal B es RE⁺, RP⁺ y HER2⁺, el tipo HER2⁺ es RE⁻ o bajo, RP⁻ o bajo y HER2⁺ (figura 2). El cáncer de mama triple negativo es un tipo de cáncer que no expresa ninguno de los tres marcadores (RE⁻, RP⁻, HER2⁻), y del que se pueden identificar otros marcadores que indiquen el subtipo basal a través de las citoqueratinas (CK5/6, CK14, CK17) (Cárdenas S. et al., 2023). El cáncer de mama triple negativo es uno de los más agresivos e invasivos dada su característica del tipo de células basales del ducto mamario, estas características basales tienen una alta actividad proliferativa y baja diferenciación celular, que se relaciona con su constante división celular, además de ser de los que tienen mayor reincidencia después del tratamiento y una mayor capacidad invasiva en otros órganos.

Subtipo	Aproximación por IHQ
Luminal A	RE +, RP >20%, Ki 67 <20% GH 1 o 2 y HER2 -
Luminal B	(HER2 -) RE +, HER2 -, RP <20% o Ki 67 >20% GH 3
Luminal B	(HER2 +) RE +, HER2 +, RP y Ki 67 cualquier valor
HER2	HER2 +, RE - y RP -
Triple negativo	RE -, RP - y HER2 -

GH: grado histológico.

Figura 2. Clasificación histológica del cáncer de mama por inmunohistoquímica (IHQ). La clasificación por marcadores hormonales se acompaña de la evaluación de los marcadores de proliferación HER2 y Ki 67, este último se descarta de la IHQ dado que su evaluación histológica previa a la IHQ indica un alto grado de proliferación celular. Tomado de Consenso Mexicano Sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario (Cárdenas S. et al., 2023).

El cáncer de mama es uno de los cánceres más prevalentes en la población femenina y la principal causa de muerte por enfermedad en mujeres en México y el resto de los países (Bray et al., 2024), según informa el GLOBOCAN e informes nacionales, es considerado uno de los tipos de cáncer que tienen una mayor tasa de mortalidad en el mundo, y del cual se espera que aumente la incidencia en este tipo de cáncer en un 40% y su tasa de mortalidad un 50% para el 2040 (Arnold et al., 2022; Sung et al., 2021; Yazmín Lizeth Martínez Sánchez, 2022).

Cáncer de Mama Triple Negativo

El cáncer de mama triple negativo (TNBC por sus siglas en inglés) tiene una prevalencia del 8 al 13% de los casos totales. Su relevancia clínica radica en su alta agresividad, invasividad y por ser el más frecuente en mujeres de menos de 55 años, teniendo una tasa de supervivencia a 5 años es del 12% cuando ha realizado metástasis a otros órganos, 65.8% cuando ha realizado metástasis local (ganglios linfáticos y tejidos cercanos al tumor primario) y de 91.3% cuando es un tumor localizado (in situ) (Adrada et al., 2023).

Sí bien el TNBC se denomina triple negativo por la ausencia de receptores hormonales y de proliferación (ER⁻, PR⁻ y HER2⁻) este suele denominarse también como cáncer de mama del tipo basal, aunque estos no son sinónimos. El cáncer de mama del tipo basal se identifica por sus características genéticas (mutaciones) relacionadas con un perfil celular basal-mioepitelial de la mama, que frecuentemente muestran inestabilidad genética y mutaciones en los genes *TP53* y *BRCA*. Dentro de la clasificación genética de los TNBC están el tipo basal, mesenquimal, troncal del tipo mesenquimal, inmunomodulador y de receptor a andrógenos luminal.

El TNBC posee un perfil metastásico más agresivo que el resto de sus clasificaciones dada su capacidad de realizar metástasis en otros órganos como hígado, pulmón, cerebro y hueso, donde el ajuste de los tratamientos dependerá

del órgano afectado, en el caso de metástasis en cerebro y hueso se opta por tratamiento con radioterapia continua.

Existen terapias de primera, segunda y tercera línea para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo para los casos nuevos y recurrentes. Aquí una descripción de las tres líneas de tratamiento:

- Tratamiento de Primera Línea: Monoterapia continúa conjugada con quimioterapia se indica para reducir la toxicidad del tratamiento. La poliquimioterapia se considera solo en casos en los que se requiere una respuesta rápida dado el estado crítico del paciente.

- Tratamiento de Segunda línea: En caso del fracaso del uso de la primera línea de tratamiento o la recurrencia de nuevos tumores, se indica el uso de inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) como olaparib.

- Tratamiento de tercera línea: en casos de metástasis se indica el uso de eribulina para aumentar la supervivencia en pacientes con TNBC que recibieron otros tratamientos.

Actualmente existen nuevas opciones de tratamiento que han demostrado su efectividad y beneficio para los pacientes con TNBC. Aunque actualmente se cuenta con un limitado acceso de estas terapias en países en vías de desarrollo.

- Inmunoterapia: la quimioterapia combinada con pembrolizumab mejora la supervivencia global y la supervivencia sin progresión de la enfermedad en aquellos TNBC positivos para PD-L1.

- Inhibidores de la PARP: En los TNBC con mutaciones en *BRCA* se ha observado una extendida PFS cuando se tratan con olaparib y talazoparib.

- Anticuerpos conjugados: el uso de scituzumab-govitecan en etapas avanzadas del TNBC ha demostrado una mejora en OS y PFS.

Microambiente Tumoral

Las células tumorales son portadoras de mutaciones y moléculas inestables o peligrosas para las células que se encuentren alrededor de ésta. Las células tumorales necesitan de la comunicación bidireccional entre ellas y el estroma para el beneficio de su desarrollo y supervivencia en el organismo, ya que el estroma se conforma de tejido conectivo, células del sistema inmune innato (Células dendríticas, macrófagos M1 y M2) y adaptativo (linfocitos T CD4+, CD8+, CD25+) fibroblastos y células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos. Esta interacción entre el estroma y las células tumorales se concibe como microambiente tumoral (TME), en el que las células tumorales mantienen interacciones con su entorno para sobrevivir y proliferar, en cambio, las células del estroma retroalimentan esta simbiosis con la secreción de proteínas que promueven el crecimiento y la división celular. Por lo tanto, la evolución tumoral depende de las células que participan en este microambiente tumoral (Lim et al., 2018).

El TME puede transformarse fácilmente a un TME pro-tumorigénico mediante la inducción de anergia de las células inmunes, dando paso a la formación de macrófagos asociados a tumor (TAM), de fibroblastos asociados a cáncer (CAF), la reprogramación metabólica de las células más internas del tumor y la hipoxia, que estimulará la progresión tumoral de distintas maneras. En el microambiente pro-tumorigénico, los TME tienen la capacidad de cambiar su fenotipo pro-inflamatorio (M1 TAM), en donde estimulan la respuesta inflamatoria y la supresión de tumor a través de las citocinas, a un fenotipo antiinflamatorio (M2 TAM) el cual promueve el crecimiento tumoral mediante el remodelando del tejido circundante. Además, los CAFs son capaces de secretar vesículas y factores de crecimiento que ayuden a la proliferación de células tumorales, al igual que la secreción de proteínas que remodelen la matriz extracelular (ECM) y la expansión del tumor a vasos sanguíneos cercanos al tumor, así como la promoción de la angiogénesis mediante la secreción de citocinas necesarias para este proceso (VEGF, FGF e IL-6) (Benavente et al., 2020).

El tipo de comunicación que se da en el microambiente tumoral es mixta; desde la señalización con metabolitos, citocinas y quimiocinas hasta la interacción dependiente de contacto célula a célula, y los efectos que estas señales puedan tener sobre el desarrollo del tumor pueden ser benéficos o negativos para las células tumorales, este efecto dependerá de las capacidades de las células tumorales para promover su proliferación, evadir la respuesta y reconocimiento inmune y de su resistencia a las terapias antitumorales. Una forma de comunicación celular más compleja y sofisticada es a través de los exosomas, nanovesículas originadas por la célula que se liberan al espacio extracelular con contenido de la célula como material genético y proteínas. Estas vesículas pueden actuar como mensajeros celulares complejos, ya que además del contenido interno poseen proteínas de señalización en su membrana, con las que pueden ejercer señalización por contacto e internalizar los exosomas para incorporar el contenido a la célula diana. Los exosomas de las células tumorales más internas del tumor, que se encuentran en un estímulo de hipoxia, pueden inducir de manera potencial el microambiente tumoral en pro-tumorigénico, promoviendo la invasión de tejido cercano y la formación de nichos pre-metastásicos que favorezcan la metástasis en órganos distantes, haciendo de los exosomas componentes clave para lograr la invasión y metástasis del cáncer (Meldolesi, 2018; Zhang et al., 2015).

Exosomas Como Mensajeros Celulares

Los exosomas tienen su origen en el endosoma temprano, donde por medio de invaginación membranal se forman vesículas intraluminales (ILV's), las cuales, al invaginarse del endosoma se cargan con proteínas ubiquitinadas, moléculas de DNA y RNA, glúcidos y moléculas pequeñas como metabolitos mediante mecanismos de selección mediados por proteínas de reconocimiento ancladas en su membrana. Posteriormente fusionan su membrana al interior del endosoma temprano, convirtiendo el endosoma en un cuerpo multivesicular (MVB) que contiene diversas ILV's. Después de su formación, los MVB's pueden ser

degradados por vía del lisosoma o secretar su contenido al espacio extracelular. Cuando la membrana del MVB se fusiona con la de la membrana plasmática y libera los ILV's al espacio extracelular, estos son ahora denominados exosomas (figura 3) (Han et al., 2022). En el endosoma temprano se agregan también vesículas de la vía lisosomal que provienen de la degradación de proteínas, igual que de la vía trans-Golgi (TGN). Los exosomas que provienen del TGN expresan proteínas CD63 y CD81 en su membrana, y son usados como biomarcadores de exosomas, mientras que en la vía del endosoma se expresa CD9, igualmente usado como biomarcador exosomal (Andreu & Yáñez, 2014; Kumari & Anji, 2022; McAndrews & Kalluri, 2019). Mediante estos biomarcadores es posible estimar el origen biogénico de los exosomas (endosoma, TGN y RER), el cual serviría para clasificar estas poblaciones y buscar proteínas o material genómico de interés. En el proceso de la selección del cargo de los ILV's también participan activamente el retículo endoplásmico rugoso (RER) y el aparato de Golgi, que transportan sus cargos hacia el endosoma temprano para posteriormente transferirlo a las ILV's (de Jong et al., 2012). Aunque se desconoce en mayor parte el motivo de su origen y función, ha demostrado tener efectos importantes en células distales del sitio de origen de los exosomas, como inductores de cambios morfológicos, el ciclo celular, señalización celular, motilidad, regulación del estrés y síntesis y transcripción de proteínas. Puesto que la membrana de los exosomas proviene del endosoma, aparato de Golgi, RER y del lisosoma, esta es rica en esfingomielina y fosfatidilinositol, además de proteínas. Dicha composición de su membrana les confiere a los exosomas resistencia a cambios drásticos de pH y de la presión hidrostática en circulación sanguínea (Al-shubaily & Al-Zahrani, 2021; J. Dai et al., 2020; Taylor & Shah, 2015). Estas características de naturaleza celular le permiten a los exosomas viajar por el sistema circulatorio, capilares, cruzar la barrera hematoencefálica y el sistema linfático sin ser reconocidas como antígeno o patógeno puesto que su membrana lipídica y proteínas de membrana son reconocidas como propias, permitiéndoles llegar a tejidos lejanos de su sitio de origen hasta ser reconocidas por la célula diana (Krylova & Feng, 2023; Mashouri et al., 2019; Meldolesi, 2018; Shaabani et al., 2023).

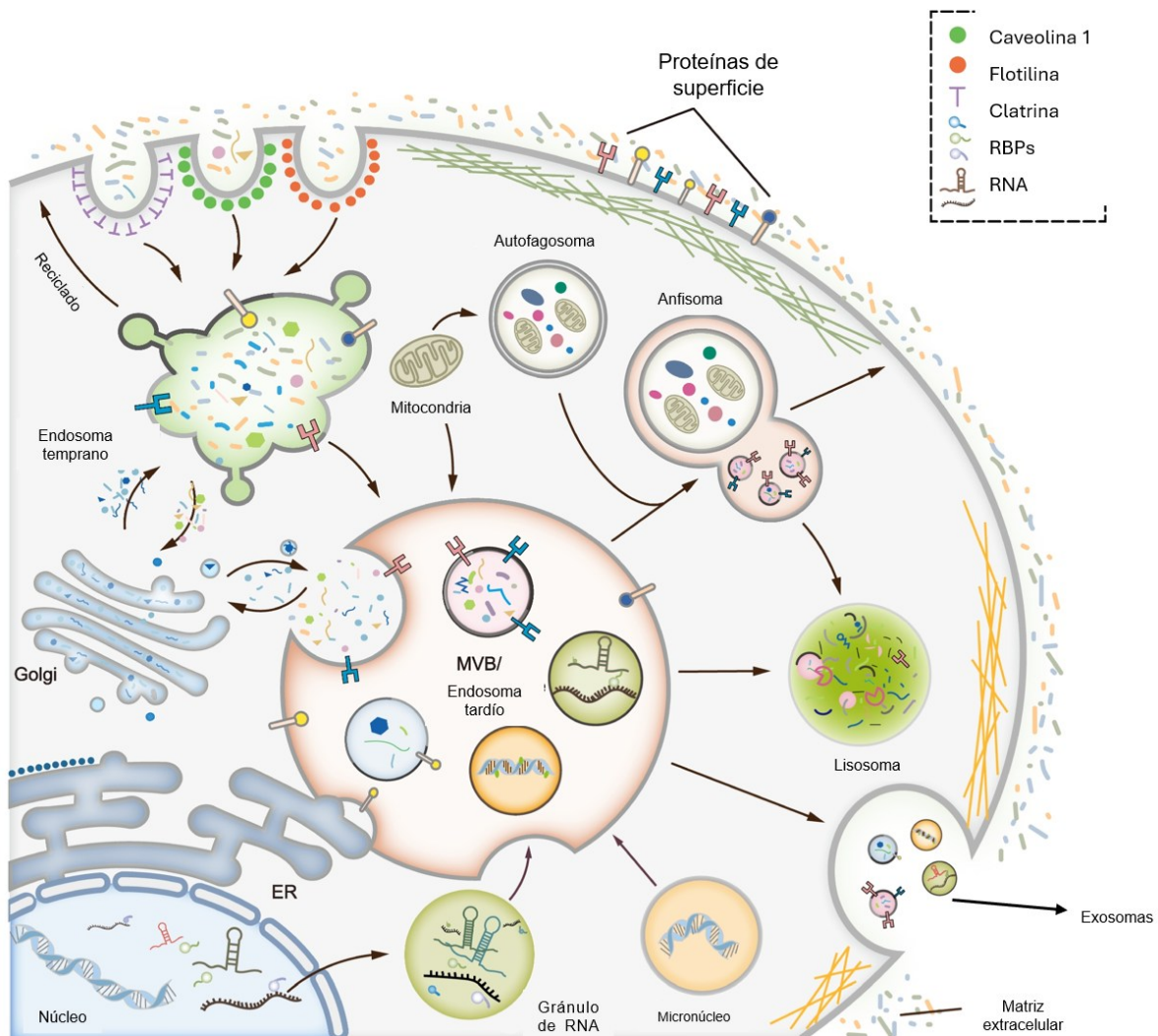


Figura 3. Biogénesis y secreción de exosomas. Del endosoma tardío se forma el cuerpo multivesicular (MVB) por la invaginación de su membrana, formando las vesículas intraluminales (ILV) al interior de este llevando contenido del retículo endoplásmico (ER), aparato de Golgi, mitocondria, DNA, RNA y proteínas de unión a RNA, posteriormente puede continuar la secreción de exosomas por fusión de membrana con la membrana plasmática o junto con productos del anfisoma, o degradarse en el lisosoma. Tomada y traducida de Han et al., 2022 (Han et al., 2022).

La captura e internalización de los exosomas en la célula diana no es un proceso aleatorio, sino que se media por interacción ligando-receptor de proteínas de membrana; tetraspaninas e integrinas, así como su liberación se da en las regiones celulares ricas en actina, como la invadopodia de las células tumorales. Su papel de señalización en la célula diana puede ser yuxtacrina, internalización

por fagocitosis, vía clásica de fusión de membranas, macropinocitosis y mediada por caveolinas y clatrininas.

El cargo exosomal (contenido de estas microvesículas) tiene la capacidad de ejercer cambios en los procesos celulares, ya que la mayoría del cargo de esta proviene del RER son moléculas activas del tipo microRNA (miRNA), small-interference RNA (siRNA), long-non-coding RNA (lncRNA), messenger RNA (mRNA) y complementary DNA (cDNA), así como proteínas monoubiquitinadas, lípidos y componentes del citoesqueleto (14). Este cargo exosomal es capaz de efectuar e interferir de manera relevante sobre los diversos procesos fisiológicos de la célula diana, dado que parte del cargo exosomal es material genético, los exosomas podrán alterar la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo, ciclo y fenotipo celulares. Los cambios que este logre generar en la célula diana dependerán de las condiciones fisiológicas o fisiopatológicas en la que la célula originó el exosoma (Jong et al., 2012; Wang et al., 2023; Xu et al., 2023).

ANTECEDENTES

Secreción Exosomal y Comunicación en Cáncer

La secreción de los exosomas del MVB se apoya de las proteínas que también participan en la secreción de vesículas sinápticas; con la presencia de sinaptotagmina, el complejo v-SNARE (sinaptobrevina y Rab3) en la membrana de sus vesículas y la presencia proteínas del complejo t-SNARE (syntaxina, SNAP-25 y SNAP-23). La Secreción de ambos tipos de vesículas es igualmente dependiente del aumento de calcio intracelular (Ca^{2+}) para que los complejos V-SNARE y T-SNARE fusionen las membranas de ambos tipos vesiculares y liberen su contenido al espacio extracelular (Liu et al., 2023; Ramirez & Kavalali, 2012).

Se ha demostrado que los exosomas se secretan en mayor proporción y ritmo en células que se encuentran en condiciones fisiopatológicas, como en enfermedades

crónicas (p.ej. cáncer, enfermedades neurodegenerativas, etc.). El cargo de los exosomas de las células tumorales tiene un potencial oncogénico sobre las células diana e influye altamente sobre el microambiente tumoral, debido a que promueve la formación de nichos pre-metastásicos, invasión, progresión tumoral, metástasis y como evasores de la respuesta inmune antitumoral.

De acuerdo la teoría genometastásica, la cual estipula el proceso de transferencia de oncogenes de células cancerosas a células susceptibles y saludables localizadas en órganos distantes a través del sistema circulatorio (24), el cargo exosomal de las células tumorales tiene un potencial oncogénico sobre las células diana e influye directamente sobre el microambiente tumoral, que promueve la formación de nichos pre-metastásicos, invasión, progresión tumoral, metástasis y como evasores de la respuesta inmune antitumoral (Alnefaie, 2021; Paskeh et al., 2022).

Los exosomas derivados de las células de cáncer de mama triple negativo son capaces de preparar nichos pre-metastásicos en pulmones y cerebro, promover la angiogénesis, alterar el metabolismo de los adipocitos cercanos al tumor primario para obtener leptina y factor 1 de crecimiento de tipo insulina (ILGF1), inducir el fenotipo M2 de los TAM y conferir características malignas a otras células epiteliales no tumorales. Mientras que los que derivan de los CAFs tienen la capacidad de inducir metástasis mediante la estimulación de la transición epitelio mesenquimal (EMT) y la producción de proteínas anti apoptóticas. Además, los exosomas derivados de CAFs y las células troncales de cáncer pueden inducir resistencia a quimioterapia en las células tumorales por medio de ncRNA que promueva la síntesis de proteínas transportadoras de fármacos (Groza et al., 2020; Kahlert & Kalluri, 2013).

SV2A y Secreción Vesicular

La glicoproteína de vesícula sináptica 2A es una proteína transmembranal que tiene un papel crucial para el sistema nervioso central, ya que se ha propuesto su

participación en procesos de regulación de la liberación de neurotransmisores en las terminales presinápticas, debido a su elevada expresión en este sistema, se usa como biomarcador principal para medir las densidades sinápticas encefálicas, en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas (Rossi et al., 2022).

Su estructura se conforma de 12 dominios transmembrana, con dos asas, una extravesicular que se forma entre los dominios transmembrana 6 y 7 y el otro intraluminal entre los dominios 7 y 8. El asa extravesicular es responsable de la unión a neurotoxinas como toxina botulínica y tetánica, cuando el SV2A se encuentra en la membrana plasmática por la fusión de la membrana vesicular en el proceso de liberación de neurotransmisores expone el asa intraluminal y la unión de las neurotoxinas al SV2A, internalizándolas en el proceso de reciclaje de membrana, esta internalización provoca una inhibición de la liberación de neurotransmisores en la terminal presináptica. Su dominio extravesicular tiene ambos extremos amino terminal y carboxilo terminal, en el amino terminal se encuentra el sitio de unión a sinaptotagmina, una proteína transmembrana de vesículas sinápticas encargada de censar los niveles intracelulares de iones de calcio provocando un cambio conformacional entre SV2A, sintaxina y SNAP-25, para permitir la fusión de ambas membranas y liberar el contenido vesicular al espacio extracelular (Löscher et al., 2016; Shetgaonkar et al., 2022).

Se ha evidenciado la presencia de SV2A en biopsias de cáncer de colon y próstata, igual que en líneas celulares tumorales de cáncer de mama, como T-47D y MDA-MB-231. Se ha sugerido que la presencia de SV2A en estos tumores y líneas celulares estaría relacionado con un perfil neuroendocrino, en el que sus células tienen un fenotipo similar al de células neuroendocrinas; secretan hormonas y neurotransmisores. Este perfil neuroendocrino ha sido clínicamente clasificado como tumores de alto grado de malignidad (Alfredo Cortés et al., 2017; Guan et al., 2021). Además, las proteínas involucradas en los mecanismos de secreción de vesículas sinápticas y los MBV's son idénticas (Yakovlev, 2023), lo que sugeriría que la participación de SV2A no solo se ve limitada a la regulación

de la liberación de vesículas sinápticas, sino que también en la liberación de exosomas al medio extracelular.

Toxina Botulínica Tipo A (BoNT/A)

La toxina botulínica es una neurotoxina producida por *Clostridium botulinum*, puede producirse en ocho isoformas; tipo A a H. La BoNT/A tiene una cadena ligera de ~50kDa y una pesada de ~100kDa unidas entre sí por un enlace disulfuro, la actividad proteasa de esta reside en la cadena ligera la cual escinde a las proteínas SNAP-25, mientras que la cadena pesada de BoNT/A se une a SV2A en la membrana celular para anclar a la toxina y mediar su entrada a la célula junto con gangliósidos tipo GT1b en la membrana. Con las proteínas SNAP-25 escindidas no habrá interacción con la sinaptobrevina de la vesícula, lo que inhibirá su fusión con la membrana plasmática y en consecuencia bloqueando la secreción vesicular (Dong et al., 2006, 2008).

JUSTIFICACIÓN

En las últimas dos décadas se ha demostrado ampliamente la función de los exosomas como mecanismo único y complejo de comunicación celular que llevan información de la célula origen a una célula diana en un órgano o tejido diferente. Se ha reportado continuamente la alta actividad secretora de exosomas de las células malignas, donde los hallazgos sugieren que desempeñan un papel importante para las células malignas y sus mecanismos de supervivencia, evasión de la respuesta inmune, resistencia a fármacos, progresión tumoral, generación de nichos pre-metastásicos, transformación de células sanas a pre-malignas, transferencia de oncoproteínas y mantenimiento del microambiente tumoral.

Algunas de las principales causas de muerte en pacientes con cáncer de mama es el fracaso de los tratamientos, los grados avanzados en los que se detecta la enfermedad y las metástasis, procesos en donde se ha observado la importante participación de los exosomas.

Es necesaria la búsqueda de nuevas terapias adyuvantes para disminuir las principales causas de muerte, entre ellas terapias que frenen las tasas de secreción exosomal de las células malignas, cuyo objetivo sea ralentizar el desarrollo del cáncer esperando una respuesta exitosa con las terapias elegidas. Por ello, consideramos importante investigar la actividad que tiene SV2A sobre la secreción de exosomas al usar BoNT/A un fármaco que escinde proteínas de secreción vesicular. Esto permitiría identificar la participación de SV2A sobre la secreción de exosomas en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, donde se han reportado altos niveles de expresión de esta proteína, al igual que nos permitiría relacionar los niveles de expresión de SV2A y la cantidad de exosomas secretados al espacio extracelular en estas líneas celulares.

A su vez, el presente estudio permitirá situar a BoNT/A como posible candidato a reposicionamiento de fármacos de futuras investigaciones que tengan como objetivos el diseño de nuevas terapias adyuvantes, ideadas para frenar la progresión tumoral y mejorar la efectividad de los tratamientos de elección para pacientes con cáncer de mama triple negativo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el tercer trimestre del año pasado se registraron 2,261,000 nuevos casos de cáncer de mama en todo el mundo y se espera que para 2040 la incidencia de casos nuevos aumente 40% y la mortalidad aumente 52%, y se espera que estas cifras aumenten para la próxima década (1). En México se estimaron cerca de 30,000 nuevos casos de cáncer de mama en el país el año anterior, reportando una mortalidad de cercana 10,000 de estos nuevos casos (2).

El cáncer de mama es una enfermedad crónica considerada prioridad atención en instituciones de salud pública y centros de investigación clínica, puesto que tiene que ser evaluada, diagnosticada y tratada oportunamente para mejorar la calidad de vida del paciente.

El cáncer de mama más prevalente en México es el triple negativo, el cual se caracteriza por la ausencia en la expresión de receptores para estrógenos (ER⁻), progesterona (PR⁻) y el receptor de factor de crecimiento humano (HER2⁻). Al ser negativo a estos tres receptores se considera de peor pronóstico de supervivencia debido a la generación de metástasis en órganos distantes y la recurrencia de tumores resistentes a los tratamientos convencionales.

La migración de las células tumorales a otros tejidos como hígado, cerebro, pulmón y hueso provoca la formación de nichos metastásicos en donde las células proliferan e invaden el tejido hospedero, esto sucede con el apoyo de vesículas extracelulares como los exosomas, secretados en grandes cantidades por las células tumorales en los diferentes estados de la enfermedad.

Los exosomas liberados por células tumorales pueden crear nichos pre-metastásicos en distintos órganos, favorecer la invasión tumoral e inmunosuprimir al huésped al inhibir linfocitos T y NK, induciendo su muerte y promoviendo la progresión del cáncer. Asimismo, exosomas de cáncer de mama confieren rasgos malignos a células sanas, transforman fibroblastos en fibroblastos asociados a cáncer y fomentan la angiogénesis, la vasculogénesis y la resistencia a terapias antitumorales. En el laboratorio de Biología Celular del CIBIOR, las investigaciones se han enfocado en desarrollar un tratamiento adyuvante contra el cáncer de mama al bloquear la secreción vesicular mediada por SV2A mediante el uso de toxina botulínica A. Dicha proteína (SV2A) facilita la internalización de la toxina botulínica A (BoNT/A), que escinde SNAP-25 dentro de la célula, impidiendo la liberación de vesículas. Este enfoque busca interferir en los procesos de comunicación celular, incluida la liberación de exosomas, que favorecen la progresión tumoral y, con ello, retrasar la diseminación del cáncer.

El presente trabajo plantea evaluar el efecto sobre la inducción de citotoxicidad, apoptosis y necrosis de distintas concentraciones de BoNT/A en cultivos celulares de una línea celular de cáncer de mama triple negativo, además de evaluar los cambios en la expresión de marcadores exosomales y su secreción al medio después de la interacción con BoNT/A, esto con la finalidad de aportar información

acerca del papel de BoNT/A sobre la secreción de microvesículas del tipo exosomal en un sistema *in vitro* que expresa SV2A.

HIPÓTESIS CIENTÍFICA

La escisión de proteínas del complejo SNAP-25 por BoNT/A en la línea celular tumoral MDA-MB-231 disminuye la secreción vesicular de exosomas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de BoNT/A sobre la secreción de exosomas en la línea celular triple negativa de mama MDA-MB-231 después de la interacción con la toxina botulínica tipo A (BoNT/A).

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la viabilidad celular de las células MDA-MB-231 después de su interacción con BoNT/A.
- 2.- Identificar las poblaciones CD9⁺, CD63⁺ y CD81⁺ de las células interactuadas con BoNT/A.
- 3.- Identificar las poblaciones de exosomas CD9⁺, CD63⁺ y CD81⁺ secretadas por las células interaccionadas con BoNT/A.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación del Efecto Citotóxico de BoNT/A en los Cultivos Celulares.

Se utilizaron células de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26), así como una línea celular como control positivo de expresión para SV2A, U-87 MG (ATCC, HTB-14) (Figura 4), para ambas líneas se utilizó el medio de cultivo F12 (56498C, Merk) suplementado al 10% con suero fetal bovino y adicionalmente con 1% de estreptomicina/penicilina para disminuir el riesgo de contaminaciones. Todas las células fueron incubadas en oscuridad a 37°C y 5% de CO₂. Después de 48 horas de incubación e interacción con BoNT/A, las células se desprendieron de las cajas de cultivo con tripsina-EDTA 1X (ATCC, cat. No. 302101) para su uso posterior en los experimentos.

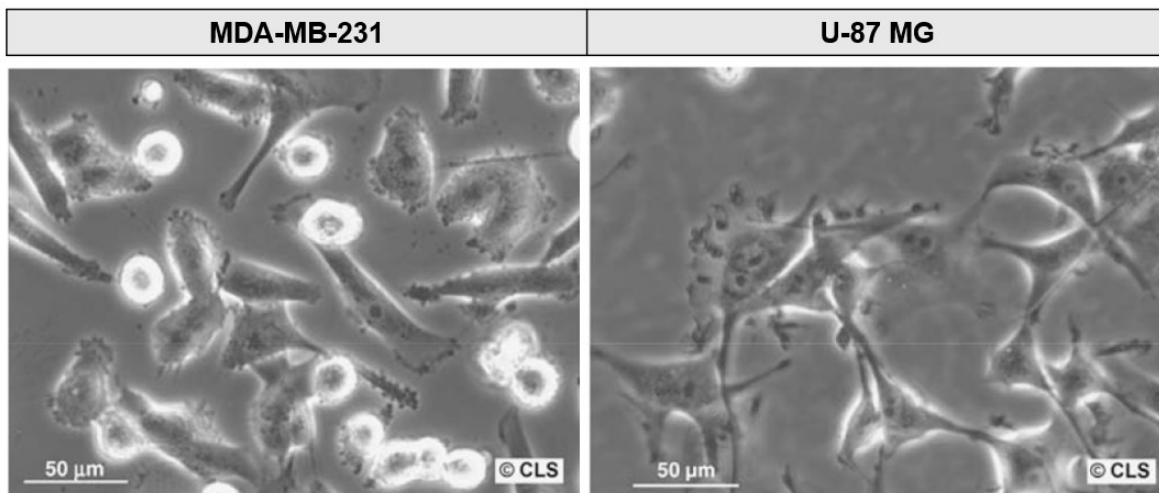


Figura 4. Morfología de líneas celulares MDA-MB-231 y U-87 MG. Tomada de Atlas of Living Cell Cultures., 2013 (Lindl & Steubing, 2013).

La toxina botulínica A BoNT/A se comercializa en forma de administración intramuscular de la marca Dysport® de la farmacéutica IPSEN. Las células se cultivaron en placas de 96 pozos donde se realizó la evaluación de la concentración mínima tóxica de la interacción de las concentraciones de 2.5 U/mL, 3.5 U/mL y 5 U/mL de BoNT/A y solución salina isotónica 0.9%.

Ya que el análisis de exosomas requiere medio de cultivo suplementado libre de exosomas, el medio de cultivo se sometió a un proceso de eliminación de exosomas de la siguiente forma; se suplementó el medio F12 con 20% de suero fetal bovino y se centrifuga a 100,000 x g durante 24 horas a 4°C en vacío. Este procedimiento aseguró la eliminación de vesículas extracelulares como exosomas, ectosomas y debris celulares presentes en el suero. Para su uso en los cultivos se diluyó el medio F12 libre de exosomas (F12-EF) con medio F12 en relación 1:1 y se suplementó con 1% de estreptomicina/penicilina, este medio F12 EF suplementado se utilizó en las interacciones de los cultivos con BoNT/A.

Determinación de Cambios en la Viabilidad Celular Generados por BoNT/A.

El primer ensayo de viabilidad celular se realizó con yoduro de propidio ya que es una técnica sencilla y accesible para descartar aquellas concentraciones de BoNT/A potencialmente tóxicos para los cultivos celulares en los diferentes tiempos de interacción.

Después de la interacción de 48 horas con las distintas concentraciones de BoNT/A se retiró el sobrenadante y se tiñeron las células con 10 μ M de yoduro de propidio durante 10 minutos, posteriormente se observaron en microscopio de epifluorescencia en el filtro rojo, capturando fotografías en 10X y 20X. Las imágenes se procesaron y analizaron con ayuda del software Image J.

Evaluación del Efecto Apoptótico/Necrótico de BoNT/A.

Las células se cultivaron en placas de 6 pozos sometiendo a las mismas concentraciones y tiempos de interacción con BoNT/A para evaluar necrosis y procesos de muerte celular programada (apoptosis).

Se realizó la tinción con FITC-Anexina V y 7-AAD en las células interaccionadas con BoNT/A siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluaron por medio de

citometría de flujo para poder establecer una dosis que no afecte la integridad de la membrana celular ni la viabilidad en un periodo de interacción de 48 horas. Partimos de estos datos para establecer la concentración mínima tóxica que se utilizará en los experimentos subsecuentes. Los resultados se analizaron con ayuda del software FlowJo V10.0 siguiendo el algoritmo descrito en la figura 5.

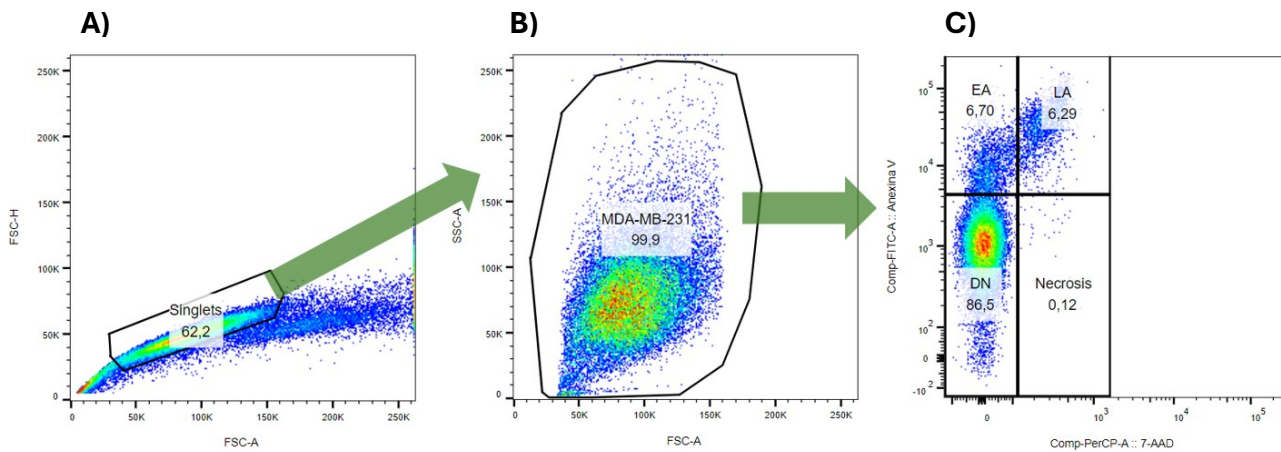


Figura 5. Algoritmo de trabajo para viabilidad celular. Se seleccionan los eventos (células) individuales (A) de eventos dobles y de los debrís, posteriormente se selecciona la población celular de interés (B) para identificar las subpoblaciones de interés (C).

Identificación de las Poblaciones Celulares CD9⁺, CD63⁺ y CD81⁺ de los Cultivos Interactuados con BoNT/A a 48 horas.

Una vez establecida la concentración mínima tóxica de BoNT/A a aplicar a los cultivos celulares se evaluaron los cambios en la expresión de marcadores de exosomas dentro forma intracelular.

Las células fueron incubadas por 48 horas con la concentración mínima tóxica de BoNT/A, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se reserva para los siguientes experimentos.

Las células se sometieron a un protocolo de tinción intracelular estandarizado para identificar 3 marcadores exosomales en los cultivos celulares por medio de

citometría de flujo. Estos se tiñeron con los marcadores CD9 (anti-CD9::V450, cat. No. 658167, BD), CD63 (anti-CD63::PE, cat, No. 556020, BD) y CD81 (anti-CD81::APC-H7, cat. No. 656647, BD).

Después de cosechar las células se lavaron y centrifugaron con 200 μ L de Perm Wash 1X (BD) por 5 minutos a 2,000 rpm.

Se colocaron las muestras en tubos de citometría y se agregaron 100 μ L de Cytofix/Cytoperm (BD) y se incubaron las muestras durante 20 minutos a 4°C.

Pasado el tiempo indicado se lavaron y centrifugaron con 1 ml de Perm Wash (1X) (BD) por 5 minutos a 2000 rpm.

Se agregaron 100 μ L de solución de bloqueo (50% FBS) durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente.

Se lavaron con 1 mL de Perm Wash (1X).

Se aforó el volumen de las células a 50 μ L y se incubaron los anticuerpos conjugados a las siguientes concentraciones:

Fluorocromo conjugado	V450	PE	APC-H7
Anticuerpo	α -CD9	α -CD63	α -CD81
Volumen	5 μ L	1.5 μ L	1 μ L

Se incubaron durante 30 minutos a 4°C resguardadas de la luz.

Se centrifugaron y lavaron dos veces con Perm Wash 1X.

Se centrifugaron y se aforó el volumen a 200 μ L de PBS para adquirir en el citómetro.

Posteriormente, las muestras fueron adquiridas y analizadas en el citómetro de flujo FACS CANTO II (BD Biosciences). Este equipo permite evaluar parámetros físicos como el tamaño celular (FSC-A) y la complejidad estructural (SSC-A). Adicionalmente, se cuantificó la expresión de los marcadores exosomales previamente descritos (CD9, CD63 y CD81), proporcionando información detallada

sobre la población celular y la dinámica de los marcadores exosomales de forma intracelular. Posteriormente los datos se analizaron con ayuda del software FlowJo V10.0 siguiendo el algoritmo de trabajo descrito en la figura 6.

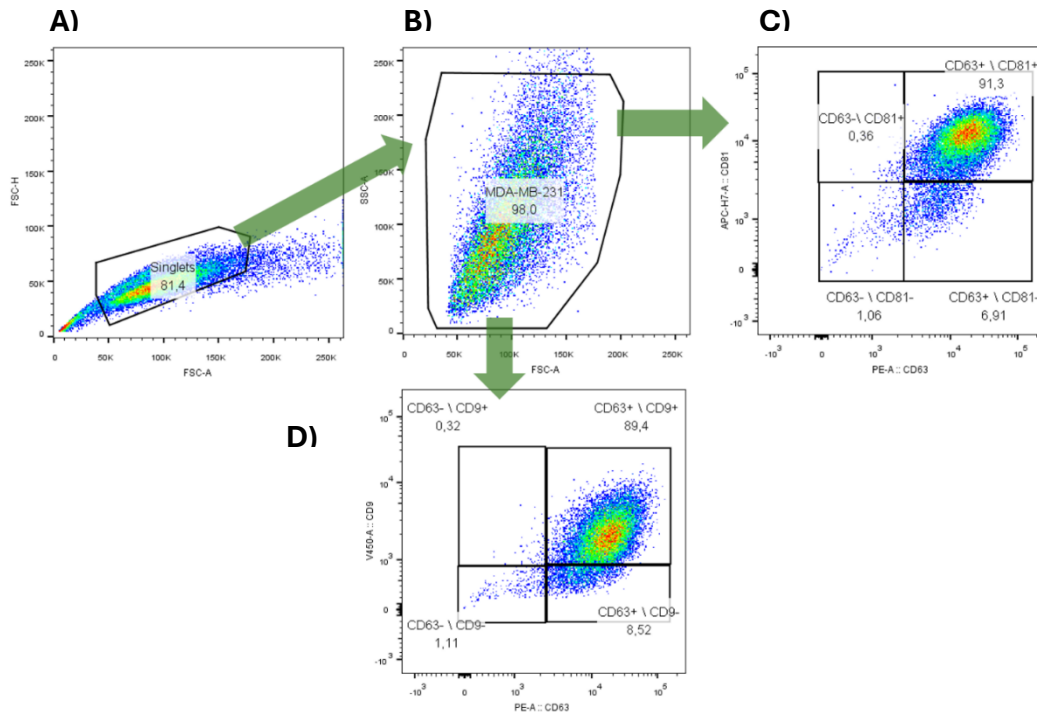


Figura 6. Identificación de las poblaciones celulares CD9⁺, CD63⁺ y CD81⁺. Primero se distinguen los eventos individuales (A) y la población celular de interés (B), posteriormente se identifican las subpoblaciones de marcadores exosomales CD9/CD63 (C) y CD81/CD63 (D).

Evaluación de Exosomas del Sobrenadante de los Cultivos Interactuados con BoNT/A por 48h.

El análisis de exosomas mediante citometría de flujo convencional presenta desafíos debido a su reducido tamaño, que los hace difícilmente detectables con esta técnica. Para superar esta limitación, se emplearon perlas de captura de exosomas, diseñadas con un tamaño adecuado para ser analizadas por este método. Estas perlas están recubiertas con anticuerpos anti-CD63, un marcador

característico de los exosomas, permitiendo su detección específica. En este estudio, se utilizaron perlas de captura de exosomas recubiertas con anticuerpos anti-CD63 (Abcam, cat. No. ab239686) (figura 7). La interacción de estas perlas con los exosomas se basa en una reacción de inmunoafinidad, en la que el anticuerpo anti-CD63 reconoce y se une al antígeno CD63 presente en la superficie de los exosomas. Este procedimiento facilita la unión de los exosomas a la superficie de las perlas, permitiendo así su análisis eficiente mediante citometría de flujo convencional y su caracterización en detalle. (figura 8). Los resultados se analizaron con ayuda del software FlowJo V10.0 siguiendo el algoritmo de trabajo de la figura 6.

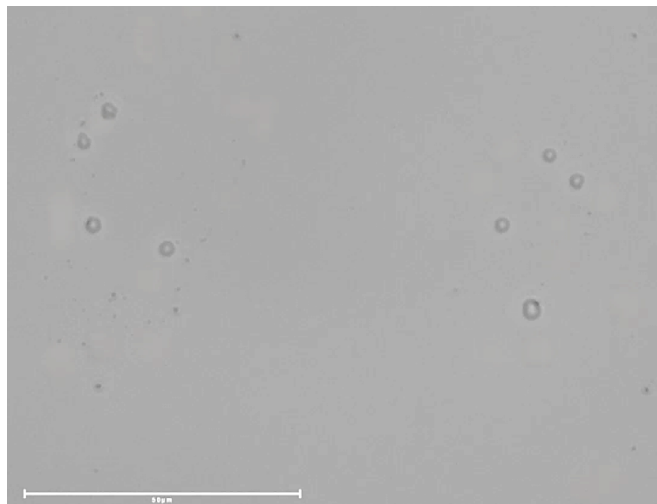


Figura 7. Perlas de captura de exosomas de látex CD63 Exosome Capture Beads, Abcam. Las perlas de captura tienen un radio de 3.25 μm y están cubiertas de anticuerpo anti-CD-63 para reconocer a este marcador en la superficie de los exosomas.

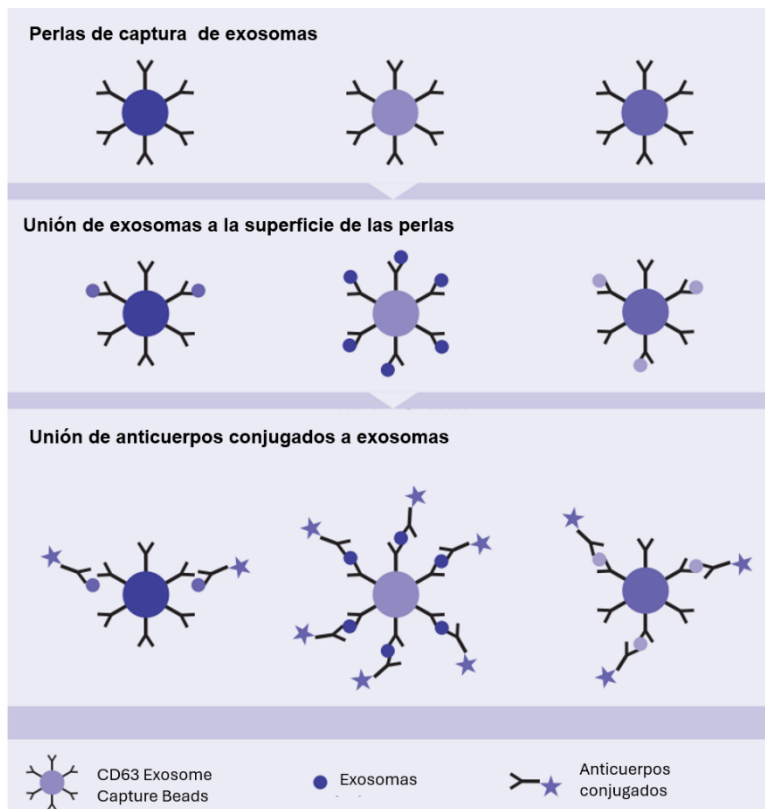


Figura 8. Esquema de preparación de exosomas para su análisis por citometría de flujo. Las perlas de captura de exosomas son micropartículas de poliestireno cubiertas de anticuerpo anti-CD63 (monoclonales, TEA3/18). Estas reconocen a CD63 presente en las membranas de los exosomas anclándolos a la perla por su inmunofinidad. Posteriormente los exosomas acoplados a las perlas de captura se incuban con los anticuerpos conjugados anti CD9, anti CD63 y anti CD81 para evaluarlos por medio de citometría de flujo. Tomada y editada de Miltenyi Biotec.

Se tomaron 100 μ L del sobrenadante recuperado de los cultivos celulares interactuados con BoNT/A y se centrifugaron por 2,000 rpm por 5 minutos a 4°C, posteriormente se transfirieron a un nuevo tubo sin haber tocado el precipitado, se centrifugaron nuevamente a 14,000 X g por 10 minutos a 4°C.

Se recuperaron 50 μ L de la muestra si tocar el precipitado y se transfirieron a un tubo de citometría junto con las perlas de captura siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron las perlas de captura junto con el sobrenadante durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al siguiente día se incubaron los anticuerpos conjugados dirigidos a los marcadores de exosomas en las siguientes concentraciones:

Fluorocromo conjugado	V450	PE	APC-H7
Anticuerpo	α -CD9	α -CD63	α -CD81
Volumen	5 μ L	1.5 μ L	1 μ L

Las perlas acopladas a los exosomas se incubaron durante 2 horas con los anticuerpos conjugados a 4°C y resguardados de la luz.

Posteriormente se realizaron un lavado y centrifugado con PBS 1X a 2500 X g por 5 minutos. Después se agregaron 100 μ L de PBS 1X y se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo. Los datos se analizaron con ayuda del software FlowJo.

Cuantificación de Proteínas Totales del Sobrenadante de las Células Interactuadas con BoNT/A por 48h.

La cantidad de proteínas totales en el sobrenadante de los cultivos celulares tratados con la concentración mínima tóxica de BoNT/A y el medio de cultivo fue cuantificada mediante el método de Bradford. Este análisis se llevó a cabo en placas de 96 pozos, evaluando diferentes condiciones experimentales: medio de cultivo F12, F12 suplementado, F12-EF y el sobrenadante de cultivos celulares expuestos a la concentración mínima tóxica de BoNT/A. El reactivo de Bradford se utilizó a una concentración 2X para asegurar la sensibilidad del ensayo en la detección de proteínas. Posteriormente, para evaluar cambios en el perfil proteico, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), técnica que permite la separación de proteínas según su peso molecular. Los geles obtenidos fueron teñidos utilizando dos métodos complementarios: Coomassie blue, para una detección general de proteínas, y nitrato de plata, reconocido por su alta sensibilidad. Estos enfoques permitieron comparar y analizar diferencias en la composición proteica entre las distintas condiciones experimentales.

RESULTADOS

La BoNT/A no Afecta la Integridad de la Membrana de las Líneas Celulares MDA-MB-231 y U-87 MG.

Se evaluó el efecto citotóxico de las concentraciones 2.5 U/mL, 3.5 U/mL y 5 U/mL de BoNT/A en los cultivos celulares por medio de tinción de yoduro de propidio, esta se realizó en las interacciones de 48 horas. Los resultados indican la ausencia de daño citotóxico a 48 horas con las distintas concentraciones en ambas líneas celulares.

En la línea celular MDA-MB-231 el efecto citotóxico de BoNT/A durante 48 horas de interacción en las diferentes concentraciones fue comparable al efecto citotóxico del vehículo y del control, demostrando que dichas concentraciones no ejercen cambios significativos en la viabilidad celular en las 48 horas de exposición a BoNT/A. Además, hay una ausencia de una relación dosis-respuesta clara, dado que la frecuencia de células positivas para yoduro de propidio oscilaron en un rango estrecho, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos problema y control (figura 9-A).

En la línea celular U-87 MG el efecto citotóxico de BoNT/A en las mismas condiciones de interacción se observaron diferencias en la frecuencia de las células positivas a yoduro de propidio del 1.8% entre los grupos control y 2.5 U/mL, además de ser el grupo con menor frecuencia de células positivas para yoduro de propidio que el resto, incluyendo el grupo control y vehículo. Los resultados para esta línea celular no tuvieron diferencias estadísticamente significativas (figura 9-B).

En ambas líneas celulares existe una baja diferencia en la frecuencia de células positivas a yoduro de propidio entre los grupos control y vehículo. A pesar de la ausencia de diferencias significativas entre estos grupos, el grupo vehículo muestra menor número de células positivas a yoduro de propidio respecto al grupo control.

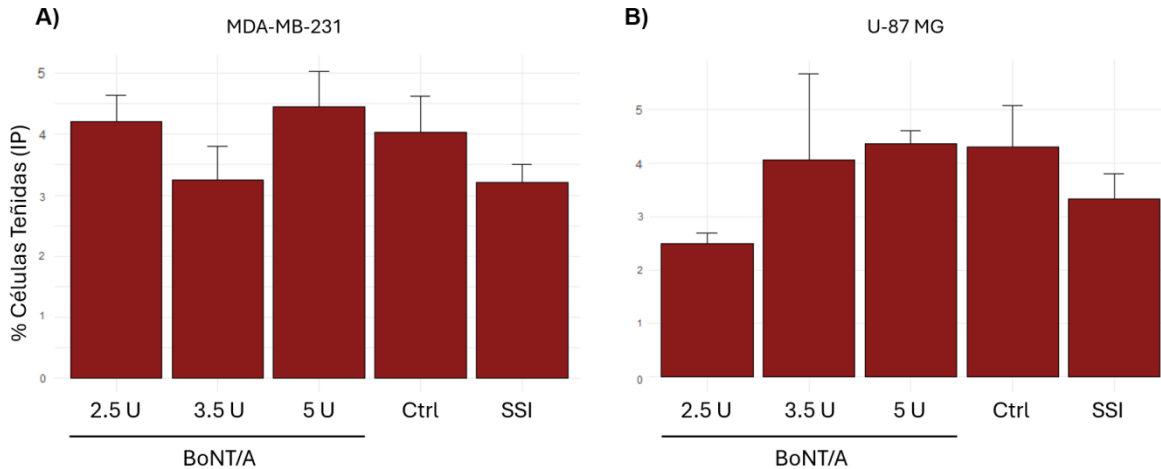


Figura 9. Evaluación de la viabilidad celular. Porcentajes correspondientes a los núcleos positivos a yoduro de propidio de los cultivos celulares a 48 horas de interacción con BoNT/A en las concentraciones 2.5 U/mL, 3.5 U/mL y 5 U/mL. A) Células MDA-MB-231. B) Células U-87 MG. Las diferencias entre los grupos analizados de ambas líneas celulares no demuestran diferencias significativas, $p > 0.05$ ($n=6$).

BoNT/A induce cambios en la morfología de las células después de 48 horas de interacción.

Durante el análisis de viabilidad celular con yoduro de propidio en el microscopio de epifluorescencia, se observaron cambios notables en la morfología de las células de los grupos de BoNT/A. Después de 48 horas de interacción con la toxina, los cultivos de ambas líneas celulares mostraron una morfología esférica, perdiendo dicha morfología en un 50%-60% de los cultivos (figura 10).

En los cultivos de MDA-MB-231 se observaron cambios notables en la morfología celular. Las células perdieron su característica forma husada, que es típica de esta línea celular, y adoptaron una morfología más contraída y esférica. Además, no se observaron núcleos evidentes, aunque las células mantuvieron su aspecto general de indiferenciación celular. Este cambio en la forma celular estuvo acompañado por la presencia de estructuras en la membrana similares a proyecciones de invadopodios, lo que podría sugerir un estado activo o dinámico en la interacción con el entorno extracelular (Figura 11-A).

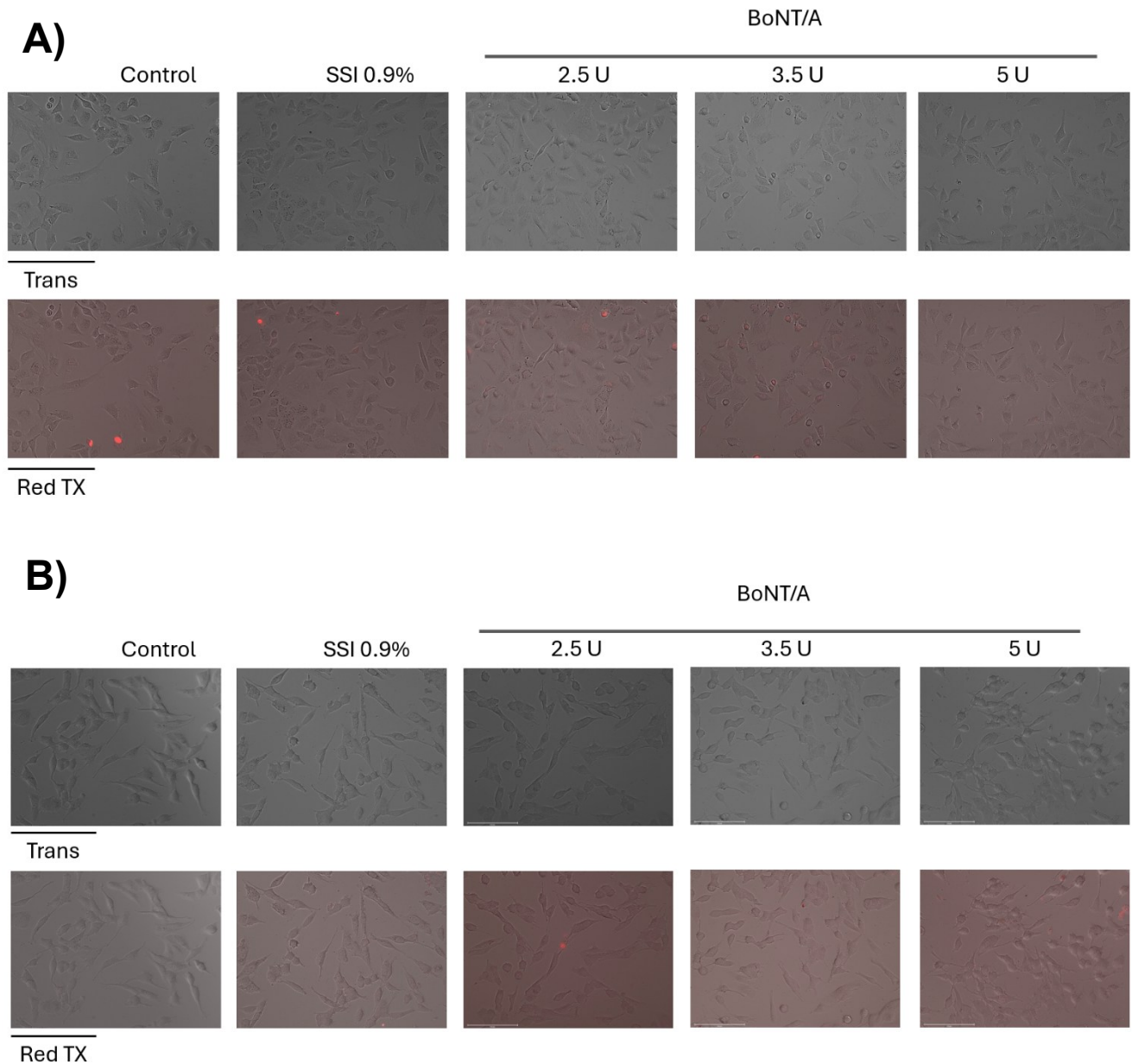


Figura 10. Cambios morfológicos de los cultivos celulares después de 48 horas de interacción con BoNT/A. Células teñidas con yoduro de propidio. A) en la línea celular MDA-MB 231 se observó una disminución del tamaño de algunas células, con proyecciones celulares cortas alrededor de esta y con núcleos definidos. B) la línea celular U-87 MG presentó en la mayoría de sus células una reducción en el tamaño de sus somas, manteniendo sus proyecciones celulares. No observaron variaciones de los cambios morfológicos entre las distintas concentraciones utilizadas (2.5 U/mL, 3.5 U/mL y 5 U/mL). El grupo control y vehículo no mostraron variaciones destacables, manteniéndose en gran parte los aspectos morfológicos de cada línea celular. Fotografías tomadas en objetivo 10X.

En los cultivos de la línea celular U-87MG se observó un efecto similar al registrado en la línea celular MDA-MB-231, con alteraciones notorias en la morfología celular. Los somas de las células presentaron una contracción en su tamaño y adoptaron una forma esférica más definida, acompañada de la desaparición de núcleos visibles. Las proyecciones dendríticas, características de esta línea celular, se observaron más delgadas y elongadas, con bifurcaciones ramificadas en sus extremos, lo que sugiere cambios en la dinámica del citoesqueleto y en la organización estructural celular (Figura 11-B).

Adicionalmente, se observó, aunque con menor frecuencia (aproximadamente una célula por campo a 10X), la presencia de células con somas más amplios en comparación con la morfología típica de la línea celular U-87 MG. Estas células destacaron por presentar un núcleo bien definido y observable, acompañado de proyecciones celulares alargadas que, aunque poco ramificadas, establecían contactos con otras células vecinas. Un aspecto particular de estas proyecciones fue la presencia de pequeñas ramificaciones distribuidas a lo largo de su extensión, lo que recuerda las características morfológicas de los astrocitos. Estas estructuras, propias de los astrocitos diferenciados, no suelen observarse en esta línea celular debido a su bajo grado de diferenciación celular.

La aparición de estas células morfológicamente diferentes podría sugerir una respuesta adaptativa o un cambio específico en una subpoblación celular bajo las condiciones experimentales de cultivo con BoNT/A. Aunque estas observaciones son aisladas, su presencia plantea la posibilidad del efecto de BoNT/A sobre señales inductoras de diferenciación o cambios en la plasticidad celular, fenómenos que podrían estar influenciados por factores presentes en el medio de cultivo o en las interacciones celulares estudiadas.

Estas observaciones no presentaron variaciones entre los distintos grupos de BoNT/A, ya que la frecuencia con la que se observaron dichos efectos no cambió de forma que pudiera sugerir un efecto dosis-respuesta entre las distintas concentraciones de BoNT/A.

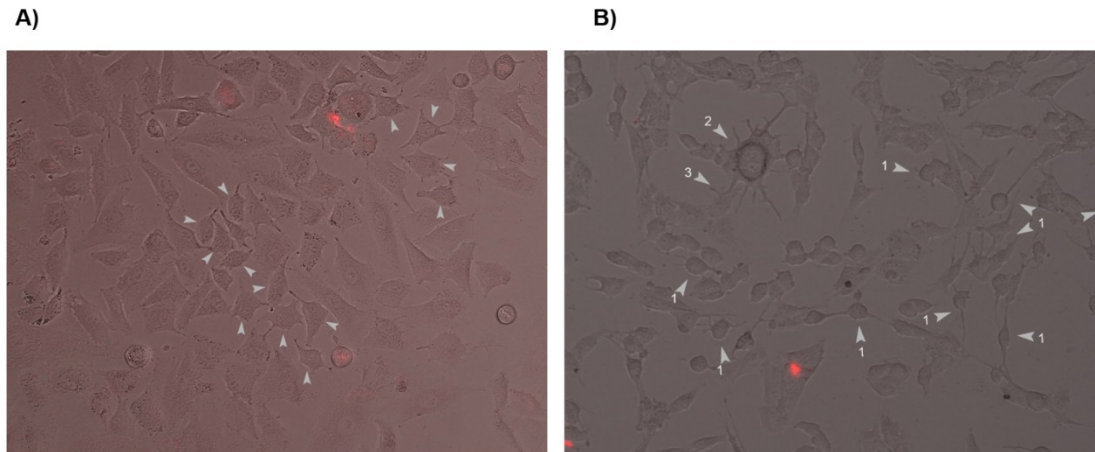


Figura 11. Morfología de las células interactuadas con BoNT/A. La BoNT/A provocó una reducción del tamaño de las células y promovió la generación de nuevas proyecciones celulares. A) Se observó una contracción celular y la aparición de proyecciones celulares de corta elongación similares a invadopodias en la línea celular MDA-MB-231. B) La mayoría de las células U-87 MG mostraron contracción en el tamaño de su soma, observándose esférico, manteniendo y elongando sus proyecciones ramificadas ($\Delta 1$). Igualmente se observaron en menor frecuencia células con un soma más extenso con un núcleo claro y observable ($\Delta 2$) y la presencia de ramificaciones bifurcadas que establecen contacto con otras células ($\Delta 3$). Fotografías tomadas en objetivo 10X.

La Concentración de 2.5 U/mL de BoNT/A no Induce Muerte Celular Programada en los Cultivos Celulares.

Después de la interacción de los cultivos celulares de las líneas MDA-MB-231 y U-87 MG con 2.5 U/mL de BoNT/A durante 48 horas, se evaluaron los procesos de apoptosis y necrosis utilizando marcadores específicos para Annexina V y 7-AAD, los cuales permiten diferenciar entre necrosis y apoptosis tardía. La evaluación se realizó mediante citometría de flujo para determinar el impacto de BoNT/A en los procesos de muerte celular.

En la línea celular MDA-MB-231, la interacción con BoNT/A a una concentración de 2.5 U/mL no mostró un efecto citotóxico significativo. Los cultivos mantuvieron

más del 80% de viabilidad celular como se mencionó anteriormente, lo que indica que la mayoría de las células sobrevivieron a la interacción. Sin embargo, se observó un incremento en la proporción de células en apoptosis tardía tanto en el grupo interactuado con 2.5 U/mL de BoNT/A como en el grupo vehículo, en comparación con el grupo control. Este resultado sugiere que BoNT/A, incluso a bajas concentraciones, podría influir en etapas tardías de la apoptosis en esta línea celular (figura 12-A).

En el caso de la línea celular U-87 MG, los cultivos interactuados con 2.5 U/mL de BoNT/A conservaron una viabilidad superior al 90%. Aunque la apoptosis tardía fue el tipo de muerte celular predominante, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de células en apoptosis tardía entre los grupos evaluados. Tampoco se observaron cambios relevantes en las proporciones de células muertas por necrosis o apoptosis temprana, lo que indica una respuesta celular uniforme a la interacción con BoNT/A. Estos resultados destacan la capacidad de 2.5 U/mL de BoNT/A para preservar una alta viabilidad celular en ambas líneas, con efectos diferenciados en las etapas finales de apoptosis, dependiendo del tipo celular interactuados (figura 12-B).

Estos resultados dieron suficiente información para utilizar la concentración de 2.5 U/mL de BoNT/A en ambas líneas celulares en una interacción de 48 horas sin afectar la integridad de los cultivos. Por ello, esta concentración mínima tóxica de BoNT/A fue utilizada en los experimentos posteriores para evaluar la secreción exosomal en ambas líneas celulares.

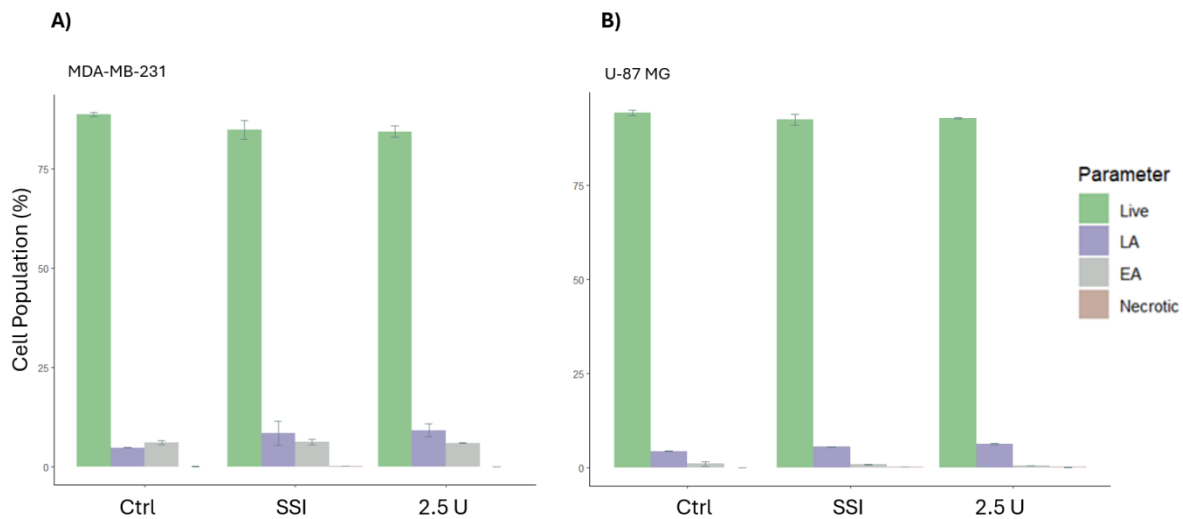


Figura 12. Viabilidad celular de los cultivos después de 48 horas de interacción con 2.5 U/mL de BoNT/A. A) Los cultivos celulares de la línea MDA-MB-231 mantuvieron una viabilidad celular mayor al 80% después de que se interactúan con BoNT/A, con valores similares a los grupos vehículo y control. Se observa un aumento en la proporción de células en apoptosis tardía en los grupos vehículo y 2.5 U/mL de BoNT/A. B) Los cultivos celulares de la línea U-87 MG mantuvieron una confluencia mayor del 90% cuando se interactúan durante 48 horas con 2.5 U/mL de BoNT/A, valores semejantes al resto de los grupos, así como de la proporción de células en apoptosis tardía. Los cambios no muestran diferencias significativas entre los grupos (n=3) $p > 0.05$. Apoptosis tardía (LA), apoptosis temprana (EA).

La expresión de Marcadores Exosomales a Nivel Intracelular no Cambia Después de la Interacción con BoNT/A.

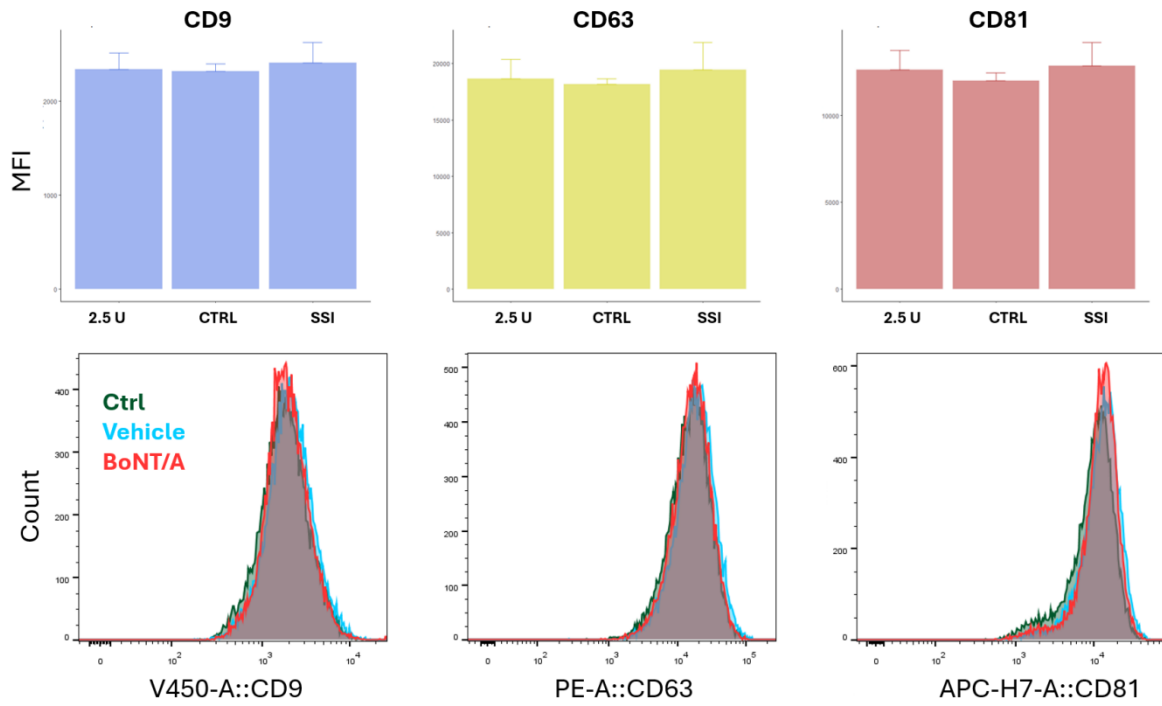
Después de la interacción de los cultivos celulares con BoNT/A, se evaluó la expresión intracelular de los marcadores exosomales CD9, CD63 y CD81 en ambas líneas celulares mediante citometría de flujo, con el objetivo de analizar posibles cambios en la secreción y dinámica de exosomas a nivel intracelular bajo la exposición de BoNT/A durante 48 horas (figura 13).

En la línea celular MDA-MB-231 los resultados indicaron que la expresión del marcador exosomal CD9 permaneció estable, sin diferencias detectables entre los grupos control y aquellos interactuados con 2.5 U/mL de BoNT/A. Este hallazgo sugiere que, bajo estas condiciones experimentales, la exposición a BoNT/A no afecta la regulación de este marcador específico. Por otro lado, en el grupo

vehículo, se observó un leve incremento en la expresión de CD9 en comparación con el control. Sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo, lo que indica que el efecto del vehículo sobre la expresión de CD9 es mínimo y no suficiente para modificar sustancialmente la dinámica de este marcador. No obstante, este efecto no demuestra alterar de forma sustancial la expresión de CD9 ni impactar significativamente las características generales de la población celular analizada.

Por otro lado, los marcadores CD63 y CD81 también mostraron una expresión similar entre los grupos control e interactuados con 2.5 U/mL de BoNT/A. Al igual que con CD9, en el grupo vehículo se observó un incremento en la expresión de ambos marcadores, pero nuevamente, este cambio no fue estadísticamente significativo. Esto sugiere que ni BoNT/A ni el vehículo provocaron modificaciones notables en la expresión de los marcadores exosomales en esta línea celular (figura 13-A). Para la línea celular U-87 MG se observa el mismo comportamiento de expresión de los tres marcadores, teniendo una expresión homogénea del marcador CD9 entre los grupos de BoNT/A y control, pero con un aumento observable en el grupo vehículo, mientras que los marcadores CD63 y CD81 muestran un aumento de su expresión en los grupos vehículo y BoNT/A respecto al grupo control sin mostrar cambios significativos (figura 13-B).

A) MDA-MB-231



B) U-87 MG

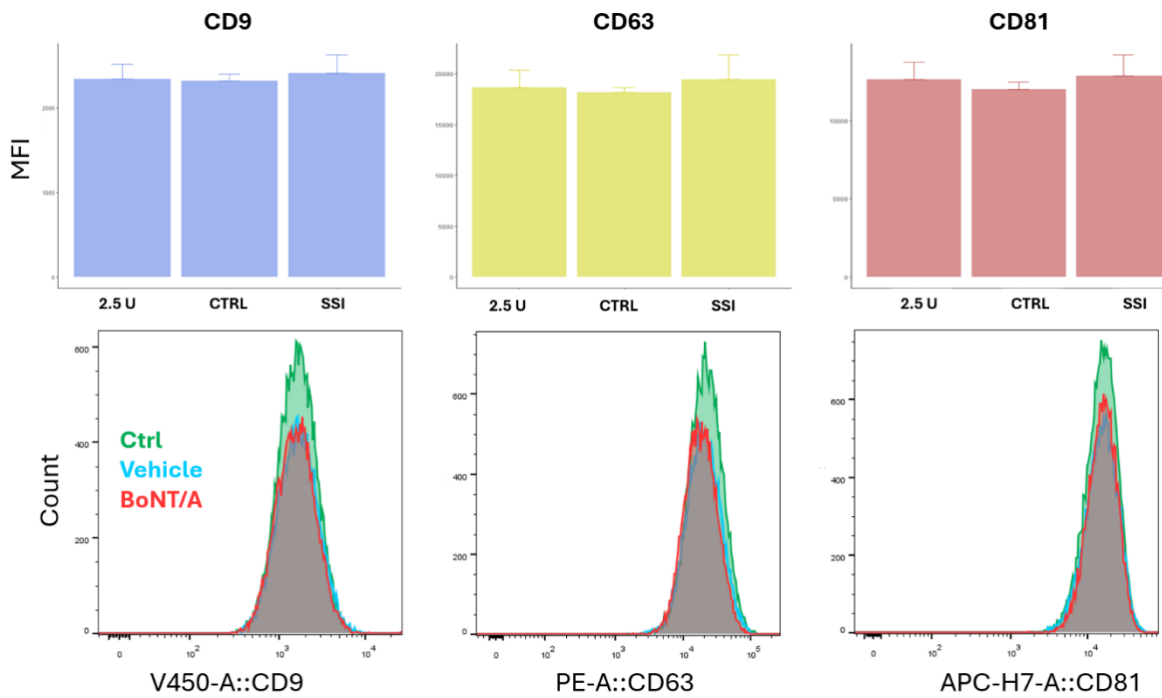
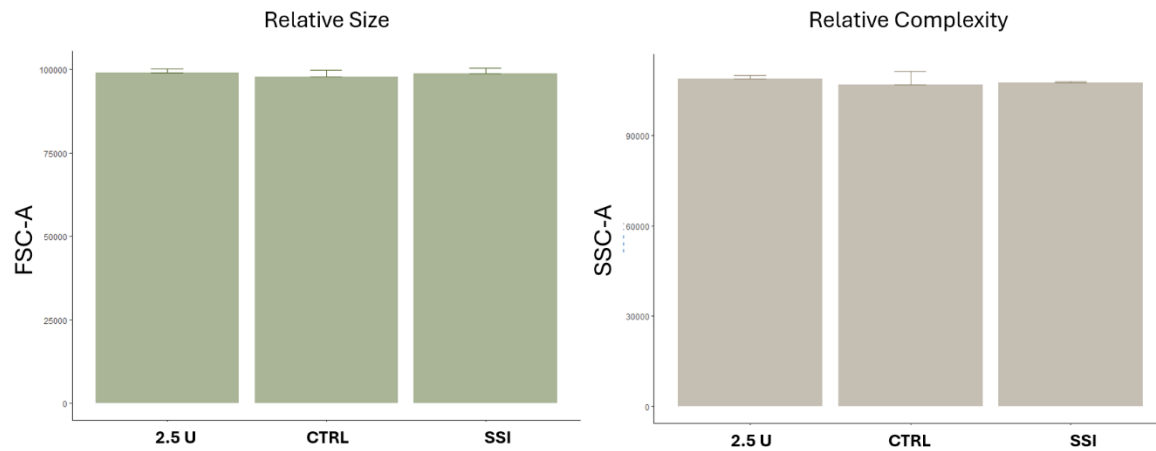


Figura 13. Expresión de los marcadores exosomales intracelulares después de la interacción con BoNT/A. La evaluación de la expresión de marcadores CD9, CD63 y CD81 de forma intracelular no mostró cambios significativos entre los grupos analizados de la línea celular MDA-MB-231 (A). En la línea celular U-87 MG se observó un aumento en la expresión de CD9 en el grupo vehículo, en comparación con los grupos control y 2.5 U/mL de BoNT/A que comparten los valores de expresión de los marcadores de CD9, CD63 y CD81 (B). Los histogramas demuestran que la expresión de los marcadores en ambas líneas celulares no presenta una variabilidad de la distribución significativa, tampoco subpoblaciones observables. Los valores no presentan diferencia significativa (n=3) $p > 0.05$.

La Interacción de los Cultivos Celulares a BoNT/A no Cambia la Complejidad ni el Tamaño de las Células.

Además de evaluar los marcadores exosomales de forma intracelular mediante citometría de flujo, también se analizaron posibles cambios en el tamaño y la complejidad después de la exposición a BoNT/A (figura 14); MDA-MB-231 (A) y U-87 MG (B). Los resultados obtenidos mostraron que no hubo variaciones significativas en ninguno de estos parámetros en los tres grupos experimentales evaluados. Las mediciones de tamaño relativo (FSC) y complejidad interna o granulosidad (SSC) indicaron que las células mantuvieron características consistentes en todas las condiciones experimentales. Esto sugiere que la interacción con BoNT/A, incluso tras 48 horas de exposición, no impactó de manera notable la estructura celular ni alteró la granularidad general de las poblaciones analizadas. Esto indica que, durante las 48 horas de exposición, 2.5 U/mL de BoNT/A no fueron suficientes para generar diferencias en la complejidad ni el tamaño celular, lo que confirma que las células no responden a este tratamiento con cambios en su organización física básica (figura 14).

A) MDA-MB-231



B) U-87 MG

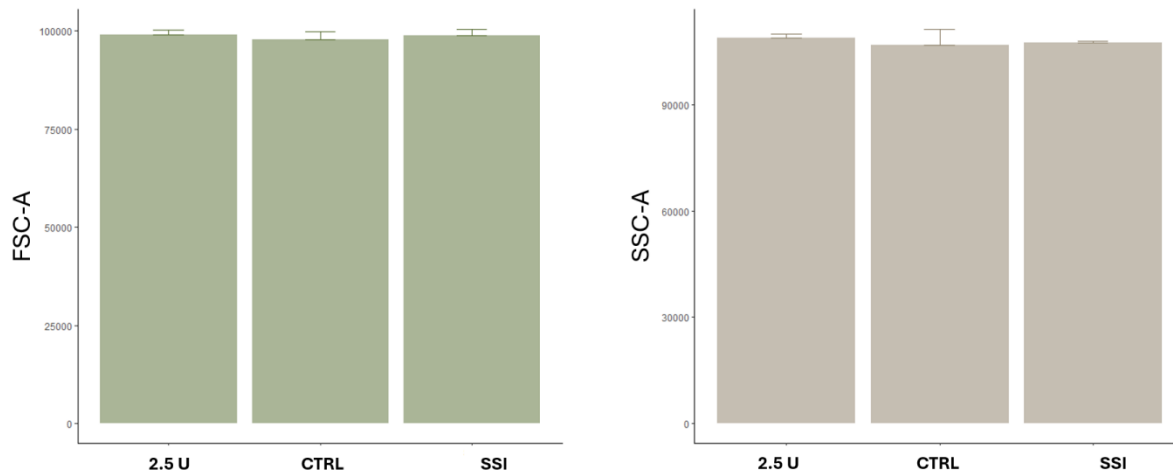


Figura 14. La interacción con 2.5 U/mL de BoNT/A no cambia la complejidad ni el tamaño relativo de las células. A) Los cultivos celulares de ambas líneas celulares A) MDA-MB-231 y B) U-87 MG muestran valores similares entre los grupos para complejidad y tamaño relativos, con un aumento de ambos parámetros en el grupo de BoNT/A. Los resultados no presentan diferencias significativas (n=3) $p > 0.05$.

Identificación de Poblaciones Exosomales CD9, CD63 y CD81 de los Sobrenadantes de la línea MDA-MB-231 Después de la Interacción con BoNT/A.

Se recuperó el sobrenadante de los cultivos celulares interactuados con 2.5 U/mL de BoNT/A para evaluar la tasa de secreción exosomal al medio tras la interacción con BoNT/A mediante la identificación de los marcadores exosomales CD9, CD63 y CD81. El análisis se realizó siguiendo un algoritmo diseñado para identificar exclusivamente la población de eventos únicos, descartando de manera efectiva las poblaciones de dobles eventos y los debris generados por la fragmentación de las perlas durante su manipulación. Este enfoque permitió obtener datos confiables y reducir el ruido experimental (figura 15).

Durante la evaluación de las perlas de captura acopladas a los exosomas provenientes del sobrenadante de los cultivos celulares, se observó en la línea celular MDA-MB-231 una disminución en la expresión del marcador exosomal CD9 en los cultivos interactuados con BoNT/A (figura 16-A). Sin embargo, los valores de CD63 se mantuvieron similares entre los grupos control y BoNT/A. Asimismo, se registró un aumento poco significativo en la complejidad de los eventos (SSC-A) en el grupo interactuados con BoNT/A, pero no en el tamaño de los eventos (FSC-A). Este hallazgo sugiere que la superficie de las perlas de captura está, en su mayoría, saturadas en el grupo interactuado con BoNT/A, pero sin promover un aumento en el tamaño de los eventos registrados (figura 16-B).

En los exosomas capturados de la línea celular U-87 MG interactuada con BoNT/A, se observó un aumento en la expresión de CD63 acompañado de una disminución en la expresión de CD9 en el grupo interactuado con BoNT/A (figura 16-C). No obstante, los cambios en el tamaño (FSC-A) y la complejidad (SSC-A) de los eventos analizados no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, lo que indica una tasa de secreción exosomal relativamente estable tras la interacción con BoNT/A en estas condiciones específicas (figura 16-D).

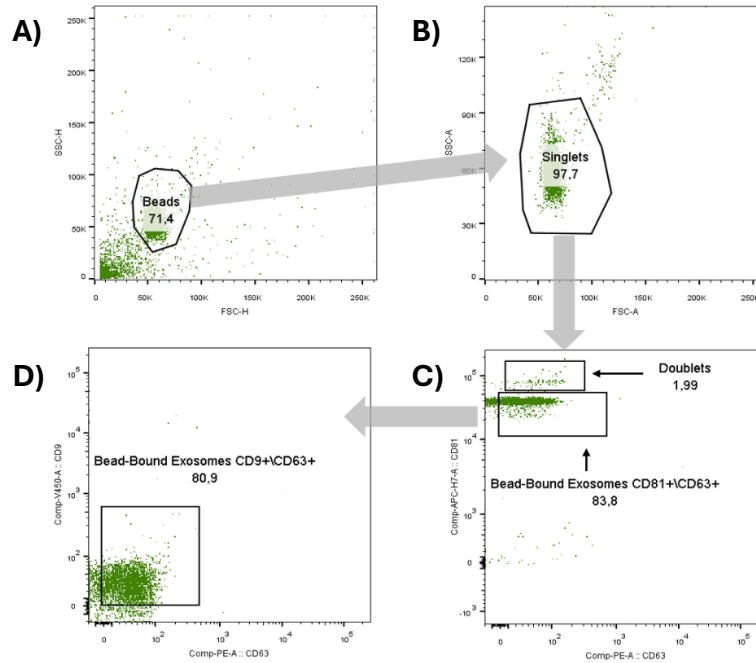


Figura 15. Algoritmo de análisis de las perlas acopladas a exosomas. Se siguió un algoritmo que permitió descartar los eventos dobles observados durante la adquisición de las muestras (A-B), continuando por la discriminación de eventos dobles en la intensidad de la fluorescencia (C) y así obtener una población más pura de perlas acopladas a exosomas (D).

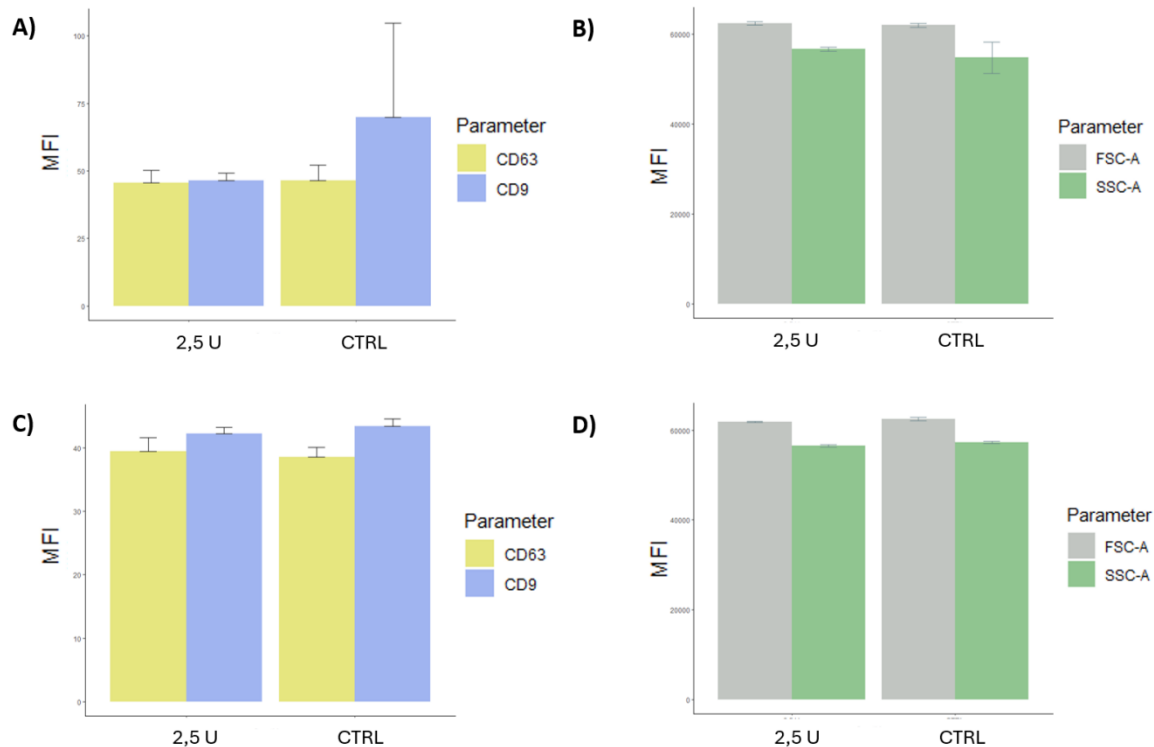


Figura 16. Identificación de poblaciones exosomales CD9, CD63 y CD63 de los sobrenadantes de los cultivos interactuados con BoNT/A. Medición de los marcadores de CD9 y CD63 a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las líneas MDA-MB-231 (A) y U-87 MG (C), y la medición de la media de su tamaño (FSC) y complejidad (SSC) relativa de ambas líneas celulares; MDA-MB-231 (B) y U-87 MG (D). Los resultados no presentan diferencias significativas (n=3) $p > 0.05$.

La Interacción de las Células con BoNT/A Disminuye la Cantidad de Proteínas Secretadas al Medio.

Posteriormente se cuantificaron las proteínas totales presentes en el sobrenadante para evaluar las diferencias en la concentración de estas entre los grupos de células interactuadas con BoNT/A y los controles. En la línea celular MDA-MB-231 se observó una disminución significativa en la concentración de proteínas en el sobrenadante de las células interactuadas con 2.5 U/mL de BoNT/A tras 48 horas de interacción (figura 17-A). Los niveles de concentración medidos fueron similares a los observados en el medio de cultivo suplementado, lo que sugiere una disminución en la liberación de proteínas al medio por efecto del BoNT/A. Sin embargo, en la línea celular U-87 MG, la concentración de proteínas en el sobrenadante de las células interactuadas con BoNT/A fue comparable a la

observada en el grupo control, aunque superior a la del grupo correspondiente al medio de cultivo suplementado, indicando un efecto distinto de la toxina en esta línea celular (figura 17-B).

Posteriormente, se realizó un análisis en geles SDS-PAGE para evaluar los posibles cambios en la concentración de proteínas del sobrenadante de los grupos de la línea MDA-MB-231. En el gel se observó un leve decremento en la concentración de proteínas con un peso molecular entre ~40 y ~100 kDa en el carril correspondiente al sobrenadante de las células interactuadas con 2.5 U/mL de BoNT/A durante 48 horas (figura18). Por otro lado, las bandas correspondientes al resto de las proteínas mostraron intensidades similares entre los grupos interactuados y el control. En contraste, el control del medio de cultivo libre de exosomas no presentó bandas correspondientes a proteínas del rango de ~25 a ~35 kDa, evidenciando una clara ausencia de estas en dicho grupo.

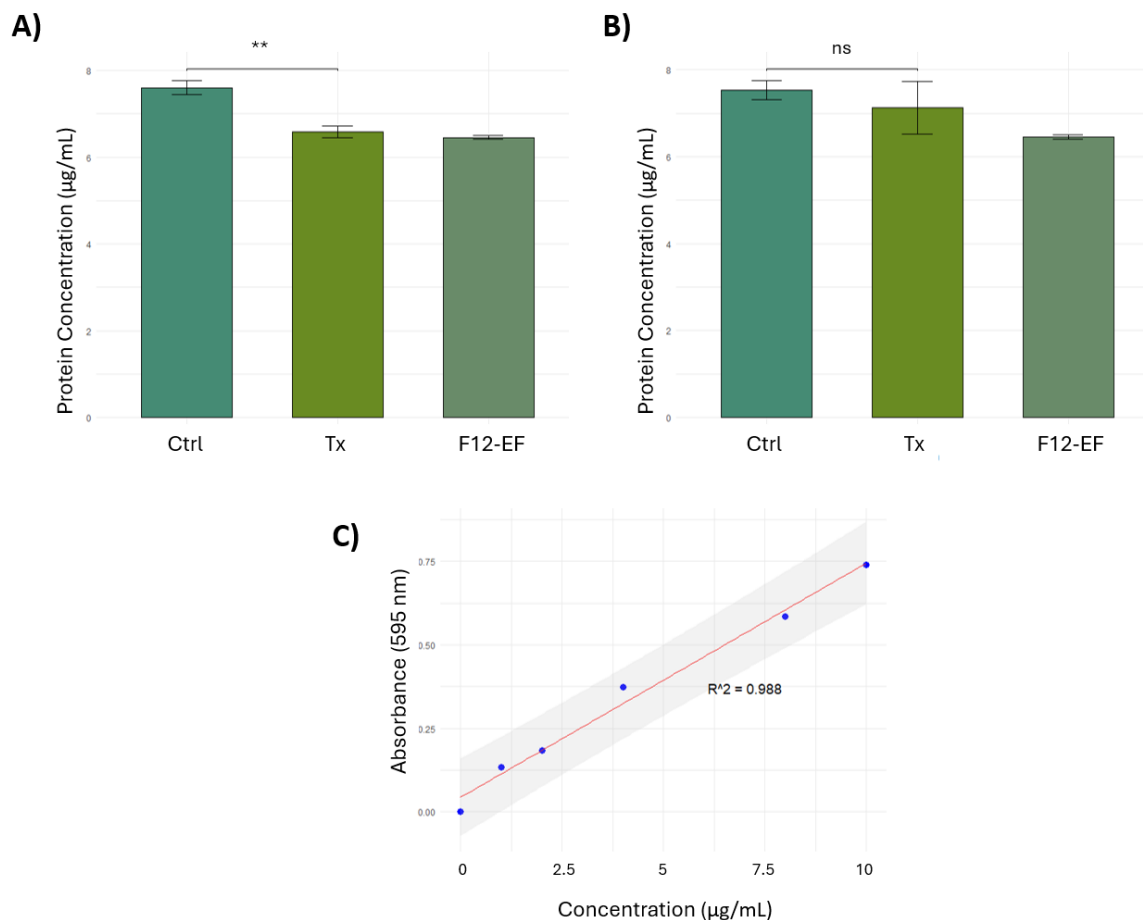


Figura 17. Concentración de proteínas del sobrenadante de los cultivos celulares a 48h de exposición a BoNT/A. El sobrenadante de la línea MDA-MB-231 interactuada con 2.5 U/mL de BoNT/A presentó un decremento en la concentración de proteínas totales respecto al grupo control, teniendo valores similares a los del medio de cultivo original F12EF (A), indicando que la concentración de 2.5 U/mL de BoNT/A provocó una disminución en la concentración de proteínas totales del sobrenadante. Mientras que no existe esa diferencia entre el grupo control y de 2.5 U/mL de BoNT/A en el sobrenadante de la línea U-87 MG (B). El ajuste lineal entre la concentración de proteína y la absorbancia ($R^2=0.988$) confirma la confiabilidad del modelo dentro del rango de concentraciones analizado (C). ($n=3$) $p<0.05$. Control (Ctrl), 2.5 U/mL BoNT/A (Tx), medio F12 libre de exosomas (F12-EF).

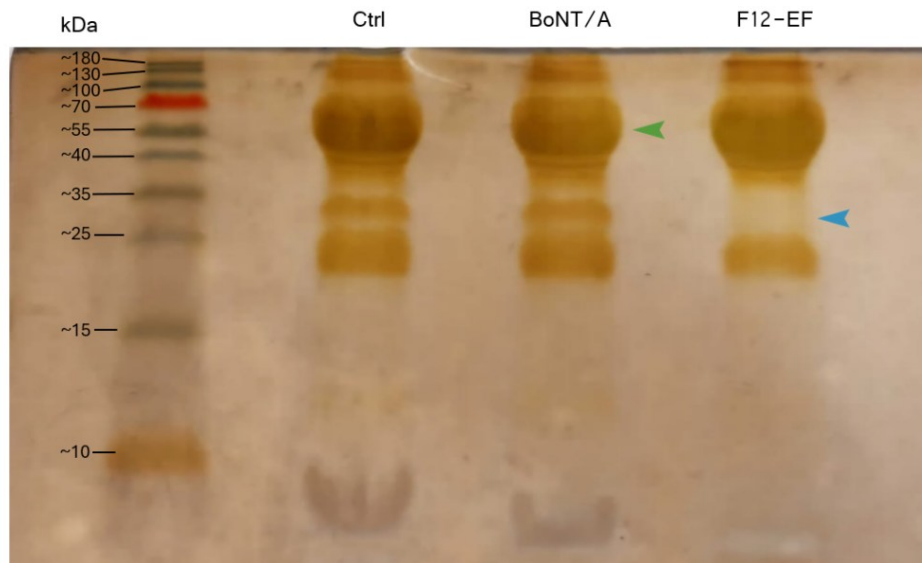


Figura 18. Diferencia en la concentración de proteínas del sobrenadante de las células MDA-MB-231 interactuadas con BoNT/A. Se observa una disminución de la intensidad de la señal en la banda correspondiente a proteínas del tamaño de ~40 a ~100 kDa en el carril del sobrenadante de las células interactuadas con 2.5 u/mL de BoNT/A durante 48 horas (▲). La banda en donde se encontrarían los marcadores de exosomas (~25 a ~35 kDa) está ausente en el carril del medio F12-EF (▲), reafirmando la ausencia de exosomas del medio utilizado. Tinción de nitrato de plata en gel SDS-PAGE 12%. Control (Ctrl), 2.5 U/mL BoNT/A (Tx), medio F12 libre de exosomas (F12-EF).

DISCUSIÓN

La BoNT/A se ha administrado en distintas concentraciones en la práctica dermatológica y cosmética, dependiendo de la afección y el sitio de la aplicación será su concentración en unidades internacionales (UI). Sin embargo, en condiciones experimentales se ha necesitado establecer la concentración tóxica de BoNT/A en los cultivos celulares para la continuación de los propósitos de los respectivos estudios. En el caso de la línea celular de cáncer de mama T47D, la concentración IC50 a 48 horas es de 5.3 U (Bandala et al., 2013), mientras que para fibroblastos de explantes es de 0.625 U/mL (Haubner et al., 2014) y para la línea de cáncer de próstata LNCaP es de 1U/mL (Karsenty et al., 2009). Nuestro trabajo muestra que, los resultados de la evaluación por tinción de yoduro de propidio en los cultivos celulares interactuados con 2.5, 3.5 y 5 U/mL de BoNT/A, demuestran que estas concentraciones no inducen efectos citotóxicos a las 48 horas de exposición en las líneas MDA-MB-231 y U-87 MG. Con esta información se eligió la concentración más baja, de 2.5 U/mL, para evaluar su efecto sobre la inducción de muerte celular programada.

La concentración de 2.5 U/mL de BoNT/A en los cultivos celulares de MDA-MB-231 y U-87 MG no mostró un aumento en el número de células necróticas y apoptóticas de manera significativa. Con esta información se logró establecer la concentración de 2.5 U/mL como concentración mínima tóxica de BoNT/A, la cual no compromete la integridad de los cultivos y no induce muerte celular programada de forma que interfieran los resultados de la evaluación de exosomas como lo indica Gregory C. et al. (Gregory & Rimmer, 2023), por ello, se utilizó en los experimentos posteriores.

Estos resultados son similares a aquellos en los que se demuestra la nula citotoxicidad de BoNT/A para células de cáncer de mama BT-474 a 48 horas de interacción con dicha toxina (Hajighasemlou et al., 2015), mientras que un efecto diferente se ha observado en el trabajo Akpınar et al., (2020) en donde evidenció

que en la línea celular de glioblastoma DBTRG se observa una baja viabilidad celular después de la interacción con 5 U de BoNT/A a 24 horas de interacción.

Es de resaltar que la morfología de las células MDA-MB-231 después de 48 horas de interacción con 2.5 U/mL de BoNT/A coinciden con la descripción morfológica de las células de tumores neuroendocrinos de mama; citoplasma granular, cromatina puntillada y nucleolos discretos (Vegni et al., 2024; Wroński et al., 2015). El papel de SV2A en las células de cáncer de mama puede estar relacionado con la transdiferenciación celular a un fenotipo neuronal (Bandala et al., 2015; NILSSON et al., 2004), sin embargo, dicho proceso está sobre regulado después de la interacción de los receptores SV2A en las membranas de las células con BoNT/A, en donde se evidencia una morfología similar a la de células de tumores neuroendocrinos. Así mismo la línea celular U-87 MG mostró morfología similar a la de células de un tumor neuroendocrino diferenciado (Fedele et al., 2024; Grenda et al., 2022; Juhlin & Bal, 2023); con monotonía en la morfología celular, células en forma de cuerda y anisonucleosis aleatoria. Las ramificaciones bifurcadas en forma de neuritas de los cultivos celulares U-87 MG se ha observado igualmente en co-cultivos de células musculares y ganglionares ciliadas, donde a partir del tercer día de interacción con BoNT/A los cultivos muestran evidentes neuritas secundarias (Bonner et al., 1994). Previamente se ha descrito el efecto de la BoNT/A sobre la transdiferenciación celular ejercida por BoNT/A en cultivos de fibroblastos que se diferencian a adipocitos (X. Dai & Lei, 2021).

La evaluación de los marcadores intracelulares CD9, CD63 y CD81 después de la interacción con BoNT/A, así como con las perlas de captura de exosomas no mostró cambios significativos respecto a los controles, así como tampoco lo hizo en tamaño y complejidad celular, demostrando que la concentración de 2.5 U/mL de BoNT/A no afectan la biogénesis de los MVB's (CD9⁺, CD63⁺ y CD81⁺) de ambas líneas celulares. En el trabajo de Harper et al. (2016), se demostró que BoNT/A se localiza en los MBV's en un tiempo de exposición prolongado, sugiriendo que los MVB's se reciclan a través de la vía de degradación lisosomal,

cabe señalar que sus resultados se replicaron con otras isoformas y fragmentos de la toxina BoNT (Meunier et al., 2003; Solabre Valois et al., 2020). Por su parte Yeo et al. (2024) sugiere que después de 48 horas de interacción BoNT/A se transloca al aparato de Golgi y al ER alterando los procesos del tráfico vesicular en las células, lo que explicaría los cambios observados en la concentración de proteínas del sobrenadante de la línea celular MDA-MB-231, pero no en la línea celular U-87 MG.

CONCLUSIONES

- Las concentraciones de 2.5, 3.5 y 5 U/mL de BoNT/A no afectan la integridad ni la viabilidad de los cultivos celulares de las líneas MDA-MB-231 y U-87 MG después de 48 horas de interacción.
- BoNT/A indujo cambios morfológicos en las células similares a aquellos referidos en las células de tumores neuroendocrinos, sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar dichos cambios de transdiferenciación celular.
- No existen cambios en la expresión de los marcadores exosomales CD9, CD63 y CD81 en las células después de la interacción con BoNT/A.
- No se observaron cambios en la expresión de los marcadores exosomales CD9, CD63 y CD81 con las perlas de captura interaccionadas con el sobrenadante de las células tratadas con BoNT/A, sugiriendo que la escisión de las proteínas SNAP-25 no afecta la secreción de MBV's.
- Es necesario realizar estudios que evalúen la expresión de SNAP-25 y SV2A para poder concluir sobre su participación en los procesos de secreción de exosomas después de la interacción con BoNT/A.
- Para confirmar los resultados de los cambios en la tasa de secreción exosomal después de la interacción con BoNT/A se necesitan evaluar por medio de una técnica distinta como el análisis de nanopartículas en movimiento.

- Son necesarios más estudios que expliquen el efecto de BoNT/A sobre el decremento en la concentración de proteínas totales en el sobrenadante de la línea MDA-MB-231.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Weinberg, R. (2014). *The Biology Of Cancer - The Nature of Cancer* (Allie Bochicchio, Elizabeth Zayat, Richard K. Mickey, & Lamia Harik, Eds.; 2nd ed., Vol. 1). Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Adrada, B. E., Moseley, T. W., Kapoor, M. M., Scoggins, M. E., Patel, M. M., Perez, F., Nia, E. S., Khazai, L., Arribas, E., Rauch, G. M., & Guirguis, M. S. (2023). Triple-Negative Breast Cancer: Histopathologic Features, Genomics, and Treatment. *RadioGraphics*, 43(10). <https://doi.org/10.1148/rg.230034>
- Akpınar, O., Özşimşek, A., Güzel, M., & Nazıroğlu, M. (2020). Clostridium botulinum neurotoxin A induces apoptosis and mitochondrial oxidative stress via activation of TRPM2 channel signaling pathway in neuroblastoma and glioblastoma tumor cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 40(6), 620–632. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1781174>
- Alfredo Cortés, A., Cárdenas Rodríguez, N., Lara Padilla, E., Floriano Sánchez, E., Martínez Contreras, R., Anaya Ruiz, M., Uribe Escamilla, R., Alfaro Rodríguez, A., Ilizaliturri Flores, I., Pérez Santos, M., & Bandala, C. (2017). Synaptic vesicle protein isoforms (SV2A, SCV2B, SV2C): expression in breast cancer and their association with risk factors and metastasis in Mexican women. *International Journal of Clinic and Experimental Pathology*, 10(2), 1998–2004.
- Alnefaie, W. (2021). Cancer Cells–Derived Exosomes and Metastasis. In *Role of Exosomes in Biological Communication Systems* (pp. 277–292). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6599-1_13
- Al-shubaily, F. A., & Al-Zahrani, M. H. (2021). Characterization and Fine Structure of Exosomes. In *Role of Exosomes in Biological Communication Systems* (pp. 27–75). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6599-1_2
- Andreu, Z., & Yáñez, M. (2014). Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>

- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>
- Bandala, C., Cortés-Algara, A. L., Mejía-Barradas, C. M., Ilizaliturri-Flores, I., Dominguez-Rubio, R., Bazán-Méndez, C. I., Floriano-Sánchez, E., Luna-Arias, J. P., Anaya-Ruiz, M., & Lara-Padilla, E. (2015). Botulinum neurotoxin type A inhibits synaptic vesicle 2 expression in breast cancer cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7), 8411–8418.
- Bandala, C., Perez-Santos, J. L. M., Lara-Padilla, E., Delgado Lopez, Ma. G., & Anaya-Ruiz, M. (2013). Effect of Botulinum Toxin A on Proliferation and Apoptosis in the T47D Breast Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(2), 891–894. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.2.891>
- Benavente, S., Sánchez-García, A., Naches, S., LLeonart, M. E., & Lorente, J. (2020). Therapy-Induced Modulation of the Tumor Microenvironment: New Opportunities for Cancer Therapies. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.582884>
- Bonner, P. H., Friedli, A. F., & Baker, R. S. (1994). Botulinum A toxin stimulates neurite branching in nerve-muscle cocultures. *Developmental Brain Research*, 79(1), 39–46. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90047-7)
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Cárdenas S., J., Bargallo R., J. E., Cervantes S., G., Arce S., C., Bautista P., V., Chávez M., M., Flores B., C. H., Lara T., M. C., Lluch H., A., Maffuz A., A., Pérez S., V. M., Poitevín C., A., Salas G., E., Soto P., E., Torrecillas T., L., Valero C., V., & Villaseñor N., Y. (2023). *CONSENSO MEXICANO SOBRE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER MAMARIO DÉCIMA REVISIÓN.*
- Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., Tao, Y., He, Z., Chen, C., & Jiang, Y. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 145. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>

- Dai, X., & Lei, T. (2021). Botulinum toxin A promotes the transdifferentiation of primary keloid myofibroblasts into adipocyte-like cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 129(6), 462–469. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13661>
- de Jong, O. G., Verhaar, M. C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R. M., Gucek, M., & van Balkom, B. W. M. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1(1), 18396. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18396>
- Dong, M., Liu, H., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Janz, R., & Chapman, E. R. (2008). Glycosylated SV2A and SV2B Mediate the Entry of Botulinum Neurotoxin E into Neurons. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5226–5237. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-07-0765>
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R., & Chapman, E. R. (2006). SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science*, 312(5773), 592–596. <https://doi.org/10.1126/science.1123654>
- Fedele, M., Cerchia, L., & Battista, S. (2024). Subtype Transdifferentiation in Human Cancer: The Power of Tissue Plasticity in Tumor Progression. *Cells*, 13(4), 350. <https://doi.org/10.3390/cells13040350>
- Gregory, C. D., & Rimmer, M. P. (2023). Extracellular vesicles arising from apoptosis: forms, functions, and applications. *The Journal of Pathology*, 260(5), 592–608. <https://doi.org/10.1002/path.6138>
- Grenda, T., Grenda, A., Krawczyk, P., & Kwiatek, K. (2022). Botulinum toxin in cancer therapy—current perspectives and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 485–495. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11741-w>
- Groza, M., Zimta, A., Irimie, A., Achimas-Cadariu, P., Cenariu, D., Stanta, G., & Berindan-Neagoe, I. (2020). Recent advancements in the study of breast cancer exosomes as mediators of intratumoral communication. *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 691–705. <https://doi.org/10.1002/jcp.29096>
- Guan, B., Zhou, N., Wu, C.-Y., Li, S., Chen, Y.-A., Debnath, S., Hofstad, M., Ma, S., Raj, G. V., He, D., Hsieh, J.-T., Huang, Y., Hao, G., & Sun, X. (2021). Validation of SV2A-Targeted PET Imaging for Noninvasive Assessment of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13085. <https://doi.org/10.3390/ijms222313085>

- Hajighasemlou, S., Alebouyeh, M., Rastegar, H., Manzari, M. T., Mirmoghtadaei, M., Moayedi, B., Ahmadzadeh, M., Parvizpour, F., Johari, B., Naeini, M. M., & Farajollahi, M. M. (2015). Preparation of Immunotoxin Herceptin-Botulinum and Killing Effects on Two Breast Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *16*(14), 5977–5981. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5977>
- Han, Q.-F., Li, W.-J., Hu, K.-S., Gao, J., Zhai, W.-L., Yang, J.-H., & Zhang, S.-J. (2022). Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular Cancer*, *21*(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Harper, C. B., Papadopulos, A., Martin, S., Matthews, D. R., Morgan, G. P., Nguyen, T. H., Wang, T., Nair, D., Choquet, D., & Meunier, F. A. (2016). Botulinum neurotoxin type-A enters a non-recycling pool of synaptic vesicles. *Scientific Reports*, *6*(1), 19654. <https://doi.org/10.1038/srep19654>
- Haubner, F., Leyh, M., Ohmann, E., Sadick, H., & Gassner, H. G. (2014). Effects of botulinum toxin A on patient-specific keloid fibroblasts in vitro. *The Laryngoscope*, *124*(6), 1344–1351. <https://doi.org/10.1002/lary.24456>
- Juhlin, C. C., & Bal, M. (2023). Top 10 Histological Mimics of Neuroendocrine Carcinoma You Should Not Miss in the Head and Neck. *Head and Neck Pathology*, *17*(1), 66–84. <https://doi.org/10.1007/s12105-022-01521-x>
- Kahlert, C., & Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of Molecular Medicine*, *91*(4), 431–437. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1020-6>
- Karsenty, G., Rocha, J., Chevalier, S., Scarlata, E., Andrieu, C., Zouanat, F. Z., Rocchi, P., Giusiano, S., Elzayat, E. A., & Corcos, J. (2009). Botulinum Toxin Type A Inhibits the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *The Prostate*, *69*(11), 1143–1150. <https://doi.org/10.1002/pros.20958>
- Krylova, S. V., & Feng, D. (2023). The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2), 1337. <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>

- Kumari, M., & Anji, A. (2022). Small but Mighty—Exosomes, Novel Intercellular Messengers in Neurodegeneration. *Biology*, *11*(3), 413. <https://doi.org/10.3390/biology11030413>
- Lim, B., Woodward, W. A., Wang, X., Reuben, J. M., & Ueno, N. T. (2018). Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. *Nature Reviews Cancer*, *18*(8), 485–499. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0010-y>
- Lindl, T., & Steubing, R. (2013). *Atlas of Living Cell Cultures*. Wiley. elibro.bibliotecabuap.elogim.com/es/lc/buapenglish/titulos/181090
- Liu, C., Liu, D., Wang, S., Gan, L., Yang, X., & Ma, C. (2023). Identification of the SNARE complex that mediates the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane in exosome secretion. *Journal of Extracellular Vesicles*, *12*(9). <https://doi.org/10.1002/jev2.12356>
- Löscher, W., Gillard, M., Sands, Z. A., Kaminski, R. M., & Klitgaard, H. (2016). Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond. *CNS Drugs*, *30*(11), 1055–1077. <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0384-x>
- Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A. R., Ahadi, A. mohammad, Molaei, F., & Alahari, S. K. (2019). Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer*, *18*(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0991-5>
- McAndrews, K. M., & Kalluri, R. (2019). Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Molecular Cancer*, *18*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0963-9>
- Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*, *28*(8), R435–R444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>
- Meunier, F. rédéric A., Lisk, G., Sesardic, D., & Dolly, J. O. (2003). Dynamics of motor nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extent and duration are dictated by the sites of SNAP-25 truncation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *22*(4), 454–466. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(02\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(02)00016-7)
- NILSSON, O., JAKOBSEN, A. L., KÖLBY, L., BERNHARDT, P., FORSSELL-ARONSSON, E., & AHLMAN, H. (2004). Importance of Vesicle Proteins in the Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1014*(1), 280–283. <https://doi.org/10.1196/annals.1294.032>

- Paskeh, M. D. A., Entezari, M., Mirzaei, S., Zabolian, A., Saleki, H., Naghdi, M. J., Sabet, S., Khoshbakht, M. A., Hashemi, M., Hushmandi, K., Sethi, G., Zarrabi, A., Kumar, A. P., Tan, S. C., Papadakis, M., Alexiou, A., Islam, M. A., Mostafavi, E., & Ashrafizadeh, M. (2022). Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *Journal of Hematology & Oncology*, *15*(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01305-4>
- Ramirez, D. M. O., & Kavalali, E. T. (2012). The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cellular Logistics*, *2*(1), 20–27. <https://doi.org/10.4161/cl.20114>
- Rossi, R., Arjmand, S., Bærentzen, S. L., Gjedde, A., & Landau, A. M. (2022). Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A: Features and Functions. *Frontiers in Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.864514>
- Shaabani, N., Meira, S. R., Marcet-Palacios, M., & Kulka, M. (2023). Multiparametric Biosensors for Characterizing Extracellular Vesicle Subpopulations. *ACS Pharmacology & Translational Science*, *6*(3), 387–398. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.2c00207>
- Shetgaonkar, G. G., Marques, S. M., DCruz, C. E. M., Vibhavari, R. J. A., Kumar, L., & Shirodkar, R. K. (2022). Exosomes as cell-derivative carriers in the diagnosis and treatment of central nervous system diseases. *Drug Delivery and Translational Research*, *12*(5), 1047–1079. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01026-0>
- Solabre Valois, L., Wilkinson, K. A., Nakamura, Y., & Henley, J. M. (2020). Endocytosis, trafficking and exocytosis of intact full-length botulinum neurotoxin type a in cultured rat neurons. *NeuroToxicology*, *78*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.02.009>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Taylor, D. D., & Shah, S. (2015). Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods*, *87*, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.019>
- Vegni, F., De Stefano, I. S., Policardo, F., Tralongo, P., Feraco, A., Carlino, A., Ferraro, G., Zhang, Q., Scaglione, G., D'Alessandris, N., Navarra, E., Zannoni,

- G., Santoro, A., Mule, A., & Rossi, E. D. (2024). Neuroendocrine neoplasms of the breast: a review of literature. *Virchows Archiv*, *485*(2), 197–212. <https://doi.org/10.1007/s00428-024-03856-y>
- Wang, Y., Xiao, T., Zhao, C., & Li, G. (2023). The Regulation of Exosome Generation and Function in Physiological and Pathological Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(1), 255. <https://doi.org/10.3390/ijms25010255>
- Wroński, K., Żechowicz, M., Frąckowiak, L., & Koda, M. (2015). Primary woman neuroendocrine breast tumor – case report and review of the literature. *New Medicine*, *19*(1), 9–12. <https://doi.org/10.5604/14270994.1155326>
- Xu, M., Ji, J., Jin, D., Wu, Y., Wu, T., Lin, R., Zhu, S., Jiang, F., Ji, Y., Bao, B., Li, M., Xu, W., & Xiao, M. (2023). The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes & Diseases*, *10*(5), 1894–1907. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.03.021>
- Yakovlev, A. A. (2023). Neuronal Exosomes as a New Signaling System. *Biochemistry (Moscow)*, *88*(4), 457–465. <https://doi.org/10.1134/S0006297923040028>
- Yazmín Lizeth Martínez Sánchez. (2022, October 24). *Epidemiología del cáncer de mama Ocupa lugar 5 de muertes en mujeres; en la mayoría de países, de las principales causas de defunción*. 1–5.
- Yeo, J. C., Tay, F. P., Bennion, R., Loss, O., Maignel, J., Pons, L., Foster, K., Beard, M., & Bard, F. (2024). Botulinum toxin intoxication requires retrograde transport and membrane translocation at the ER in RenVM neurons. *ELife*, *12*. <https://doi.org/10.7554/eLife.92806.3>
- Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H., & Xu, W. (2015). Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of Hematology & Oncology*, *8*(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0181-x>