

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“EFECTO DE FLECAINIDA EN LA VIABILIDAD Y
MIGRACIÓN CELULAR EN LA LÍNEA DE CÁNCER DE
MAMA TRIPLE NEGATIVO MDA-MB-231”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
MARÍA FERNANDA GUTIÉRREZ ROSAS**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANGÉLICA LÓPEZ IZQUIERDO**

MEXICALI, B.C

DICIEMBRE DE 2023

Dedicatoria

A mis padres, hermano, tía y abuelos por siempre creer en mí, escucharme, y alentarme en todos los ámbitos de mi vida. Me apoyaron en un tiempo en el cual estuve lejos de casa, pero nunca me sentí sola gracias a ustedes. Gracias infinitas por siempre seguirme el rollo en todas mis locuras, por tratar de ayudarme y por darme las herramientas en la vida para ser la persona que soy. Los amo con todo mi corazón y sin su apoyo nada de esto hubiera pasado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por brindarme el apoyo de realizar mi maestría con la beca académica de número #1134039 otorgada durante mis estudios, y con ello concluir este capítulo de mi vida.

A Fundación UABC por otorgarme la beca “Alas para volar” para continuar mis estudios en el extranjero. A Queen Mary University of London por aceptarme en ese año lleno de retos y experiencias.

A la Universidad Autónoma de Baja California, la FIM, MyDCI y laboratorio de Bioingeniería por abrirme sus puertas de nuevo y brindarme las herramientas necesarias para realizar mi investigación.

A la doctora Angélica López Izquierdo por su tiempo, su dedicación en el proyecto, su apoyo y por hacer de esta etapa la más amena. Me adoptó, me dio su confianza y creyó en mí inclusive cuando yo no lo hacía, y por ello estaré eternamente agradecida. Gracias a usted no solo adquirí conocimientos académicos, sino que también me llevo aprendizajes de vida los cuales llevaré conmigo siempre.

Al maestro José Luis Becerra por siempre acompañarme y tener la puerta de su cubículo abierta. Gracias por compartir anécdotas, risas y su apoyo en lo que requiriera.

A los alumnos de servicio social que me brindaron tanto apoyo, risas y compañerismo. Gracias por hacerme querer ir al laboratorio todos los días y nunca dejarme lavar material.

Parte de esta investigación se financió con recursos procedentes de la 22^a convocatoria interna de apoyo a proyectos de investigación de la Universidad Autónoma de Baja California. Clave del proyecto 105/6/C/41/22.

Resumen

El cáncer es un conjunto de enfermedades causadas por el desarrollo y división sin control de células anormales. El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer que más afectan a la población, estando entre los 5 tipos de cáncer que más defunciones causan cada año. Aún quedan muchas incógnitas sobre la división celular descontrolada característica de los procesos tumorales; diversas investigaciones han demostrado que la sobreexpresión de los distintos tipos de canales iónicos está asociada a muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. Los canales iónicos son conductos proteicos en la membrana, los cuales controlan el flujo de iones a través de la célula. Estos regulan diversos procesos vitales que se llevan a cabo en el organismo, y cuando hay una disfunción causan distintas patologías. Estudios previos han mostrado que los canales iónicos pueden tener una influencia en la aparición de la metástasis del cáncer de mama. Dentro de los canales que se han descrito que están sobreexpresados en el cáncer de mama, se encuentran los canales de sodio. Trabajos de investigación enfocados en el estudio de los canales iónicos podrían dar la pauta para determinar los factores que causan la sobreexpresión de éstos en las células tumorales, así como establecer la relación entre el incremento del potencial maligno de las células cancerígenas con la expresión de los canales y la proliferación descontrolada de las mismas. Los canales iónicos podrían ayudar al descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas complementarias, y considerarlos como biomarcadores tumorales. En la presente investigación se estudió el efecto de flecainida en procesos de migración y viabilidad de la línea celular MDA-MB-231, en los cuales flecainida detuvo la migración celular y disminuyó significativamente el crecimiento celular en la línea celular asociada al cáncer de mama triple negativo. En este trabajo se propone que la flecainida inhibe estos procesos celulares en las células tumorales debido a su interacción con canales de sodio sobreexpresados en la línea celular MDA-MB-231.

Abstract

Cancer is a disease caused by the uncontrolled development and division of abnormal cells. Breast cancer is one of the types of cancer that most affect the population, being among the 5 types of cancer that cause the most deaths each year. There are still many unknowns about the uncontrolled cell division characteristic of tumor processes, various investigations have shown that the overexpression of the different types of ion channels is associated with many diseases, including cancer. Ion channels are protein channels in the membrane, which control the flow of ions through the cell. These regulate various vital processes that are carried out in the body, and when there is a dysfunction of these, they bring negative consequences. Previous studies have shown that ion channels can influence breast cancer metastasis, some of them being sodium and potassium channels. Research projects focused on the study of ion channels could determine the factors that cause the overexpression of these in tumor cells, as well as establish the relationship between the increase in the malignant potential of cancer cells with the overexpression of the channels and proliferation uncontrolled of them. In this way, the use of ion channel blockers has been proposed to reduce cell migration of tumor cells, in addition to considering them as essential molecular targets in complementary therapy regulating uncontrolled cell division. In the present investigation, the effect of flecainide as a blocker on migration processes and on the viability of MDA-MB-231 cell lines was studied, in which flecainide stopped cell migration and significantly decreased cell growth in the triple negative breast cancer cell line. A possible relationship was developed between the cellular processes of migration and cell viability associated with the expression of ion channels in tumor cell lines.

Índice

Índice de figuras	7
1. Introducción	8
1.1 Antecedentes	8
1.1.1 Cáncer.....	8
1.1.2 Cáncer de mama	8
1.1.3 Cáncer de mama triple negativo.....	11
1.1.4 Canales iónicos	14
1.1.5 Canales dependientes de voltaje.....	16
1.1.6 Canales de sodio.....	18
1.1.7 Bloqueadores e inhibidores	21
1.2 Planteamiento del problema.....	25
1.3 Justificación.....	27
1.4 Hipótesis	28
1.5 Objetivo.....	28
1.5.1 Objetivo general	28
1.5.2 Objetivos específicos.....	28
2. Metodología	29
2.1 Cultivo de las líneas celulares:.....	29
2.2 Ensayo de herida	29
2.3 Evaluación de la viabilidad celular	30
2.4 Plan de análisis de los resultados	30
3. Resultados y discusión	31
3.1 Resultados	31
3.1.1 Ensayo de herida.....	31
3.1.2 Ensayo de viabilidad.....	36
3.2 Discusión	38
4. Referencias	46
5. Anexos	56

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria.....	9
Figura 2. Representación de los receptores asociados al cáncer de mama.....	12
Figura 3. Esquema de la subunidad formadora del poro de un canal iónico	16
Figura 4. Estructura de un canal de sodio dependiente de voltaje	19
Figura 5. Ensayo de herida en condiciones control en la línea MDA-MB-231	31
Figura 6. Gráfica de cierre de herida en condiciones control y en presencia de DMSO...32	
Figura 7. Ensayo de herida en presencia de lidocaína en la línea MDA-MB-231.....	33
Figura 8. Ensayo de herida con diferentes concentraciones de flecainida en la línea MDA-MB-231.....	34
Figura 9. Cierre de herida con diferentes concentraciones de flecainida	35
Figura 10. Curva de concentración efecto de flecainida en la migración celular	36
Figura 11. Curva de crecimiento de la línea celular MDA-MB-231.....	37
Figura 12. Modelo de sobreexpresión del canal Nav1.5 en el cáncer de mama triple negativo	42

1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer

Nuestro organismo está constituido por un conjunto de órganos, que a su vez están formados por células. Estas crecen y se dividen de forma regular con el fin de reemplazar a las ya envejecidas o muertas; manteniendo así la integridad y el correcto funcionamiento de los distintos órganos. El núcleo de la célula contiene la información genética necesaria para hacer que la célula realice sus funciones vitales. Los genes se aseguran de que la célula crezca y haga copias (se reproduzca) en una forma controlada, por lo que los genes son necesarios para mantener el cuerpo sano. De vez en cuando suceden errores en la replicación del ADN durante la división celular; esto se llama mutación, y significa que un gen ha sido dañado, se ha perdido o se ha copiado demasiadas veces (Gilchrist, 2023). Cuando la mutación afecta a los genes que controlan la proliferación celular, las células se convierten en células cancerígenas, alterando la homeostasis celular y del cuerpo humano debido a su comportamiento anormal (O'Connor et al., 2014).

Un tumor (también llamado neoplasia) es una masa anormal de células en el cuerpo, y es causado por células que se dividen más de lo normal o debido a la alteración de los procesos apoptóticos (Patel, 2020). Un tumor formado por estas células anormales puede permanecer dentro del tejido en el que se originó (cáncer *in situ*) o puede comenzar a invadir los tejidos cercanos (cáncer invasivo) (National Institutes of Health, 2007). El cáncer invasivo (o los tumores malignos) pueden propagarse a sitios distantes mediante el sistema sanguíneo o linfático. Esta propagación recibe el nombre de metástasis, y esta puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo (Patel, 2020).

1.1.2 Cáncer de mama

Las mamas son órganos glandulares que son muy sensibles a los cambios hormonales en el cuerpo, y en ellas también pueden surgir células cancerígenas. Las mamas son conformadas por tejido adiposo, y usualmente las mamas femeninas tienen mayor cantidad de tejido glandular que las masculinas. Los senos femeninos contienen de 12 a

20 lóbulos que se dividen en lóbulos más pequeños, y estos se conectan a través de conductos lácteos (Figura 1). El tejido adiposo de la mama está inervado por una red de nervios, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, ganglios linfáticos y también está compuesto por tejido conjuntivo fibroso y ligamentos (Akram et al., 2017). El cáncer de mama puede iniciar en las células del revestimiento (epitelio) de los conductos (85%) o lobulillos (15%) del tejido glandular de las mamas. Inicialmente, el tumor canceroso se limita al conducto o lóbulo (*in situ*), donde generalmente no causa síntomas y tiene un potencial mínimo de diseminación (metástasis) (World Health Organization, 2021), pero si la proliferación continua, este tumor puede llegar a realizar metástasis en otros órganos.

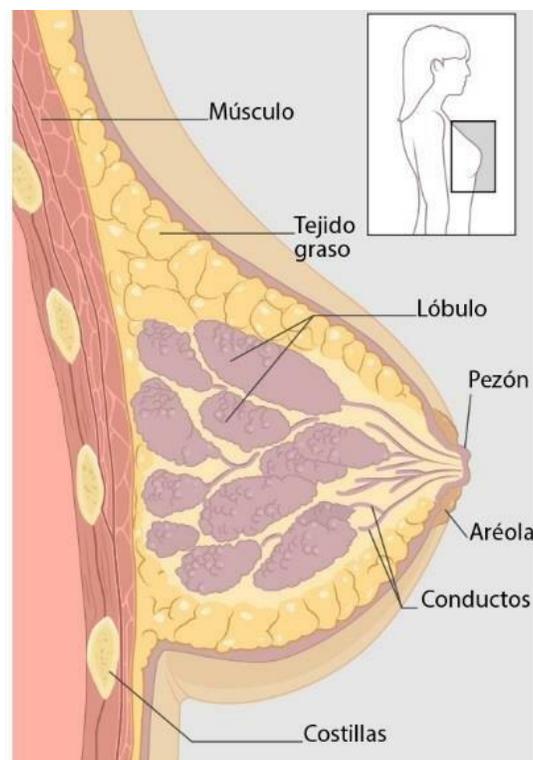


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria (Tomada de Tarupi, 2021).

El cáncer de mama es la segunda causa principal de muerte asociada al cáncer entre las mujeres en todo el mundo, y constituye el 25% de todos los cánceres y el 12% de las muertes asociadas al cáncer (Kothari et al., 2020). En 2020 se reportaron más de 2,2 millones de casos de cáncer de mama, haciendo a este el tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial (OMS, 2021). Es una enfermedad heterogénea compuesta por

diferentes subtipos moleculares, con características histopatológicas y biomoleculares peculiares (Lastraioli, 2020).

Existen diversos factores de riesgo del cáncer de mama, y se clasifican en dos grupos: factores genéticos y no genéticos. El factor genético es cualquier mutación genética que tiene un individuo que causa cáncer de mama. Estas mutaciones ocurren en el gen BRCA (BRCA1 y BRCA2). El gen BRCA1 es un gen supresor de tumores involucrado en la reparación y recombinación de daños en el ADN, el punto de control del ciclo celular, la apoptosis y la regulación transcripcional. Algunos estudios mostraron que las células portadoras de la mutación BRCA1 tenían más probabilidades de tener cáncer de mama ER negativo/PR negativo (Chen et al., 2018). El gen BRCA2 fue descubierto como el segundo gen que predispone al cáncer de mama. El gen BRCA2 en células sanas garantizaría la estabilidad de las células del ADN y el crecimiento celular controlado. Las mutaciones de la línea germinal BRCA2 se observan en aproximadamente el 35% de las familias con cáncer de mama de inicio temprano en las mujeres, y causan un mayor riesgo de cáncer de ovario en las mujeres, y cáncer de mama en los hombres (Mehrgou & Akouchekian, 2016).

Los factores no genéticos pueden influir en la aparición del cáncer de mama, como la raza y el origen étnico, la radioterapia torácica, los antecedentes familiares de cáncer de mama y muchos más (Feng et al., 2018), pero la principal razón aducida para la aparición del cáncer de mama son las mutaciones genéticas.

El cáncer de mama se puede clasificar en diferentes subtipos según el tamaño del tumor, la gradación, el tipo histológico, la estadificación de la metástasis, etc. (Tsang & Tse, 2019). Los marcadores tumorales ayudan a clasificar el tipo de cáncer de mama. Un marcador tumoral es un indicador bioquímico que se encuentra en la sangre, la orina o los tejidos corporales que puede estar elevado por la presencia de uno o más tipos de cáncer (Kabel, 2017). Además de categorizar el cáncer de mama, existen varias ventajas de usar marcadores tumorales, como lo son la detección temprana del cáncer, ayuda en el diagnóstico, determina la respuesta a la terapia, indicador pronóstico de la progresión de la enfermedad y puede indicar el período de seguimiento de la recaída (Nagpal et al.,

2016) por lo tanto, es importante identificar a los marcadores tumorales del cáncer de mama.

Se han encontrado tres marcadores moleculares manifestados en la patogénesis del cáncer de mama:

- El receptor de estrógeno es uno de los marcadores tumorales exitosos en el cáncer de mama. La señalización del receptor de estrógeno (RE) representa el principal impulsor del crecimiento tumoral y la supervivencia en el cáncer de mama con receptor hormonal positivo (Pagliuca et al., 2022)
- El receptor de progesterona celular (PR) media la acción de la progesterona. La progesterona es fundamental para el desarrollo de las glándulas mamarias. Una relación de expresión alterada de PRA y PRB es ampliamente aceptada como un evento temprano en el desarrollo del cáncer de mama (Pu et al., 2022).
- El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/ErbB2) es un receptor tirosina quinasa codificado por el oncogén HER2 ubicado en el cromosoma 17q12 (Liwski et al., 2022).

Basándose en los biomarcadores, el cáncer de mama se clasifica en 3 subtipos principales: receptor hormonal positivo/HER2 negativo (70% de los pacientes), HER2 positivo (15% - 20%) y triple negativo (15%) (Waks & Winer, 2019). Este trabajo se enfocará en el cáncer de mama triple negativo.

1.1.3 Cáncer de mama triple negativo

El cáncer triple negativo es un subtipo de cáncer de mama. Representa aproximadamente del 15-20% de todos los nuevos diagnósticos de cáncer de mama, y representa el 5% de todas las muertes anuales relacionadas con el cáncer (Won & Spruck, 2020). El cáncer de mama triple negativo se diferencia de los otros subtipos porque no expresa el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), o el factor epidérmico de crecimiento humano 2 (HER2) (Yin et al., 2020) (Figura 2).

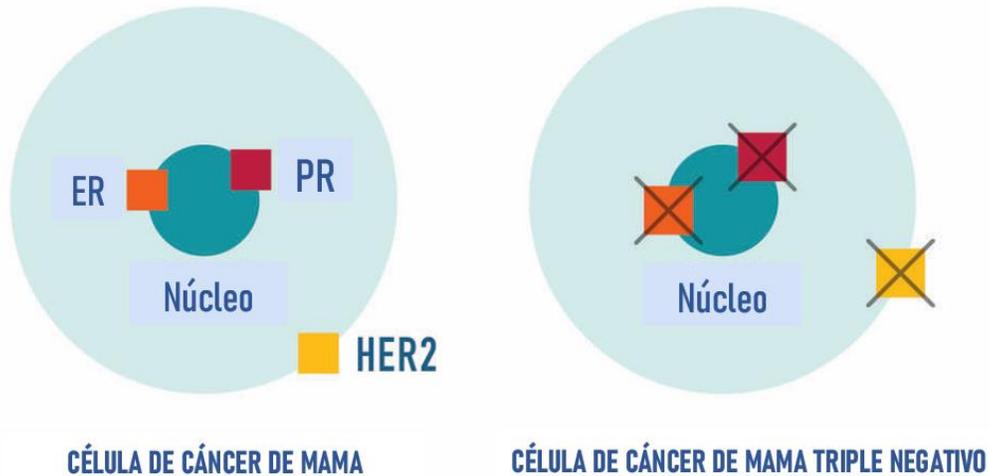


Figura 2. Representación de los receptores asociados al cáncer de mama. Diferencia de la expresión de los receptores hormonales (marcadores tumorales) que se han identificado en una célula de cáncer de mama y en una célula de cáncer de mama triple negativo (Modificado de Jaber, 2021).

El cáncer triple negativo se caracteriza por ser más agresivo que los otros subtipos de cáncer de mama. Este subtipo de cáncer se caracteriza por tener una heterogénesis significativa, mal pronóstico, alta invasividad, alto potencial metastásico y propensión a la recaída (Yin et al., 2020). Las características histopatológicas de los tumores de cáncer de mama triple negativo incluyen un alto grado nuclear, incremento en la actividad mitótica y una tasa acelerada de proliferación. Un porcentaje pequeño de los tumores de cáncer de mama triple negativo han mostrado características de bajo grado, es decir, que las células de cáncer se parecen a las células de tejido normales (Jitariu et al., 2017). Además, el cáncer triple negativo realiza la metástasis a las vísceras (lo cual tiene peor pronóstico) en contraste de otros subtipos, los cuales se diseminan mayormente a los huesos. Por lo tanto, el tiempo promedio de recaída es más corto (de 4 a 6 años) y la supervivencia general tiene peor pronóstico para las pacientes con cáncer de mama triple negativo en comparación con otros cánceres de mama. Se ha reportado que estos tipos de tumores tienden a ser más comunes en mujeres menores a 40 años, de raza africanoamericana o hispana, o que presentan una mutación en el gen BRCA1 (gen en el cromosoma 17) (Lee & Djamgoz, 2018).

Varios grupos de investigación categorizan el cáncer de mama triple negativo en diferentes clasificaciones moleculares. Basándose en la expresión de los genes y usando microdissección por captura láser y cuantificación histopatológica, se han definido cuatro subtipos de cáncer de mama triple negativo: tipo basal (BL) 1, BL2, mesenquimal (M) y receptor de andrógenos luminal (LAR) (Masuda et al., 2022). Aproximadamente el 80% de los subtipos de cáncer triple negativo son de tipo basal (Temian et al., 2018). El cáncer de mama tipo basal son los tumores que sobreexpresan los marcadores de cytokeratina CK5/6 y 17, y el factor de crecimiento epidérmico 1 (HER1), al igual que expresan negatividad hacia los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y al factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) (Eskiler et al., 2018). El análisis de perfiles de expresión génica a menudo clasifica el cáncer triple negativo como un subtipo de cáncer de mama de tipo basal. Aproximadamente el 56% de los perfiles de expresión génica del cáncer de mama triple negativo y del cáncer de mama de tipo basal se superponen. La relación de superposición puede llegar al 60-90% entre triple negativo y basal, en comparación con solo el 11.5% entre los subtipos que no son triple negativo y el basal (Yin et al., 2020). A pesar de las similitudes, el cáncer de mama triple negativo y el cáncer de mama basal no son lo mismo, ya que al cáncer triple negativo no expresan los marcadores de cytokeratina CK5/6 y 17 (Badve et al., 2010), por lo que el cáncer de mama triple negativo no puede ser tratado como un subtipo basal.

Hay varias opciones para tratar al cáncer de mama, como la terapia hormonal o el tratamiento con trastuzumab (para subtipo HER2) (De Ruijter et al., 2011), pero debido a la falta de receptores las opciones de tratamiento para el cáncer triple negativo son limitadas. El tratamiento principal utilizado para este subtipo de cáncer es la quimioterapia (tanto en etapas iniciales como avanzadas del cáncer triple negativo); la otra opción es la mastectomía. A pesar de que estos tratamientos han sido aprobados y son empleados, aproximadamente el 80% de los pacientes con cáncer de mama triple negativo muestran una respuesta incompleta a la quimioterapia convencional, la reincidencia de la enfermedad y la formación de metástasis después de cirugía (Senigaglia et al., 2022). Se ha descrito, que una vez que se diagnostica el cáncer triple negativo, los pacientes desarrollan una mayor tendencia a la metástasis distante y una recurrencia local de su tumor primario. Hasta la fecha, ninguna de las organizaciones

reguladoras de medicamentos como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) o la Agencia de Medicinas Europeas (EMA) han aprobado una terapia fiable y eficaz para el cáncer de mama triple negativo (Fatima et al., 2022).

Un gran problema en el cáncer triple negativo, además de la falta de sitios receptores, es el desarrollo de quimioresistencia (Medina et al., 2020). La quimiorresistencia es la capacidad de las células cancerosas para evadir o hacer frente a la presencia de tratamientos. Se han descubierto muchos mecanismos moleculares de cómo las células cancerígenas promueven su propia supervivencia, y evitan la apoptosis en respuesta a los quimioterapéuticos de uso común (Yeldag et al., 2018). Es por la quimioresistencia que varias investigaciones se han enfocado en terapias neoadyuvantes (el tratamiento dado antes del tratamiento principal para reducir el tumor) para el cáncer triple negativo, sin embargo, este último continúa con un mal pronóstico (Bergin & Loi, 2019). Un ejemplo de la búsqueda de tratamientos neoadyuvantes fue en la investigación de Yin et al., (2020), en la cual se empleó bevacizumab, un fármaco antiangiogénico utilizado para tratar diferentes cánceres, en combinación con fármacos quimioterapéuticos para tratar el cáncer de mama triple negativo, sin embargo, se reportó que el tiempo de supervivencia de los pacientes no aumentaba significativamente (Yin et al., 2020).

A pesar de no encontrar un tratamiento efectivo, la investigación y la búsqueda de nuevos tratamientos es pertinente para así obtener un resultado que mejore el pronóstico del paciente. Por lo tanto, es urgente encontrar una diana terapéutica novedosa y eficaz. Dado que la alteración de los canales iónicos y los transportadores en las células mamarias normales puede afectar el crecimiento celular, dando como resultado el desarrollo y la progresión del cáncer triple negativo, los canales iónicos y los transportadores pueden ser nuevos objetivos terapéuticos prometedores para el cáncer de mama triple negativo (Lu et al., 2020).

1.1.4 Canales iónicos

Los canales iónicos son complejos de proteínas de membrana que permiten la conducción iónica entre el medio extracelular e intracelular (Haworth & Brackenbury, 2019). Su función es el transporte de iones a través de la membrana plasmática para

regular el potencial de la membrana celular (potencial generado por la diferencia entre cargas entre el exterior e interior de la célula); también juegan un papel esencial en la comunicación neuronal, la conducción nerviosa y la contracción muscular (Rosendo-Pineda et al., 2020).

Los canales controlan el flujo pasivo de iones a través de la membrana plasmática mediante el cambio entre estados conformacionales cerrados y abiertos. Los canales pueden ser activados en respuesta a señales químicas o mecánicas. La eficacia del proceso de activación y la cinética de la inactivación o desensibilización posterior están reguladas por mecanismos intracelulares (Di Resta & Becchetti, 2010). Los canales iónicos poseen cierta especificidad, lo que significa que generalmente solo permiten que un tipo de ion pase a través de ellos. Los aminoácidos que recubren un canal y el ancho físico del canal determinan qué iones pueden moverse desde el exterior de la célula hacia su interior, y viceversa (Rosendo-Pineda et al., 2020).

En cuanto a su estructura (Figura 3), existen tres dominios funcionales significativos de todos los canales iónicos:

- Poro conductor: una vía acuosa para iones con un filtro de selectividad estrecho que distingue entre los iones que pasan y los iones que no lo hacen.
- Compuertas: una parte del canal que puede abrir y cerrar el poro conductor.
- Sensores: detectores de estímulos que responden a cambios de potencial eléctrico o señales químicas. Los sensores se acoplan a las puertas del canal para controlar la probabilidad de que se abran o cierren (Hille, 2008).

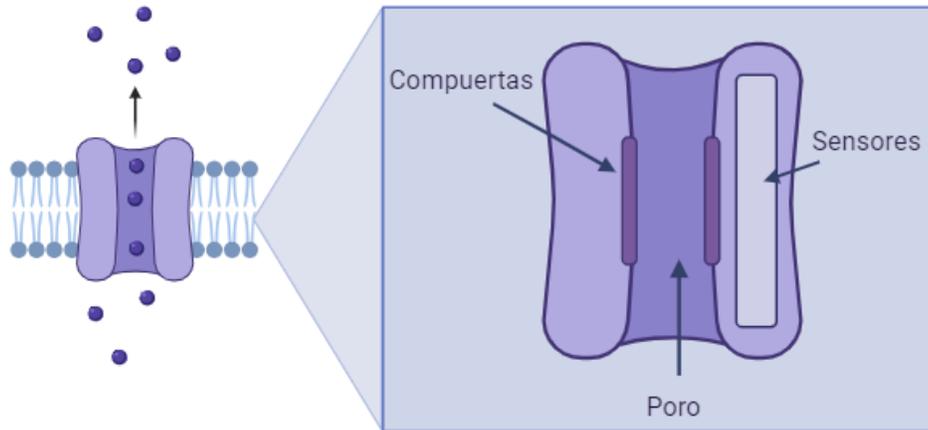


Figura 3. Esquema de la subunidad formadora del poro de un canal iónico. Representación de los sitios que participan en la formación del poro del canal, en el sensor de voltaje y en las compuertas de apertura y cierre del canal.

Los canales iónicos se pueden clasificar según su activación, es decir, el tipo de estímulo responsable de su apertura y cierre (Shad et al., 2018). Se dividen en:

- Canales iónicos dependientes de voltaje: conducen iones de acuerdo con el gradiente electroquímico, cuando se abren por voltaje. El potencial transmembrana controla el flujo de iones (por lo menos controla una de las puertas del canal). Con frecuencia son selectivos solamente a un tipo de ion, por lo tanto, son selectivamente permeables a los iones de sodio, potasio, calcio o de cloro (Loussouarn & Tarek, 2021).
- Canales iónicos dependientes de ligando: se abren por la unión de un ligando, como una hormona o un neurotransmisor (Barker et al., 2017). Se componen de dos componentes clave: un dominio de unión a ligando accesible desde la superficie celular y un dominio transmembrana que contiene un canal. La unión del ligando a la superficie exofacial del receptor genera un cambio conformacional que da como resultado la apertura de un poro, lo que permite que iones específicos viajen a través del canal a través de la membrana plasmática (Melmed et al., 2019).

1.1.5 Canales dependientes de voltaje

Los canales iónicos dependientes de voltaje son la familia de canales iónicos más grande y más extensamente estudiada. Poseen características estructurales modulares, como

dominios de detección de voltaje (sensor de voltaje) que rodean y forman conexiones mecánicas con los dominios formadores del poro. Tales características están íntimamente relacionadas con su función de detección y respuesta a cambios en el potencial de membrana (Zhang et al., 2018).

Se caracterizan por responder rápidamente a los cambios en el potencial de membrana, lo que da como resultado una conductancia iónica selectiva. La familia de canales dependientes de voltaje incluye canales de potasio dependientes de voltaje (K_v), canales de calcio (Ca_v), canales de cloro (ClC) y canales de sodio (Na_v) (Moran et al., 2015). Los canales dependientes de voltaje constan de cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene dos dominios principales: los dominios transmembrana S1 a S4 que constituyen un sensor de voltaje, y los dominios transmembrana S5 a S6 (y el bucle de reentrada que los conecta) que forman el poro permeable a los iones (Zhang et al., 2018).

Los canales iónicos dependientes de voltaje desempeñan un amplio espectro de procesos fisiológicos, incluyendo la contracción muscular, el sistema nervioso y el ritmo cardíaco (Li et al., 2019). Sin embargo, cuando los canales iónicos tienen defectos, ya sea por genética o factores adquiridos, empiezan a afectar los procesos que llevan a cabo, desarrollando así canalopatías. Las canalopatías se refieren a trastornos resultantes del funcionamiento defectuoso de los canales iónicos e incluyen trastornos neurológicos, cardiovasculares y musculares (Liang & Nishino, 2020). Aunque la definición de canalopatías difiera de la relación entre el mal funcionamiento de los canales y el cáncer, este último se sigue clasificando como canalopatía. Esto se debe a que, con la disfunción del canal, la oncogénesis progresa a fenotipo de cáncer cada vez más agresivo (Prevarskaya et al., 2018).

Los canales iónicos dependientes de voltaje participan en diversos procesos como son: el mantenimiento de la osmolaridad celular, la generación y mantenimiento del potencial de membrana, la invasión celular, la transducción de señales, la actividad transcripcional y la progresión del ciclo celular. Se ha reportado que la sobreexpresión de ellos puede conducir a la progresión tumoral y la metástasis en células de cáncer (Capatina et al., 2020). El cáncer se clasifica como una canalopatía, y por la relación que se ha hecho entre el cáncer y su progresión con los canales iónicos, estos últimos se han considerado

como posibles marcadores tumorales o dianas terapéuticas. Se han reportado un número creciente de datos experimentales y clínicos, los cuales respaldan la idea de que los canales iónicos pueden desempeñar un papel importante en la contribución de características distintivas en el cáncer de mama. Las acciones en las que se han involucrado la participación de los canales iónicos dependientes de voltaje en las células de cáncer son las siguientes: mantener la señalización proliferativa, permitir la replicación sin control, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, activar la invasión y la metástasis, y evadir la inmunodestrucción (Dowd et al., 2017).

Teniendo en cuenta el papel fundamental que desempeñan los canales iónicos dependientes de voltaje en la progresión del cáncer, especialmente en el cáncer de mama, estos pueden ser considerados objetivos potenciales en la investigación para el desarrollo de terapias eficaces. Los canales no solo pueden servir como marcadores tumorales, sino que también representan una prometedora vía terapéutica para abordar las características distintivas de esta enfermedad. Es por ello la importancia de seguir investigando el papel funcional de los canales iónicos en el desarrollo y progresión de esta patología, que permitan mejorar las estrategias de detección, diagnóstico oportuno y un tratamiento más efectivo que evite el desarrollo de metástasis tumoral.

1.1.6 Canales de sodio

Los canales de sodio activados por voltaje (Na_v) son proteínas integrales de membrana que cambian su conformación en respuesta a cambios de voltaje despolarizantes del potencial de membrana, permitiendo la apertura del canal y con ello la conducción de iones sodio a favor de su gradiente electroquímico (hacia el interior de la célula), iniciando la fase de despolarización del potencial de acción. Como resultado, los canales de sodio son fundamentales para la conducción nerviosa, la contracción del músculo esquelético y cardíaco, la secreción, y la neurotransmisión (Lenaeus et al., 2017).

La estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje consiste en una subunidad α formadora de poros a través de la cual pasará el ion sodio y una o dos subunidades β (Figura 4).

considerar que los canales de sodio se encuentran en uno de tres estados o configuraciones básicas. Por lo general, los canales de sodio se encuentran en un estado de reposo o “cerrado” en neuronas o células musculares que están en reposo (con un potencial de membrana de aproximadamente -60 a -80 mV). Los canales de sodio cerrados no conducen iones de sodio, pero están listos para ser activados o “abiertos” cuando son estimulados por la despolarización de la membrana. En el estado abierto, los canales de sodio activados por voltaje o dependientes de voltaje se abren, permitiendo el flujo de iones hacia el interior de la célula, despolarizándola y generando la fase ascendente del potencial de acción en células excitables; sin embargo, la mayoría de los canales de sodio transitan rápidamente al estado "inactivo" a potenciales despolarizados. En el estado inactivado, el poro del canal de sodio está ocluido, bloqueando así el flujo de iones de sodio y contribuyendo a la terminación de la fase despolarizante del potencial de acción (Cummins & Waxman, 2005).

El análisis de distintos tejidos tumorales ha mostrado que la concentración intrínseca de iones de sodio es significativamente mayor que en la de los tejidos normales, y esto se ha relacionado con la formación de tumores. Al regular la motilidad celular y la producción de enzimas proteolíticas, los canales de sodio cumplen una función reguladora crucial en las actividades celulares, incluidas la metástasis y la angiogénesis. Por ejemplo, se ha observado que una disfunción en la subunidad formadora del poro del canal, la subunidad Nav1.5 puede inducir a que las células cancerosas tengan un comportamiento altamente agresivo. Los inhibidores del canal Nav1.5 han demostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de varios cánceres, incluidos los de próstata, linfoma, mesotelioma y cáncer de cuello uterino. De esta manera, se les ha relacionado con la regulación del proceso cancerígeno, que incluye la proliferación celular y la invasividad. Sin embargo, no se conoce el mecanismo molecular implicado en el proceso antitumoral con la sobreexpresión y la modulación de la actividad de los canales Nav en las células tumorales, lo que refleja la necesidad de continuar llevando a cabo investigaciones exhaustivas y ensayos pertinentes que permitan dilucidar los procesos celulares relacionados con la sobreexpresión de los canales iónicos y el desarrollo del cáncer. (Li et al., 2019).

Se ha reconocido la presencia de canales de sodio en células no excitables como las células cancerosas y se ha demostrado que su sobreexpresión está asociada con el comportamiento metastásico en una variedad de cánceres humanos. La isoforma neonatal del subtipo canal de sodio dependiente de voltaje, Nav1.5 (nNav1.5) se sobreexpresa en la línea celular de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231 (Dutta et al., 2018). De la misma manera, la isoforma adulta (Nav1.5) se ha reportado expresada en cáncer metastásico de mama, como lo es el de la línea MDA-MB-231 (Rajaratnam et al., 2021). La activación y expresión anormales de Nav1.5 desencadenan una variedad de mecanismos celulares, incluido el cambio del flujo de salida de H⁺, la promoción de la transición epitelial a mesenquimatosa (EMT) y la expresión de cisteína catepsina, para potenciar la metástasis y la invasividad de las células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* (Luo et al., 2020). Sin embargo, aún no se tiene ningún tratamiento para inhibir los canales sobreexpresados en el cáncer de mama triple negativo.

1.1.7 Bloqueadores e inhibidores

La sobreexpresión de canales iónicos se ha relacionado con la quimiorresistencia, la proliferación y migración de las células cancerosas (Haworth & Brackenbury, 2019; Luo et al., 2020; Onkal et al., 2019). Estudios preclínicos han demostrado que los fármacos inhibidores y bloqueadores de canales pueden reducir el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Buyan et al., 2021). El mecanismo de acción propuesto de estos fármacos en general es la unión al canal y así prevenir el flujo de corriente iónica. La activación, el mecanismo que controla la apertura y el cierre de los canales iónicos, puede verse profundamente influenciado por los fármacos que bloquean los canales (Phillips et al., 2020).

En los canales de sodio, se han utilizado diversos fármacos para controlar la apertura y cierre de los canales como lo son la lidocaína o la propafenona (Kelly, 2021; Kirchhof, 2014). Los fármacos que han llegado a actuar como inhibidores o bloqueadores se encuentran entre los grupos de antiarrítmicos, la anestesia local o anticonvulsivos (Buyan et al., 2021).

A pesar de que distintos grupos de fármacos afectan a los canales de sodio, su mecanismo de bloqueo o inhibición es diferente:

- Los anestésicos locales inhiben los impulsos eléctricos interfiriendo selectivamente con los canales de sodio y bloqueando el flujo de iones de sodio en la membrana celular (la cual es necesaria para el rápido ascenso del potencial de acción) (Brummelhuis et al., 2021).
- Los antiepilépticos actúan como fármacos no selectivos, se unen y estabilizan preferentemente los canales en el estado inactivado no conductor, o también actúan sobre el estado de activación lenta de estos canales. Con esto bloquean el estado de inactivación rápida de los canales de sodio, y con ello, el flujo de iones. (Nguyen et al., 2019).
- Los antiarrítmicos de clase I (bloqueadores de canales de sodio) a pesar de pertenecer al mismo grupo, se ha reportado que pueden afectar distintos estados del canal de sodio, por ejemplo, la quinidina se une al canal en su estado activado e inactivado (Z. Li et al., 2021), ranolazina se une al canal en su estado activado. Lo que se ha descubierto es que, los fármacos tienden a afectar la región del filtro de selectividad del canal en los dominios III y IV, y esto ha demostrado afectar significativamente la inactivación lenta de los canales de Nav (Pal et al., 2021).

En un estudio realizado por Li et al. (2018), estudios clínicos retrospectivos sugieren que el uso de anestesia conduce a mejores resultados para los pacientes con cáncer. Los estudios de laboratorio han informado que las células de cáncer de mama son inhibidas por algunos anestésicos locales en concentraciones milimolares (R. Li et al., 2018). Uno de los anestésicos locales que ha llamado la atención por sus efectos con células cancerosas es lidocaína. Este fármaco es una aminoetilamida sintética la cual estabiliza la membrana neuronal al unirse e inhibir los canales de sodio dependientes de voltaje, lo que inhibe los flujos iónicos necesarios para el inicio y la conducción de los impulsos, y produce anestesia local (National Center for Biotechnology Information, 2022). Se usa clínicamente para inhibir las sensaciones de dolor. La administración sistémica de lidocaína tiene efectos antinociceptivos, antiarrítmicos, antiinflamatorios y antitrombóticos (Karnina et al., 2021).

Puesto que los anestésicos locales afectan los canales de sodio, se han realizado pruebas con lidocaína en varias líneas celulares de cáncer de mama, incluida la línea MDA-MB-231. Chamaraux et al. (2018) reportan que lidocaína tiene un efecto inhibitorio significativo sobre los procesos de migración y viabilidad de las células de cáncer triple negativo. Y que la línea MDA-MB-231 es más sensible a la lidocaína en comparación con otras líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y SK-BR-3), y esto fue reflejado en pruebas de viabilidad y en el crecimiento independiente del anclaje en agar blando de células MDA-MB-231. En la prueba de viabilidad lidocaína afectó a la línea de cáncer de mama triple negativo a una concentración de 0.5 mM, y en la prueba de crecimiento independiente del anclaje se observó un decremento en la formación de colonias de la línea MDA-MB-231 dependiente de la concentración de lidocaína (100 μ M, 500 μ M y 1mM). También se reportó que la lidocaína inhibió la migración de las células epiteliales de mama del tumor de cáncer de mama triple negativo a una concentración de 100 μ M, con un porcentaje de cierre de 10% (24 h) y de 30% (48h). En este trabajo, se demuestra que la lidocaína posee un efecto selectivo sobre la línea celular tumoral en comparación la línea celular epitelial de mama normal (100 μ M de lidocaína no afectó la migración de las células epiteliales de mama normales) (Chamaraux-Tran et al., 2018).

Enfocándose en los canales iónicos, la lidocaína es conocida por inhibir los canales de sodio y la línea MDA-MB-231 tiene una sobreexpresión de estos canales, por lo que se ha estudiado el efecto de este fármaco en los canales de sodio de la línea celular. Elajnaf et al. (2018) reportó que lidocaína tiene un efecto inhibitorio dependiente de concentración sobre los canales adultos y neonatales de Nav1.5, los cuales están sobreexpresados en la línea MDA-MB-231. (Elajnaf et al., 2018).

Otro fármaco que se ha utilizado para regular la sobreexpresión de los canales iónicos en las células cardiacas es la flecainida. Es un agente antiarrítmico con actividad estabilizadora de membrana, es decir, restaura la permeabilidad de la membrana, lo que permite el transporte iónico normal (Houang et al., 2019). La flecainida bloquea a los canales de sodio cardíacos dependientes del voltaje, lo que provoca la inhibición de la corriente de entrada de sodio máxima transitoria (I_{Na}) (Echt & Ruskin, 2020). Para el tratamiento de arritmias, flecainida inhibe a los canales de sodio de miocardio (afectando

en el proceso a las corrientes de Ca^{2+} y K^+) (Li et al., 2022), de los cuales Nav1.5 es la principal subunidad α formadora de poros que se encuentra en las células del corazón. La isoforma Nav1.5 es una proteína transmembrana que media principalmente en la corriente cardíaca de Na^+ (I_{Na}) en las células cardíacas (O' Brien et al., 2022). En el cáncer de mama triple negativo la expresión de proteínas y ARNm de la subunidad α Nav1.5 se correlaciona con el potencial metastásico, y la variante de empalme SCN5A neonatal se expresa más en las células metastásicas MDA-MB-231 que en otras células débilmente metastásicas (Song & Shou, 2012). A pesar del conocimiento del mecanismo de acción de flecainida en cardiomiocitos, poco se sabe sobre su efecto directo en líneas celulares asociadas al cáncer.

1.2 Planteamiento del problema

El término de cáncer designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo: casi 10 millones de fallecimientos en 2020 (OMS, 2022).

El cáncer de mama es un tipo de cáncer que inicia cuando las células comienzan a crecer sin control en la mama. Las células cancerosas de mama generalmente forman un tumor que a menudo se puede ver en una radiografía o se siente como un bulto (The American Cancer Society, 2019).

En 2020, hubo 2,3 millones de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y 685,000 muertes en todo el mundo. A finales de 2020, había 7,8 millones de mujeres vivas a las que se les diagnosticó cáncer de mama en los últimos 5 años, lo que lo convierte en el cáncer más prevalente en el mundo (OMS, 2021).

En octubre de 2021, el INEGI publicó la estadística de cáncer de mama en México. En 2020 fallecieron 97 323 personas por tumores malignos, de los cuales 7,880 fueron por tumores malignos de mama, lo que equivale a 8% de este total. Debido al cáncer de mama, en 2020 fallecieron 7 821 mujeres y 58 hombres. La tasa más alta de defunciones de mujeres por cáncer de mama se registra en el grupo de edad de 60 años o más (49.08 por cada 100 mil mujeres de este grupo de edad) (INEGI, 2021).

Un subtipo de cáncer de mama es el cáncer de mama triple negativo, el cual representa alrededor del 10 -15% de todos los cánceres de mama a nivel mundial. Este se considera un cáncer agresivo porque crece rápidamente, es más probable que se haya propagado en el momento en que se detecta, e igualmente es más probable que regrese después del tratamiento que otros tipos de cáncer de mama. En general, las perspectivas no son tan buenas como para otros tipos de cáncer de mama (The American Cancer Society, 2021). En México, el cáncer de mama triple negativo representa del 15 al 23% de todos los cánceres. Sus principales características incluyen el hecho de afectar principalmente

a pacientes menores de 40 años, que son negras, latinas o que tienen una mutación BRCA1 (The American Cancer Society, 2021).

El cáncer de mama triple negativo representa un subconjunto distinto de cánceres de mama que exhiben tanto un perfil molecular único como un conjunto de factores de riesgo, un patrón agresivo y temprano de metástasis, una falta relativa de dianas terapéuticas y un pronóstico desfavorable en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (Anders & Carey, 2009). Es por ello por lo que aún se requieren alternativas para lograr tratamientos complementarios eficaces que ayuden a erradicar los tumores y eviten el proceso de metástasis de la enfermedad.

Se han realizado innumerables investigaciones y estudios al respecto y, sin embargo, siguen existiendo muchas incógnitas respecto al por qué y el cómo erradicar o controlar el cáncer de mama triple negativo. Es por ello la importancia de seguir investigando la aparición de los distintos procesos tumorales, para un día llegar a una solución, y que este tipo de cáncer de mama deje de afectar a tanta población, y en un futuro erradicar el desarrollo de tumores. En este trabajo se plantea estudiar el efecto citotóxico de distintos fármacos en una línea celular de cáncer de mama, con la finalidad de establecer nuevas estrategias en la terapia oncogénica.

1.3 Justificación

El cáncer puede ser causado por diversos factores, incluyendo la exposición a sustancias que causan cáncer, ciertos comportamientos, la edad y mutaciones genéticas heredadas. El estudio de las causas de cáncer ayuda a los investigadores a entender el proceso de la carcinogénesis y a identificar factores de riesgo de cáncer genéticos, ambientales y del comportamiento (National Institute of Cancer, 2021).

El cáncer de seno es uno de los tipos de cáncer más comunes en la población femenina. En América latina, cada año más de 462,000 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama, y casi 100,000 mueren a causa de esta enfermedad (OMS, 2021). A nivel nacional, la tasa de mortalidad por cáncer de mama es de 17.19 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años o más (INEGI, 2021).

Aunque en la actualidad el catálogo de señales de identidad del cáncer es bastante amplio, los más comunes son proliferación incontrolada, resistencia a la muerte celular programada (apoptosis), la invasión tisular y metástasis y angiogénesis sostenida. Entre los genes afectados por el cáncer, se encuentran los que codifican los canales iónicos. Las proteínas de membrana responsables de la señalización dentro de la célula y entre las células, para el acoplamiento de eventos extracelulares con las respuestas intracelulares y para mantener los canales iónicos de homeostasis iónica intracelular, contribuyen en diversos grados a las características fisiopatológicas de cada sello distintivo del cáncer (Prevarskaya et al., 2018), es decir, se puede utilizar el estudio de los canales iónicos en el cáncer para plantear nuevas estrategias tanto para el tratamiento del cáncer como su detección.

Estudios han demostrado un incremento en la expresión de canales de sodio en células y tejidos de cáncer de mama humano metastásico, y que la motilidad direccional celular, la endocitosis y la invasión es potenciada por la actividad de estos canales iónicos (Fraser et al., 2005).

En la presente investigación se plantea estudiar el efecto de bloqueadores e inhibidores de canales iónicos y comparar su efecto en procesos de migración y en la viabilidad de

líneas celulares asociadas al cáncer de mama. Se pretende establecer una posible relación entre los procesos celulares de migración y viabilidad celular asociados a la expresión de los canales iónicos en líneas celulares tumorales.

1.4 Hipótesis

La flecainida disminuye significativamente la viabilidad y migración celular en la línea celular MDA-MB-231.

1.5 Objetivo

1.5.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de la flecainida sobre la viabilidad y migración celular en la línea celular MDA-MB-231.

1.5.2 Objetivos específicos

- 1.- Analizar el efecto de la flecainida sobre la migración celular en la línea celular MDA-MB-231.
- 2.- Determinar las curvas de crecimiento celular en presencia de flecainida en la línea celular MDA-MB-231.
- 3.- Evaluar el efecto de la flecainida sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231.

2. Metodología

2.1 Cultivo de las líneas celulares:

La línea celular MDA-MB-231 (American Type Culture Collection, USA) se cultivó en placas con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's 29édium) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco, USA) y una mezcla de antibiótico-antimicótico 2x (200 unidades/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomina y 0.50 µg/mL de anfotericina B (Gibco, USA), manteniéndose a 37°C en una incubadora con atmósfera de 5% CO₂ – 95% aire. El mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo realizando subcultivos de baja densidad cada 3 – 5 días. El método de dispersión celular para las resiembras consistió en aplicar a la monocapa celular: la solución de composición medio PBS + EDTA (Na₂ 0.5 mM) por 30 segundos, luego aplicar 1.5 ml de tripsina (0.125% p/v en medio PBS), detener la digestión enzimática agregando medio DMEM, para luego centrifugar la suspensión celular por 2 min a 2500 rpm. Finalmente, se desechó el sobrenadante, y el precipitado celular se resuspendió con 3 ml de medio DMEM.

2.2 Ensayo de herida

Para evaluar la migración celular se utilizó el ensayo de cierre de herida, cuyo procedimiento se detalla a continuación: las células MDA-MB-231 se sembraron con alta confluencia 48 horas previas al experimento, una vez alcanzada una confluencia del 90%, se realizaron varias heridas verticales (con una punta de micropipeta) en la monocapa. Después se realizaron lavados con solución buffer PBS para eliminar las células desprendidas, para finalmente agregar nuevo medio DMEM e iniciar el tratamiento con los distintos fármacos (en distintas concentraciones) añadiéndolos al medio. Después de los diferentes tiempos de exposición de las células al fármaco, se fotodocumentó la migración celular cada 24 horas usando un microscopio invertido. Las células tratadas y no tratadas (control negativo) con el fármaco se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ – 95% aire. Las pruebas se realizaron por triplicado en cultivos independientes. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software ImageJ, el cual es un programa de procesamiento de imágenes, y mediante un conteo de píxeles, se obtuvieron los resultados de la migración celular.

2.3 Evaluación de la viabilidad celular

Para la viabilidad celular, se realizó una estandarización de ensayos de conteo y viabilidad celular. Se establecieron los protocolos para realizarlas en condiciones controladas; para ello se llevó a cabo el recuento celular utilizando la cámara de Neubauer. Las células se tiñeron previamente con una solución de azul de tripano al 1% (Gibco, USA), Una vez preparada la muestra, se tomaron 10 μL de la solución, se agregó a la cámara de Neubauer, e inmediatamente se colocó en un microscopio para llevar a cabo el conteo celular. El azul de tripano permeó a las células no viables tiñéndolas de azul, mientras que las células viables se observaron intactas e incoloras. El conteo celular de ambos grupos se realizó por separado para obtener el número de células “muertas” y “vivas” por muestra. Finalmente, se obtuvo la concentración de células viables.

2.4 Plan de análisis de los resultados

Los resultados son expresados como la media \pm el error estándar (n = número de experimentos). Todos los gráficos y análisis de los datos experimentales se realizaron con el programa OriginPro (versión 8.5) (Origin Lab, 2010). Para evaluar la significancia estadística de los resultados obtenidos se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

3. Resultados y discusión

3.1 Resultados

3.1.1 Ensayo de herida

Los efectos de la migración celular fueron analizados con el ensayo de herida, en el cual se analizaron varias concentraciones de flecainida.

Primero se estandarizó el proceso del ensayo de cierre de herida. Durante este proceso se realizaron ensayos en condiciones control para estandarizar la prueba en nuestras condiciones experimentales, en la Figura 5 se muestra el ensayo de migración en la línea celular MDA-MB-231 en condiciones control. Como se puede observar, después de 24 horas de transcurrido el ensayo, las células migraron cerrando la herida por completo.

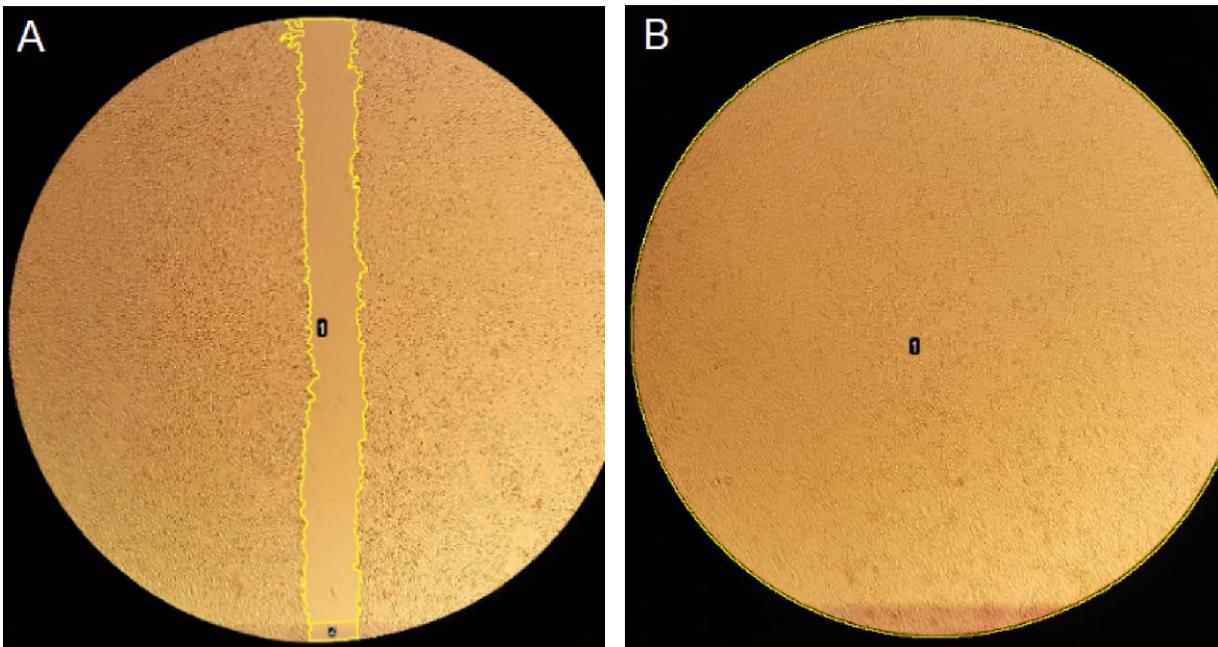


Figura 5. Ensayo de herida en condiciones control en la línea MDA-MB-231. Se muestran imágenes representativas (en aumento 5x) del ensayo de herida. (A) Se muestra la herida al inicio del ensayo (0 horas). (B) Herida después de transcurridas 24 horas.

Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente de los fármacos empleados en este trabajo. Por lo tanto, se realizaron los ensayos de migración en presencia del disolvente, y se probó la concentración máxima de DMSO, que se ha reportado que puede ser utilizada en estos ensayos, 0,5 % (Yuan et al., 2014) en la línea MDA-MB-231.

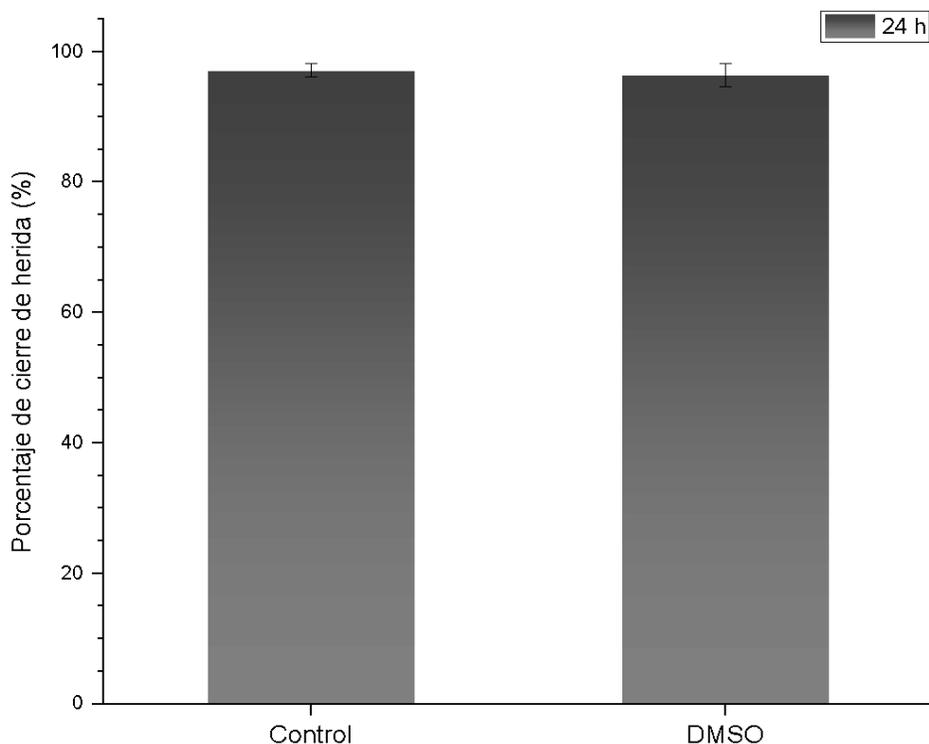


Figura 6. Gráfica de cierre de herida en condiciones control y en presencia de DMSO. El porcentaje de cierre del ensayo de herida se registró después de transcurridas 24 horas de la prueba de migración, en condiciones control (n=10) y en presencia de DMSO (n=8) en la línea celular MDA-MB-231.

En la gráfica de la Figura 6 se puede observar el ensayo de migración en la línea celular MDA-MB-231 con DMSO al 0.5%. Después de haber transcurrido 24 horas, se observa que el DMSO al 0.5% no afecta al cierre de herida, por lo que se fijó como la concentración máxima a utilizar en las pruebas con los fármacos.

Como referencia para observar el comportamiento de un bloqueador de canales de sodio, se realizó un ensayo de herida con Lidocaína (3 mM) (Figura 7), en la cual se observa que después de 24 horas de exposición al fármaco el proceso de migración disminuyó ($p < 0.05$). El porcentaje de cierre de herida con lidocaína fue mucho menor en comparación con los resultados control; la herida con lidocaína disminuyó un $52 \pm 6\%$. Esto nos demuestra que los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales son similares a lo reportado por distintos grupos de estudio, los cuales reportan una $EC_{50} = 3\text{mM}$ de lidocaína en la línea MDA-MB-231 (Li et al., 2018).

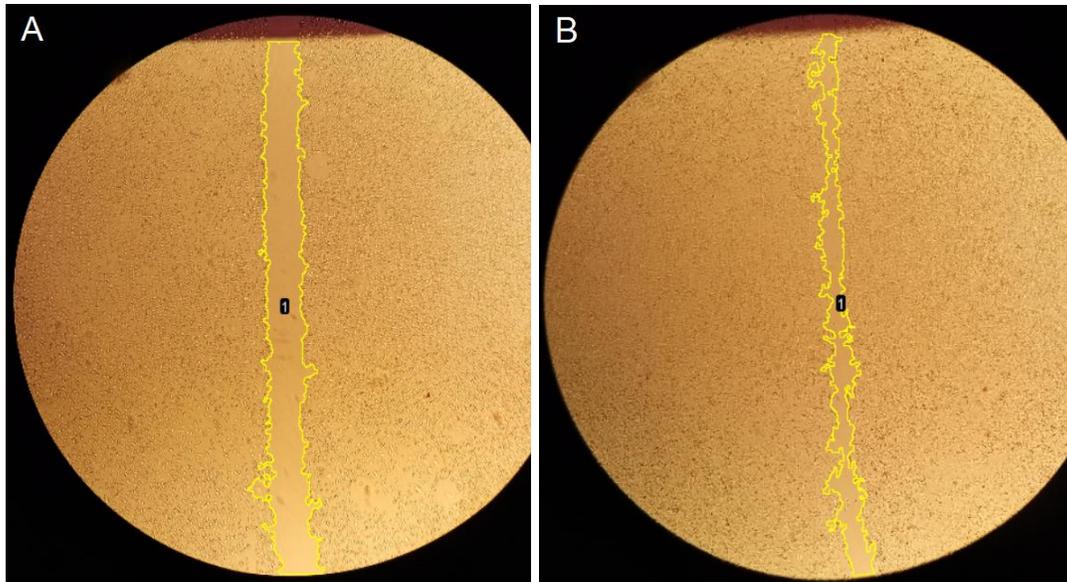


Figura 7. Ensayo de herida en presencia de lidocaína en la línea MDA-MB-231. Imágenes representativas del ensayo de herida (en aumento 5x) con concentración de 3 mM de lidocaína. (A) Se muestra la herida al inicio del ensayo (0 horas). (B) Herida después de la exposición a la lidocaína por 24 horas.

Posteriormente, se llevaron a cabo las pruebas con flecainida. Se realizó el ensayo de herida con las concentraciones de 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM y 400 μM . En la Figura 8 se puede observar el efecto de la flecainida sobre la migración celular en las células MDA-MB-231 en condiciones control y después de 24 horas de exposición a las distintas concentraciones del fármaco. Se puede apreciar el efecto de la flecainida sobre la migración celular, observándose que la flecainida disminuye el porcentaje de cierre del ensayo de herida en la línea celular MDA-MB-231 a medida que aumenta la concentración del fármaco.

En la Figura 9 se indica el porcentaje de herida en condiciones control y después de la exposición a flecainida. Las concentraciones y porcentajes de cierre fueron los siguientes: 10 μM ($93.9\% \pm 7.4\%$), 30 μM ($99.1\% \pm 0.3\%$), 100 μM ($72.6\% \pm 4\%$), 300 μM ($56.9\% \pm 8.2\%$) y 400 μM ($39.9\% \pm 3.4\%$). Los resultados obtenidos fueron a partir del análisis de los datos obtenidos del ensayo de herida después de transcurridas 24 horas de exposición al fármaco.

Como se puede apreciar, existe un efecto de disminución del porcentaje de cierre de herida dependiente de la concentración del fármaco; en donde, a mayor concentración de flecainida, mayor efecto en la migración de la línea celular MDA-MB-231. Esto se

demostró con la diferencia significativa ($p < 0.05$) que tienen las concentraciones 100 μM , 300 μM y 400 comparándolas con el control.

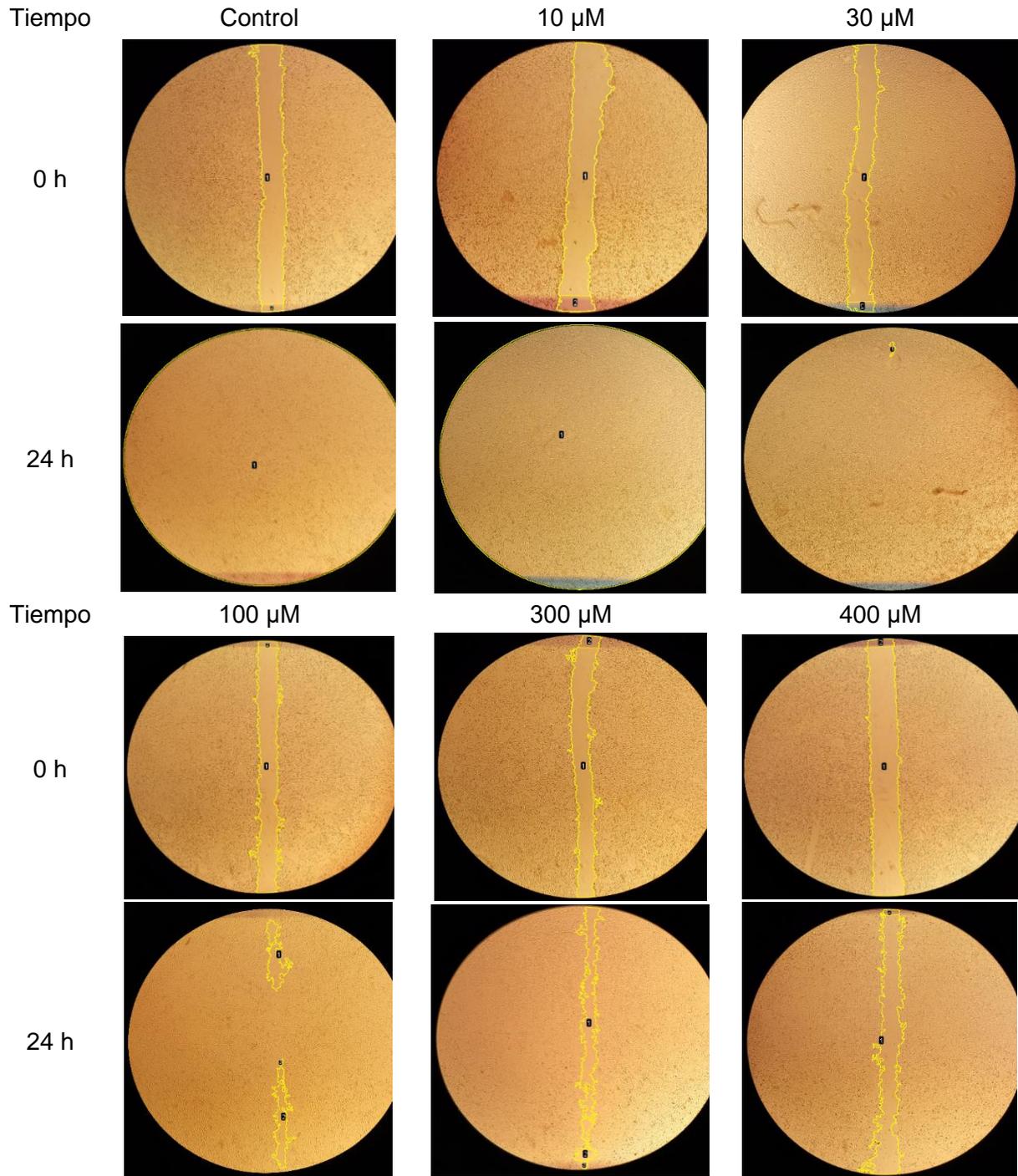


Figura 8. Ensayo de herida con diferentes concentraciones de flecainida. Imágenes representativas de ensayo de herida en la línea celular MDA-MB-231 a las 0 horas (condiciones control) y después de 24 horas de tratar a las células con concentraciones de 10, 30, 100, 300 y 400 μM de flecainida.

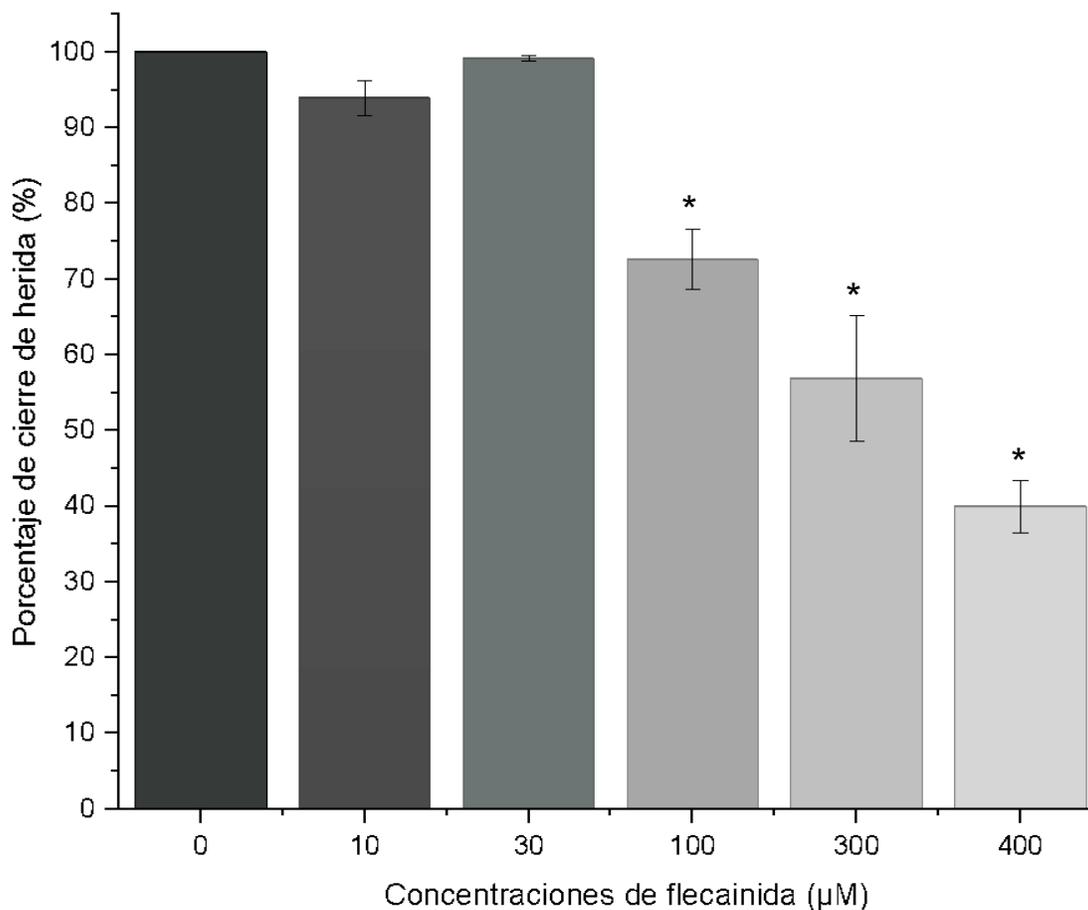


Figura 9. Cierre de herida con diferentes concentraciones de flecainida en la línea MDA-MB-231. Se realizaron las siguientes condiciones experimentales: control (n=10), 30 µM (n=9), 30 µM (n=6), 100 µM (n=12), 300 µM (n=9) y 400 µM (n=6), y se midió el porcentaje de cierre de herida después de 24 horas de transcurrida la prueba. * (p < 0.05).

Después de obtener el porcentaje de cierre con las diferentes concentraciones se realizó la curva de relación concentración-efecto de la flecainida sobre la migración celular, el ajuste de los datos permitió el cálculo (mediante la ecuación de Hill) de la EC_{50} , el cual representa la potencia de un fármaco, expresado como la concentración a la que el fármaco ejerce el 50% de su efecto máximo (Keiski, 2017). Se obtuvo que la EC_{50} de flecainida en la línea MDA-MB-231 es de $351 \mu M \pm 98$ (Figura 10).

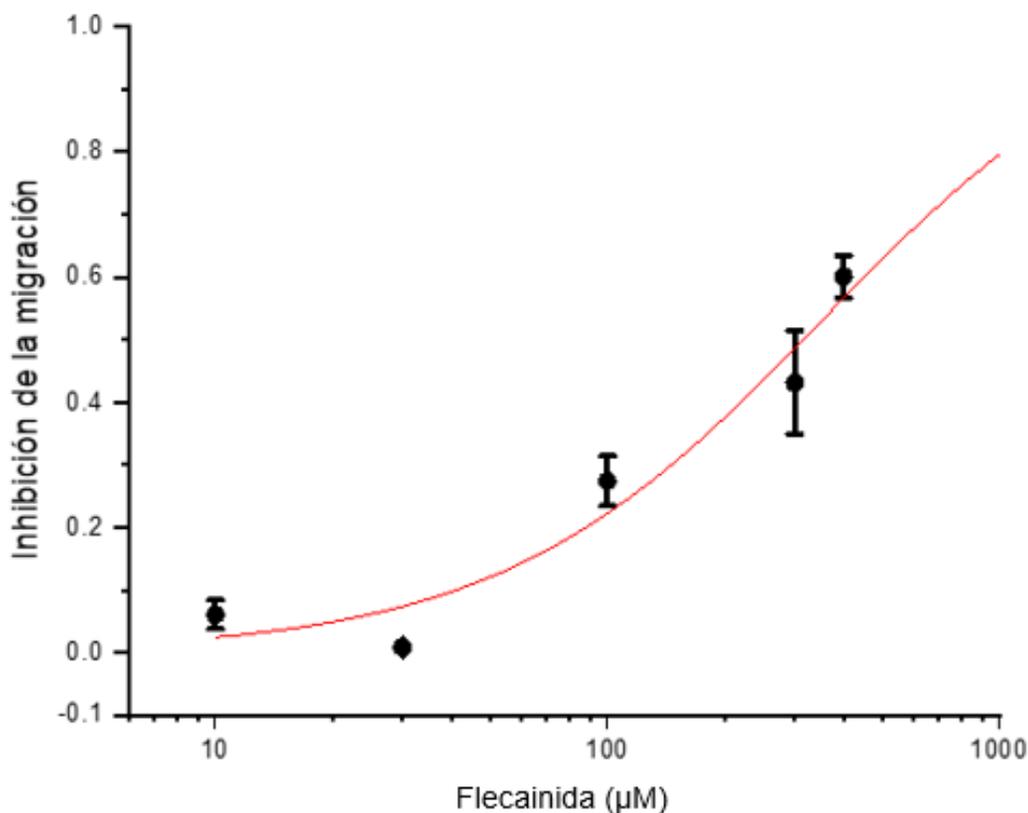


Figura 10. Curva de concentración-efecto de flecainida en la migración celular. EC_{50} [351 μ M] en la línea MDA-MB-231 en presencia de flecainida utilizando el ensayo de herida donde la exposición al fármaco fue 24h, mediante el uso de la ecuación de Hill.

3.1.2 Ensayo de viabilidad

Los efectos de flecainida sobre la viabilidad celular fueron analizados con conteos celulares utilizando el método de exclusión con azul de tripano al 1%. Con los datos obtenidos (células viables) se realizaron las curvas de crecimiento de la línea celular MDA-MB-231 en condiciones control y en presencia de flecainida (300 μ M).

En la Figura 11 se observa la gráfica del ensayo de viabilidad, la cual nos muestra la curva de crecimiento de la línea MDA-MB-231 en condiciones control y en presencia de flecainida. Para la realización de este ensayo se utilizó la concentración de 300 μ M de flecainida y se registraron el número de células vivas a las 48 h (n=7), 72 h (n=12), 96 h (n=9), 120 h (n=3) y 168 h (n=8). Como se puede observar en la Figura 11 existe una disminución significativa ($p < 0.05$) del número de células viables después de 72 y 96 horas de exposición al fármaco. Por ello se puede inferir que flecainida afecta a la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231.

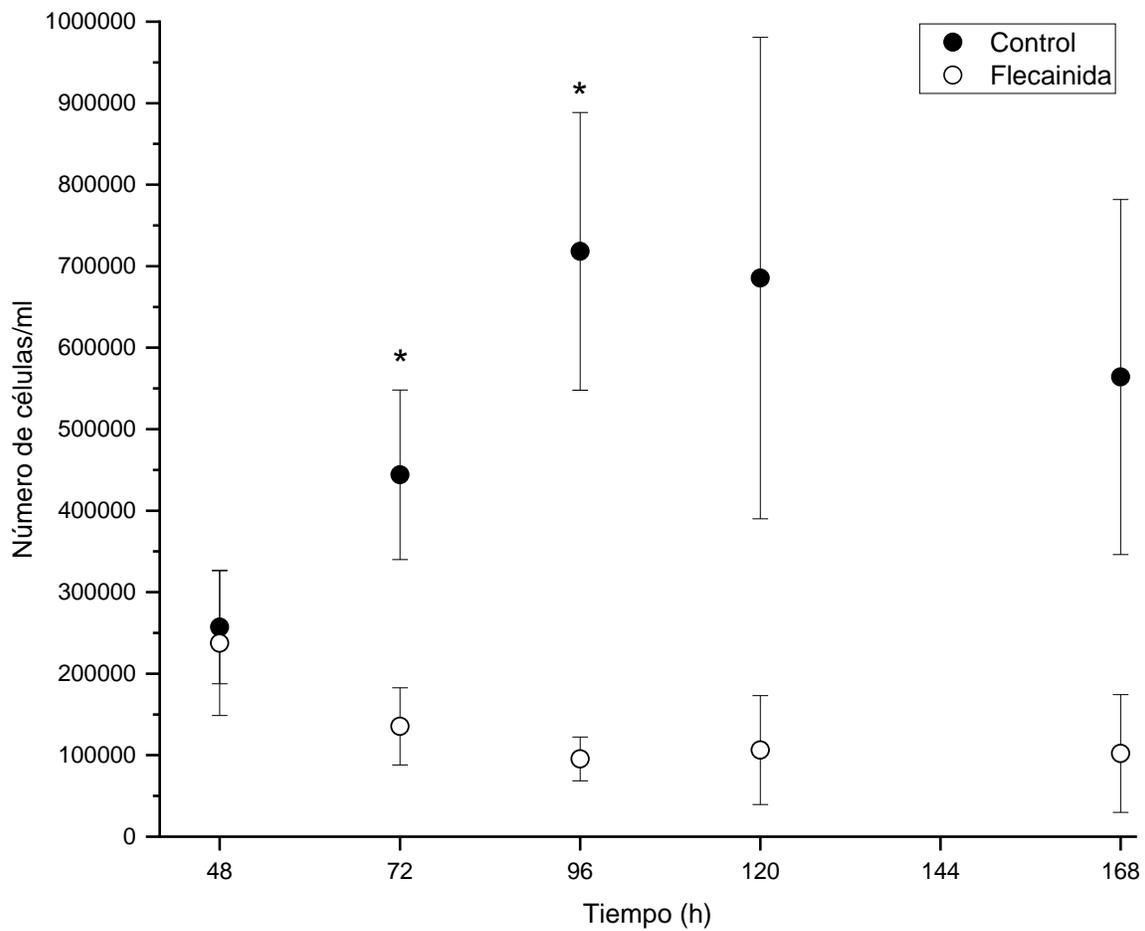


Figura 11. Curva de crecimiento de la línea celular MDA-MB-231. Representación de las curvas de crecimiento en condiciones control y en presencia de flecainida [300 μ M]. Se registraron y graficaron los resultados de los conteos celulares a las siguientes horas: 48h (n=7), 72h (n=12), 96h (n=10), 120h (n=3) y 168h (n=8). * ($p < 0.05$).

3.2 Discusión

En este trabajo se investigó la inhibición de la migración celular y la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231, asociada al cáncer de mama triple negativo, en presencia de flecainida. El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por ser un subtipo de cáncer agresivo y con mal pronóstico. Los tratamientos más utilizados son la quimioterapia y la extirpación de la mama, y estos no son tratamientos especializados para a este subtipo de cáncer de mama, además de que no son totalmente efectivos ya que el cáncer triple negativo tiene una alta tasa de recurrencia y es quimiorresistente (Landry et al., 2022). Actualmente, no hay terapias dirigidas aprobadas para el cáncer de mama triple negativo (Yin et al., 2020), por lo que es importante continuar con la búsqueda de tratamientos alternos. El estudiar el comportamiento de las células de cáncer de mama triple negativo ayuda a comprender su mecanismo de acción y a descubrir nuevos marcadores tumorales que contribuyan a proponer nuevos tratamientos que ayuden a mejorar el pronóstico de este subtipo de cáncer de mama. En este trabajo se encontró que la flecainida afecta tanto la viabilidad como la migración de la línea celular MDA-MB-231, y este efecto podría deberse a una acción del fármaco sobre los canales de sodio Nav1.5.

En años recientes se han realizado estudios donde observan el efecto de diferentes fármacos con las células de cáncer de mama triple negativo y los canales de sodio. Se encontraron diversos fármacos que afectaban los canales Nav1.5 en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, por ejemplo, la amilorida (medicamento para la hipertensión), fenitoína (antiarrítmico y antiepiléptico), ranolazina (medicamento para la angina de pecho crónica) (Luo et al., 2020; Spini et al., 2020). Otro grupo de fármacos que se han probado con este subtipo de cáncer son los anestésicos locales, los cuales han obtenido resultados que favorecen la inhibición de los canales Nav1.5. Uno de los anestésicos locales que han sido probados es lidocaína, la cual ha reportado resultados donde se inhibían canales de sodio en los ensayos de migración y viabilidad celular (Chamaroux-Tran et al., 2018), sin embargo, sus mecanismos de acción en el cáncer de mama triple negativo son inconclusos, por lo que se sigue con la búsqueda de fármacos que ayuden al tratamiento del cáncer triple negativo.

En este trabajo, se realizaron ensayos de migración celular y de viabilidad celular, en los cuales el fármaco a utilizar fue flecainida. Se utilizó lidocaína en el ensayo de migración para tener una referencia de cómo actúa la inhibición de la migración celular y para tener un punto de comparación cuando se utilizara la flecainida. En el ensayo de migración realizado con lidocaína se encontraron resultados similares a lo previamente documentado por Li et al. (2018), en el cual reportan que la lidocaína inhibe la viabilidad y migración de las células de cáncer de mama triple negativo. Al comparar los resultados obtenidos entre lidocaína y flecainida se observan diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas para ambos fármacos. Para inhibir la migración de las células MDA-MB-231 en un 50%, aproximadamente, se necesitó una menor concentración de flecainida [300 μ M] en comparación con la concentración utilizada de lidocaína [3 mM]. En cambio, en el estudio de Yang et al. (2012) donde se experimentó con fenitoína se obtuvo que inhibía a una menor concentración [200 μ M] la migración e invasividad de las células de cáncer de mama triple negativo. No obstante, a pesar de que fenitoína requiere una menor concentración para inhibir los canales, este fármaco no afecta la viabilidad o la proliferación de la línea MDA-MB-231 (Yang et al., 2012) por lo que se puede inferir que flecainida, a pesar de necesitar una mayor concentración para afectar la migración de la línea MDA-MB-231 en comparación con fenitoína, afecta de manera significativa la viabilidad y proliferación de la línea de cáncer de mama triple negativo, ya que flecainida si afecta la viabilidad de la línea MDA-MB-231. De acuerdo con los resultados encontrados en este trabajo y comparándolos con los resultados de otros fármacos con la misma línea celular, se infiere que la flecainida es más potente inhibiendo la migración celular de la línea celular MDA-MB-231 comparándose con los resultados de lidocaína, y que, en conjunto con los ensayos de viabilidad obtenidos en este trabajo, podría inferir que puede estar afectando estos procesos celulares por medio de la inhibición de los canales iónicos expresados en la línea celular.

En el ensayo de viabilidad se utilizó la concentración de 300 μ M de flecainida. Se observó que hubo una disminución en el número de células/ml de la línea MDA-MB-231 en presencia de flecainida y que el fármaco afectó la viabilidad en la fase de crecimiento exponencial de la línea celular. A partir de las 72 horas, se observó una detención en el crecimiento celular, y la cantidad de células/ml comenzó a disminuir. Este fenómeno

permite plantear que además de inhibir la migración celular, la flecainida afecta el crecimiento de las células asociadas al cáncer de mama triple negativo.

Se ha propuesto que los canales Nav1.5, los cuales se ha descrito están sobreexpresados en la línea MDA-MB-231, impulsan el comportamiento invasivo de migración del cáncer de mama triple negativo (Chamaroux-Tran et al., 2018; Luo et al., 2020). Una alternativa en la búsqueda de tratamientos que disminuyan la invasividad y con ello metástasis del cáncer triple negativo es el estudio de fármacos o metabolitos que sean capaces de inhibir el canal Nav1.5, y con ello regular la migración de las células asociadas al cáncer triple negativo. Flecainida es un fármaco antiarrítmico reconocido por bloquear canales de sodio en células cardiacas (Arunachalam & Alzahrani, 2022). Distintos trabajos han reportado que la flecainida es un bloqueador del canal Nav1.5, por ejemplo: se ha estudiado que bloquea la corriente de Na⁺ producida por los canales Nav1.5 expresados en ovocitos (Jiang et al., 2020; Ramos & O'Leary, 2004). La flecainida actúa sobre el estado activado y abierto del canal Nav1.5, obteniendo acceso a un sitio de unión transmembrana donde bloquea el poro e inhibiendo Na⁺ que entran a la célula (Salvage et al., 2018). Ramos y O'Leary (2004) realizaron el análisis del efecto de la flecainida en el canal adulto de Nav1.5 en ovocitos y obtuvieron que la concentración de flecainida que inhibe al canal en un 50% fue de 345 µM (EC₅₀ = 345 ± 15 µM). En los ensayos de herida realizados en este trabajo, se probaron distintas concentraciones, y se observó un efecto dependiente de la concentración, a mayor concentración, mayor fue la inhibición de la migración de la línea celular MDA-MB-231. Las concentraciones de 300 µM y 400 µM obtuvieron un efecto inhibitorio estadísticamente significativo sobre el proceso de migración de la línea MDA-MB-231 (p < 0.05). Al comparar las concentraciones de flecainida que inhibieron la migración celular en el ensayo de herida realizado y la concentración de flecainida en el estudio de Ramos y O'Leary (2004), se puede observar que las concentraciones de EC₅₀ son parecidas. La línea MDA-MB-231 sobreexpresa los canales de Nav1.5 (los cuales hacen que resulte el aumento migración celular del cáncer de mama triple negativo); estudios han demostrado que la flecainida inhibe los canales Nav1.5 en otros tipos de células con concentraciones similares. Además, se han realizado estudios con otros antiarrítmicos, en los cuales se ha analizado como afectan a los canales Nav1.5 en concentraciones similares a las

utilizadas en este trabajo en la misma línea celular. Si lo reportado se compara con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede plantear que la flecainida podría estar inhibiendo los canales Nav1.5 en la línea celular MDA-MB-231.

El cáncer de mama triple negativo se distingue por su proceso metastásico. La metástasis consiste en que las células se desprenden del tumor primario y logran llegar y generar tumores secundarios en otros sitios (fuera de la mama en este caso). Estudios han demostrado que las células de cáncer de mama triple negativo, además de cambiar sus procesos metabólicos al desprenderse del tumor primario, para poder sobrevivir a la circulación y tejidos de otros órganos obtienen nutrientes de los microambientes, los cuales consisten en un área con una composición específica de componentes principalmente de la matriz extracelular que rodea las células (Malmström, 2022; Roshanzamir et al., 2022). Los canales de sodio dependientes de voltaje han sido relacionados con una mayor motilidad celular, tasa de proliferación y potencial metastásico en las células cancerosas en comparación con las células cancerosas que no los expresan (Angus & Ruben, 2019). Uno de los canales que se sobreexpresa en las células cancerosas es el canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.5 (Luo et al., 2020).

El modelo propuesto para explicar como el canal Nav1.5 afecta la invasividad de las células de cáncer de mama triple negativo es el siguiente: en las células mamarias, el canal Nav1.5 está coexpresado con el intercambiador NHE-1 (ver Figura 12). El NHE-1 es un intercambiador de Na^+/H^+ , en el cual las corrientes de iones Na^+ regulan la entrada de los iones H^+ ; y se ha reportado que su papel fundamental es la regulación del pH intracelular (Dong et al., 2021). Luo et al. (2020) proponen que el canal Nav1.5 sobreexpresado en las células de cáncer de mama triple negativo modifica la actividad de NHE-1, causando que exista un mayor flujo de salida de H^+ al espacio extracelular y una mayor entrada de Na^+ al espacio intracelular. Por consecuencia, el medio extracelular se acidifica, y esto favorece la actividad proteolítica de las catepsinas de cisteína (Cat) y las metaloproteinasas de matriz (MMP). Al aumentar la proteólisis de las enzimas, la invasividad de las células de cáncer de mama aumenta (Luo, et al., 2020).

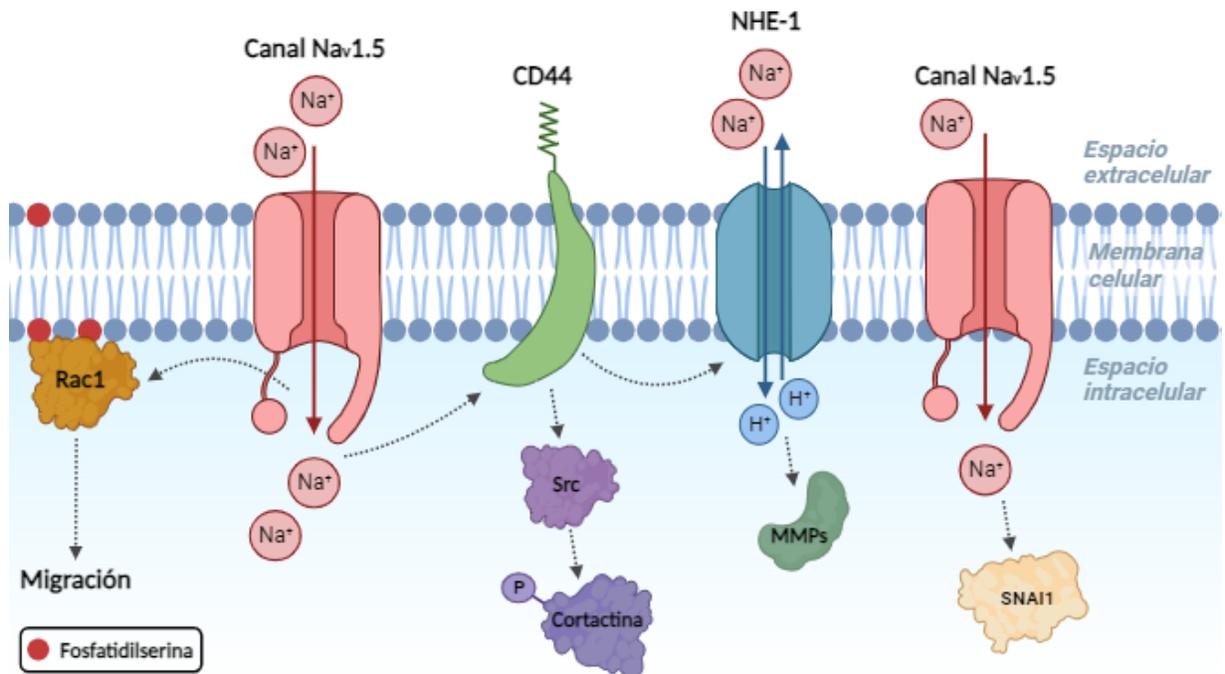


Figura 12. Modelo de sobreexpresión del canal Nav1.5 en el cáncer de mama triple negativo (Modificado de Rajaratnam et al., 2022). Los canales de sodio afectan al intercambiador NHE-1, el cual regula el pH intracelular. Esto causa un desbalance en los iones H^+ y Na^+ , lo que hace una acidificación del medio extracelular. Como resultado del pH bajo, las catepsinas de cisteína realizan su actividad proteolítica, lo que conduce a la degradación de la matriz extracelular y facilita la invasión de células cancerosas.

En el mismo modelo también existen otros elementos, como lo es el eje de señalización CD44-src-cortactina, el cual aumenta la eficacia de las metástasis a distancia en el cáncer de mama por la regulación negativa de Nav1.5. Otro elemento que afecta el canal Nav1.5 es Rac1, el por medio de su activación manipula la migración celular en respuesta a cambios iónicos (Rajaratnam et al., 2022). Por último, se tiene a SNAI1, la cual es una proteína que promueve la transición epitelio-mesénquima y la metástasis (Tsirigoti et al., 2022). Por lo tanto, la sobreexpresión de los canales iónicos, específicamente de la isoforma Nav1.5 puede ser un elemento esencial en la invasividad del cáncer de mama triple negativo y, por ende, estudios enfocados en regular la tasa acelerada de proliferación y la metástasis a través del bloqueo o inhibición de los canales sobreexpresados de Nav1.5 en las células de cáncer de mama triple negativo podría ser clave en el tratamiento de esta enfermedad. Flecainida podría ser un fármaco adecuado en la búsqueda de un tratamiento más eficaz, además de que estudios más detallados del efecto de flecainida (y de otros fármacos bloqueadores de canales iónicos) en la línea

celular de cáncer triple negativo aportarían elementos significativos para dilucidar, y con ello reducir el proceso metastásico altamente recurrente del cáncer de mama triple negativo.

3.3 Conclusiones

El cáncer de mama triple negativo es un subtipo de cáncer de mama que se caracteriza por no expresar receptores de estrógeno, progesterona o HER2. Debido a esta particularidad, este subtipo de cáncer tiene opciones de tratamiento limitadas, que son principalmente la quimioterapia y la mastectomía. Además de carecer de receptores hormonales, las células cancerosas triple negativas muestran una notable resistencia a la quimioterapia, lo que lleva a una mayor recurrencia de la enfermedad en un período más corto. Por tanto, la investigación de nuevos marcadores tumorales se vuelve crucial para mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento de esta forma de cáncer de mama.

Distintos trabajos han observado que la sobreexpresión de los canales iónicos de dependientes de voltaje afecta en la progresión del cáncer. En el cáncer de mama triple negativo se sobreexpresan los canales Nav1.5, los cuales hacen que sea más agresivo y aumentan la proliferación e invasión de las células. Para detener esta sobreexpresión del canal se utilizan los bloqueadores o inhibidores, fármacos que ayudan a detener el flujo anormal de iones. En este trabajo se evaluó flecainida, un fármaco antiarrítmico que podría estar afectando los canales Nav1.5 sobreexpresados en la línea celular MDA-MB-231.

La administración de flecainida en ensayos de migración y viabilidad celular resultó en una disminución significativa de la migración celular y una inhibición de la viabilidad de las células MDA-MB-231. Con base en los resultados obtenidos y en la evidencia existente en la literatura científica reportada, se puede inferir que la flecainida afecta a los canales iónicos en la línea de cáncer de mama triple negativo. Este fármaco, por lo tanto, podría considerarse como un recurso potencial en la búsqueda de tratamientos adyuvantes para este tipo de cáncer.

Sin embargo, es importante señalar que se requiere una mayor investigación para comprender el mecanismo de acción de los canales Nav1.5 en el cáncer triple negativo, así como para corroborar la selectividad de la flecainida sobre este tipo de canales iónicos. Este trabajo representa un paso significativo en la exploración de terapias innovadoras para el cáncer de mama triple negativo, pero queda trabajo por hacer para

profundizar en nuestra comprensión y desarrollar enfoques terapéuticos más precisos y efectivos.

4. Referencias

- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 1–23. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- Anders, C. K., & Carey, L. A. (2009). Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 9(SUPPL.2), S73–S81. <https://doi.org/10.3816/CBC.2009.s.008>
- Angus, M., & Ruben, P. (2019). Voltage gated sodium channels in cancer and their potential mechanisms of action. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1666455>, 13(1), 400–409. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1666455>
- Arunachalam, K., & Alzahrani, T. (2022). Flecainide. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61751-9>
- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P. H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2010). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology* 2011 24:2, 24(2), 157–167. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>
- Barker, B. S., Young, G. T., Soubrane, C. H., Stephens, G. J., Stevens, E. B., & Patel, M. K. (2017). Ion Channels. In *Conn's Translational Neuroscience* (pp. 11–43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00002-6>
- Bergin, A. R. T., & Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Research* 2019 8:1342, 8, 1342. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>
- Brummelhuis, I. S., Fiascone, S. J., Hasselblatt, K. T., Frenzl, G., & Elias, K. M. (2021). Voltage-gated sodium channels as potential biomarkers and therapeutic targets for epithelial ovarian cancer. *Cancers*, 13(21). <https://doi.org/10.3390/cancers13215437>
- Buyan, A., Whitfield, A. A., & Corry, B. (2021). Differences in local anaesthetic and antiepileptic binding in the inactivated state of human sodium channel Nav1.4. *Biophysical Journal*, 120(24), 5553–5563. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.014>
- Cancer UK. (2020). <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts>. *Cancer UK*. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts>

- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2019). Voltage-gated sodium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2019(4). <https://doi.org/10.2218/GTOPDB/F82/2019.4>
- Chamaroux-Tran, Akladios Cherif, Diemunsch Pierre, Tomasetto Catherine, Joshi Girish P., Aprahamian Marc, & Mathelin Carole. (2018). Antitumor Effects of Lidocaine on Human Breast Cancer Cells: An In Vitro and In Vivo Experimental Trial. *Anticancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12196>
- Chen, S., Kok, V. C., Cao, S., Chen, H., Wu, J., Zhang, Z., Tang, Y., Li, X., Liu, S., & Li, X. (2018). Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology | Www.Frontiersin.Org*, 1, 909. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00909>
- Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2005). Neuronal Blocking Factors in Demyelinating Diseases. *Multiple Sclerosis as A Neuronal Disease*, 317–326. <https://doi.org/10.1016/B978-012738761-1/50023-7>
- De Ruijter, T. C., Jü Rgen Veeck, •, De Hoon, J. P. J., Van Engeland, M., & Tjan-Heijnen, V. C. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137, 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0957-x>
- Di Resta, C., & Becchetti, A. (2010). Introduction to ion channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 674, 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6066-5_2
- Dong, Y., Gao, Y., Ilie, A., Kim, D., Boucher, A., Li, B., Zhang, X. C., Orlowski, J., & Zhao, Y. (2021). Structure and mechanism of the human NHE1-CHP1 complex. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23496-z>
- Dutta, S., Lopez Charcas, O., Tanner, S., Gradek, F., Driffort, V., Roger, S., Selander, K., Velu, S. E., & Brouillette, W. (2018). Discovery and evaluation of nNav1.5 sodium channel blockers with potent cell invasion inhibitory activity in breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(9), 2428–2436. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2018.04.003>
- Echt, D. S., & Ruskin, J. N. (2020). *Use of Flecainide for the Treatment of Atrial Fibrillation*. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2019.12.041>
- Elajnaf, T., Baptista-Hon, D. T., & Hales, T. G. (2018). Potent inactivation-dependent inhibition of adult and neonatal NaV1.5 channels by lidocaine and levobupivacaine. *Anesthesia and Analgesia*, 127(3), 650–660. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000003597>

- Eskiler, G., Cecener, G., Egeli, U., & Tunca, B. (2018). *Triple negative breast cancer: new therapeutic approaches and BRCA status*. <https://doi.org/10.1111/apm.12836>
- Fatima, M., Abourehab, M. A. S., Aggarwal, G., Jain, G. K., Sahebkar, A., & Kesharwani, P. (2022). Advancement of cell-penetrating peptides in combating triple-negative breast cancer. *Drug Discovery Today*, 27(11), 103353. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103353>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2018.05.001>
- Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J. Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., & Djamgoz, M. B. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>
- Gilchrist, D. (2023, October 16). *Mutation*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mutation>
- Haworth, A. S., & Brackenbury, W. J. (2019). Emerging roles for multifunctional ion channel auxiliary subunits in cancer. *Cell Calcium*, 80, 125–140. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2019.04.005>
- Hernandez, C. M., & Richards, J. R. (2022). Physiology, Sodium Channels. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545257/>
- Hille, B. (2008). Ion channels. *Scholarpedia*, 3(10), 6051. <https://doi.org/10.4249/SCHOLARPEDIA.6051>
- Houang, E. M., Bartos, J., Hackel, B. J., Lodge, T. P., Yannopoulos, D., Bates, F. S., & Metzger, J. M. (2019). *Cardiac Muscle Membrane Stabilization in Myocardial Reperfusion Injury*. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.01.009>
- INEGI. (2021). *Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)*. <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492>
- Jaber, N. (2021). *Sacituzumab Earns Regular FDA Approval for TNBC - NCI*. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2021/sacituzumab-govitecan-tnbc-regular-approval>

- Jiang, D., Shi, H., Yoshioka, C., Zheng, N., Catterall, W. A., Tonggu, L., Gamal El-Din, T. M., Lenaeus, M. J., & Zhao, Y. (2020). Structure of the Cardiac Sodium Channel In Brief Article Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell*, *180*, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.041>
- Jitariu, A.-A., Cîmpean, A. M., Ribatti, D., & Raica, M. (2017). Triple negative breast cancer: the kiss of death. *Oncotarget*, *8*(28), 46652–46662. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16938>
- Kabel, A. M. (2017). Tumor markers of breast cancer: New prospectives. *Journal of Oncological Science*, *3*(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.01.001>
- Karnina, R., Arif, S. K., Hatta, M., & Bukhari, A. (2021). Molecular mechanisms of lidocaine. *Annals of Medicine and Surgery*, *69*. <https://doi.org/10.1016/J.AMSU.2021.102733>
- Keiski, M. A. (2017). Memantine: A Safe and Tolerable NMDA Antagonist with Potential Benefits in Traumatic Brain Injury. *New Therapeutics for Traumatic Brain Injury: Prevention of Secondary Brain Damage and Enhancement of Repair and Regeneration*, 253–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802686-1.00016-X>
- Kelly, M. A. (2021). Neurological complications of cardiovascular drugs. *Handbook of Clinical Neurology*, *177*, 319–344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819814-8.00020-2>
- Kirchhof, P. (2014). New Antiarrhythmic Drugs and New Concepts for Old Drugs. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside: Sixth Edition*, 1111–1119. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2856-5.00112-6>
- Kothari, C., Diorio, C., & Durocher, F. (2020). Molecular Sciences The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5760), 3–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21165760>
- Landry, I., Sumbly, V., & Vest, M. (2022). *Advancements in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer: A Narrative Review of the Literature*. <https://doi.org/10.7759/cureus.21970>
- Lastraioli, E. (2020). Focus on Triple-Negative Breast Cancer: Potassium Channel Expression and Clinical Correlates. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00725>
- Lee, A., & Djamgoz, M. B. A. (2018). Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. *Cancer Treatment Reviews*, *62*, 110–122. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2017.11.003>

- Lenaeus, M. J., Gamal El-Din, T. M., Ing, C., Ramanadane, K., Pomès, R., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2017). Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(15), E3051–E3060. https://doi.org/10.1073/PNAS.1700761114/SUPPL_FILE/PNAS.201700761SI.PDF
- Li, R., Xiao, C., Liu, H., Huang, Y., Dilger, J. P., & Lin, J. (2018). Effects of local anesthetics on breast cancer cell viability and migration. *BMC Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4576-2>
- Li, Y., Peng, X., Lin, R., Wang, X., Liu, X., Bai, R., Ma, C., Tang, R., Ruan, Y., & Liu, N. (2022). The Antiarrhythmic Mechanisms of Flecainide in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.850117>
- Li, Z., Xueqin, J., Ong Wu, T., Aoxingyu Huang, G., Wu, U., Lei, J., Panand, X., & Yan, N. (2021). Structural Basis for Pore Blockade of the Human Cardiac Sodium Channel Nav1.5 by the Antiarrhythmic Drug Quinidine. *Angewandte Chemie*, *60*(133), 11575–11581. <https://doi.org/10.1101/2019.12.30.890681>
- Li, Z.-M., Chen, L.-X., & Li, H. (2019). Voltage-gated Sodium Channels and Blockers: An Overview and Where Will They Go? *. *Current Medical Science*, *39*(6). <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2117-0>
- Liang, W. C., & Nishino, I. (2020). Limb-girdle muscular dystrophy. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease: Volume 2*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813866-3.00025-4>
- Liwski, C. R., Castonguay, M. C., Barnes, P. J., Rayson, D., & Bethune, G. C. (2022). HER2 testing in metastatic breast cancer – Is reflex ISH testing necessary on HER2 IHC-equivocal (2+) cases? *Annals of Diagnostic Pathology*, *59*, 151953. <https://doi.org/10.1016/J.ANNDIAGPATH.2022.151953>
- Loussouarn, G., & Tarek, M. (2021). Editorial: Molecular Mechanisms of Voltage-Gating in Ion Channels. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 2531. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.768153/BIBTEX>
- Lu, C., Ma, Z., Cheng, X., Wu, H., Tuo, B., Liu, X., & Li, T. (2020). Pathological role of ion channels and transporters in the development and progression of triple-negative breast cancer. In *Cancer Cell International* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01464-9>
- Luo, Q., Wu, T., Wu, W., Gong, C., Luo, X., Jiang, L., Tao, H., Rong, M., Kang, S., & Deng, M. (2020). The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in

- Metastatic Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 11(1111), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01111>
- Malmström, A. (2022). The importance of lung microenvironment. *3D Lung Models for Regenerating Lung Tissue*, 37–48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90871-9.00013-9>
- Mao, W., Zhang, J., Körner, H., Jiang, Y., & Ying, S. (2019). The Emerging Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Tumor Biology. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00124>
- Masuda, H., Harano, K., Miura, S., Wang, Y., Hirota, Y., Harada, O., Mohit, ;, Jolly, K., Matsunaga, Y., Lim, B., Wood, A. L., Parinyanitikul, N., Hee, ;, Lee, J., Gyungyub Gong, ;, George, J. T., Levine, ; Herbert, Lee, J., Wang, X., ... Ueno, N. T. (2022). *Changes in Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes in Patients Without Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Systemic Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1200/PO.20>
- Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Manuel Hernández Hernández, J., Rotello, V. M., & Tapia Ramirez, J. (2020). *Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies*. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>
- Mehrgou, A., & Akouchekian, M. (2016). The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med J Islam Repub Iran*, 30(15), 369. <http://mjiri.iums.ac.ir>
- Melmed, S., Koenig, R., Rosen, C., Auchus, R., & Goldfine, A. (2019). Williams Textbook of Endocrinology - 14th Revised Edition. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 15(3), 416–416. <https://doi.org/10.4183/aeb.2019.416>
- Moran, Y., Barzilai, M. G., Liebeskind, B. J., & Zakon, H. H. (2015). Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 515–525. <https://doi.org/10.1242/JEB.110270>
- Nagpal, M., Singh, S., Singh, P., Chauhan, P., & Zaidi, M. (2016). Tumor markers: A diagnostic tool. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.196135>
- National Center for Biotechnology Information. (2022). PubChem Compound Summary for CID 3676, Lidocaine. In *PubChem*.
- National Institute of Cancer. (2021). *¿Qué es el cáncer?* <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

- National Institutes of Health, B. S. C. (2007). *Understanding Cancer*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- Nguyen, P. T., DeMarco, K. R., Vorobyov, I., Clancy, C. E., & Yarov-Yarovoy, V. (2019). Structural basis for antiarrhythmic drug interactions with the human cardiac sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(8), 2945–2954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817446116>
- O' Brien, S., Holmes, A. P., Johnson, D. M., Kabir, S. N., O' Shea, C., O' Reilly, M., Avezzu, A., Reyat, J. S., Hall, A. W., Apicella, C., Ellinor, P. T., Niederer, S., Tucker, N. R., Fabritz, L., Kirchhof, P., & Pavlovic, D. (2022). Increased atrial effectiveness of flecainide conferred by altered biophysical properties of sodium channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 166, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.01.009>
- O'Connor, C., Adams, J., & Fairman, J. (2014). *Essentials of Cell Biology*. <https://www.nature.com/scitable/ebooks/cell-biology-for-seminars-14760004/>
- OMS. (2021). *Cáncer de mama*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- OMS. (2022). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Onkal, R., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B. A. (2019). Cationic Modulation of Voltage-Gated Sodium Channel (Nav1.5): Neonatal Versus Adult Splice Variants - 1. Monovalent (H⁺) Ions. *Bioelectricity*, 1(3), 139–147. <https://doi.org/10.1089/bioe.2019.0012>
- Origin Pro, Version 8.5. (2010). *OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA.
- Pagliuca, M., Donato, M., D'Amato, A. L., Rosanova, M., Russo, A. O. M., Scafetta, R., De Angelis, C., Trivedi, M. V., André, F., Arpino, G., Del Mastro, L., De Laurentiis, M., Puglisi, F., & Giuliano, M. (2022). New steps on an old path: novel estrogen receptor inhibitors in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 103861. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103861>
- Pal, R., Kumar, B., Jawaid Akhtar, M., & Chawla, P. A. (2021). Voltage gated sodium channel inhibitors as anticonvulsant drugs: A systematic review on recent developments and structure activity relationship studies. *Bioorganic Chemistry*, 115, 105230. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105230>
- Patel, A. (2020). Benign vs Malignant Tumors. In *JAMA Oncology* (Vol. 6, Issue 9, p. 1488). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>

- Phillips, M. B., Nigam, A., & Johnson, J. W. (2020). Interplay between Gating and Block of Ligand-Gated Ion Channels. *Brain Sciences* 2020, Vol. 10, Page 928, 10(12), 928. <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI10120928>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion channels in cancer: Are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiological Reviews*, 98(2), 559–621. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00044.2016/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0011828350005.JPEG>
- Pu, H., Wen, X., Luo, D., & Guo, Z. (2022). Regulation of progesterone receptor expression in endometriosis, endometrial cancer, and breast cancer by estrogen, polymorphisms, transcription factors, epigenetic alterations, and ubiquitin-proteasome system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 106199. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2022.106199>
- Rajaratnam, H., Mokhtar, N. F., Asma-abdullah, N., & Fuad, W. E. M. (2022). Discovering the Triad between Nav1.5, Breast Cancer, and the Immune System: A Fundamental Review and Future Perspectives. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12020310>
- Rajaratnam, H., Rasudin, N. S., Al Astani, T. A. D., Mokhtar, N. F., Yahya, M. M., Zain, W. Z. W., Asma-Abdullah, N., & Fuad, W. E. M. (2021). Breast cancer therapy affects the expression of antineonatal Nav1.5 antibodies in the serum of patients with breast cancer. *Oncology Letters*, 21(2), 1–1. <https://doi.org/10.3892/OL.2020.12369/HTML>
- Ramos, E., & O'Leary, M. E. (2004). State-dependent trapping of flecainide in the cardiac sodium channel. *Journal of Physiology*, 560(1), 37–49. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2004.065003>
- Rosendo-Pineda, M. J., Moreno, C. M., & Vaca, L. (2020). Role of ion channels during cell division. *Cell Calcium*, 91. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2020.102258>
- Roshanzamir, F., Robinson, J. L., Cook, D., Hossein Karimi-Jafari, M., & Nielsen, J. (2022). Metastatic triple negative breast cancer adapts its metabolism to destination tissues while retaining key metabolic signatures. *PNAS*, 119(35), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Salvage, S. C., Chandrasekharan, K. H., Jeevaratnam, K., Dulhunty, A. F., Thompson, A. J., Jackson, A. P., & Huang, C. L. H. (2018). Multiple targets for flecainide action: implications for cardiac arrhythmogenesis. *British Journal of Pharmacology*, 175(8), 1260–1278. <https://doi.org/10.1111/BPH.13807>
- Senigagliaesi, B., Samperi, G., Cefarin, N., Gneo, L., Petrosino, S., Apollonio, M., Caponnetto, F., Sgarra, R., Collavin, L., Cesselli, D., Casalis, L., & Parrisè, P. (2022).

- Triple negative breast cancer-derived small extracellular vesicles as modulator of biomechanics in target cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 44. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2022.102582>
- Shad, K. F., Salman, S., Afridi, S., Tariq, M., & Asghar, S. (2018). Introductory Chapter: Ion Channels. In *Ion Channels in Health and Sickness*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80597>
- Song, W., & Shou, W. (2012). Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Mutations and Cardiac Arrhythmia. *Riley Symposium*, 33, 943–949. <https://doi.org/10.1007/s00246-012-0303-y>
- Spini, A., Donnini, S., Pantziarka, P., Crispino, S., & Ziche, M. (2020). Repurposing of drugs for triple negative breast cancer: an overview. *Ecancermedicalscience*, 14. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1071>
- Tarupi, W. (2021). *Boletín Epidemiológico. Cáncer de mama*. <https://www.researchgate.net/publication/372141468>
- Temian, D. C., Pop, L. A., Irimie, A. I., & Berindan-Neagoe, I. (2018). The Epigenetics of Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer: Current Knowledge. *Journal of Breast Cancer*, 21(3), 233. <https://doi.org/10.4048/jbc.2018.21.e41>
- The American Cancer Society. (2019). *What Is Breast Cancer?* American Cancer Society. https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html#written_by
- The American Cancer Society. (2021). *Triple-negative Breast Cancer | Details, Diagnosis, and Signs*. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/triple-negative.html>
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2019). *Molecular Classification of Breast Cancer*. www.anatomicpathology.com
- Tsirigoti, C., Ali, M. M., Maturi, V., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2022). Loss of SNAI1 induces cellular plasticity in invasive triple-negative breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 13(9). <https://doi.org/10.1038/S41419-022-05280-Z>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Won, K. A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. *International Journal of Oncology*, 57(6), 1245–1261. <https://doi.org/10.3892/IJO.2020.5135/HTML>

- World Health Organization. (2021). *Breast cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Yang, M., Kozminski, D. J., Wold, L. A., Modak, R., Calhoun, J. D., Isom, L. L., & Brackenbury, W. J. (2012). Therapeutic potential for phenytoin: Targeting Nav1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *134*(2), 603–615. <https://doi.org/10.1007/S10549-012-2102-9/FIGURES/6>
- Yeldag, G., Rice, A., & Hernández, A. del R. (2018). Chemoresistance and the self-maintaining tumor microenvironment. In *Cancers* (Vol. 10, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers10120471>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, *22*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13058-020-01296-5/TABLES/3>
- Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., & Marshall, C. (2014). Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. *PLoS ONE*, *9*(9), 107447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447>
- Zhang, J., Chen, X., Xue, Y., Gamper, N., & Zhang, X. (2018). Beyond voltage-gated ion channels: Voltage-operated membrane proteins and cellular processes. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(10), 6377–6385. <https://doi.org/10.1002/JCP.26555>
- Zhang, X. C., Yang, H., Liu, Z., & Sun, F. (2018). Thermodynamics of voltage-gated ion channels. *Biophysics Reports*, *4*(6), 300–319. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0074-y>

5. Anexos

Programa de “Conteo Celular Automatizado”

Se generó un programa de conteo celular mediante un procesamiento de imágenes para delimitar los bordes de células de la imagen y contar estos para lograr obtener la cantidad exacta de células vivas. Su objetivo es generar un conteo celular automatizado a partir de una imagen obtenida en el ensayo de viabilidad.

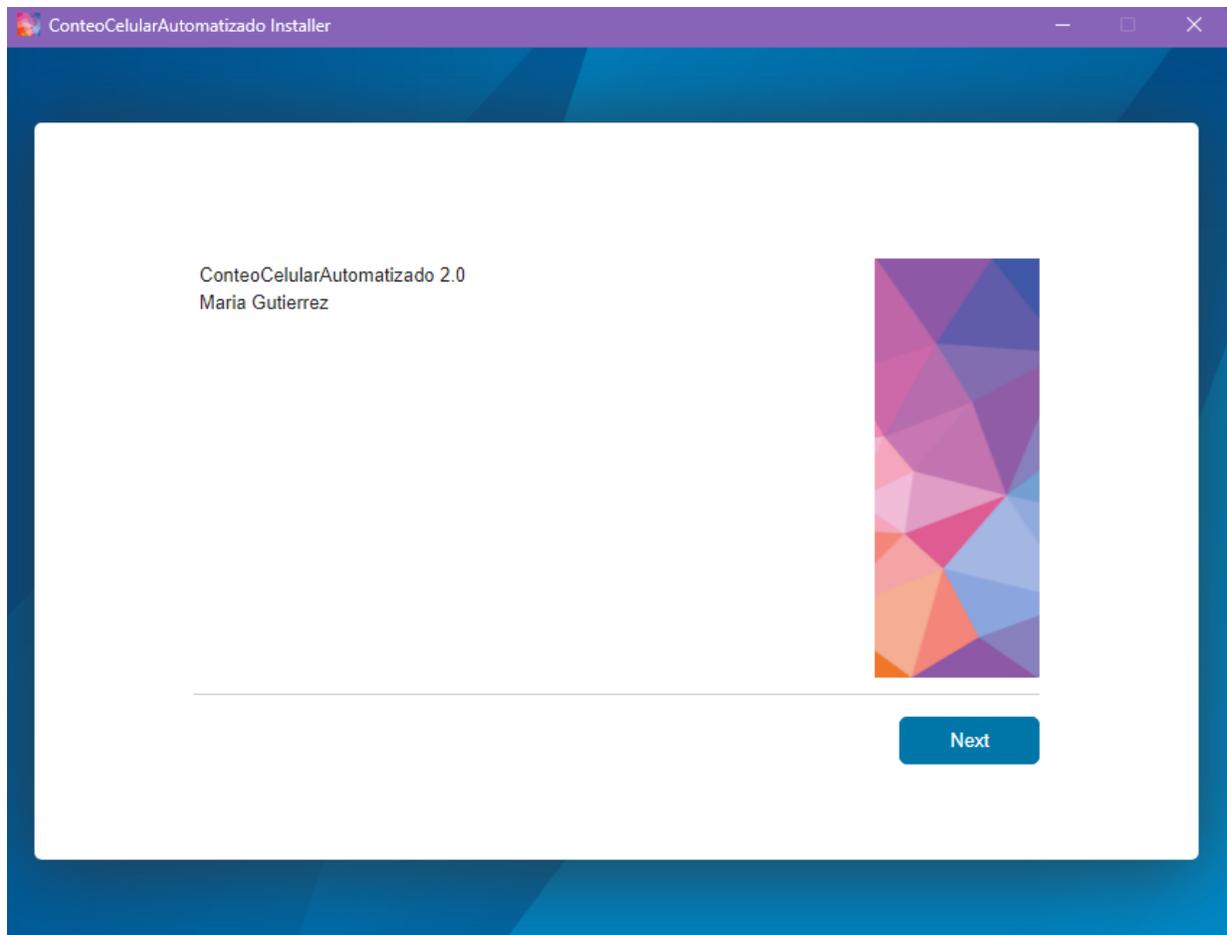
Se desarrolló una aplicación por medio del programa de app designer de MATLAB, en el cual se realizó un código para identificar los círculos de las imágenes seleccionadas por el usuario. Este consistió en pedir una imagen al usuario y que este la pueda seleccionar de su computadora, realizar el procesamiento de la imagen para destacar los bordes de las células vivas y así identificarlas y cuantificarlas.

A continuación, se presenta el manual de usuario del programa:

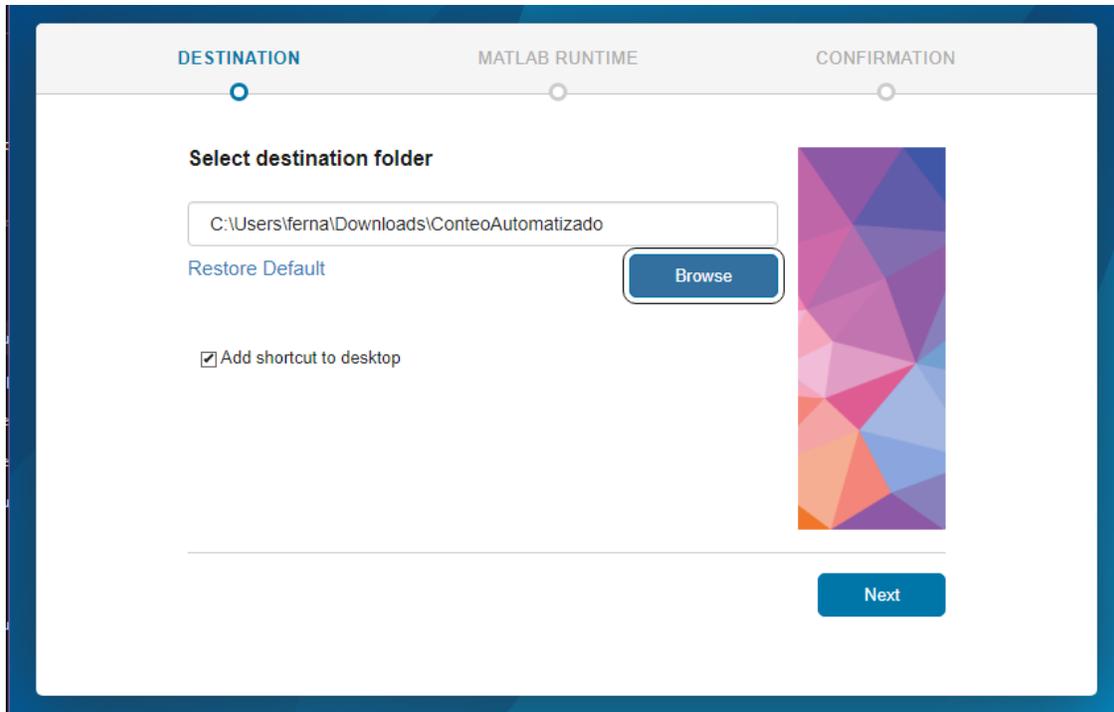
Manual de Usuario de “Conteo Celular Automatizado”

MANUAL DE INSTALACIÓN

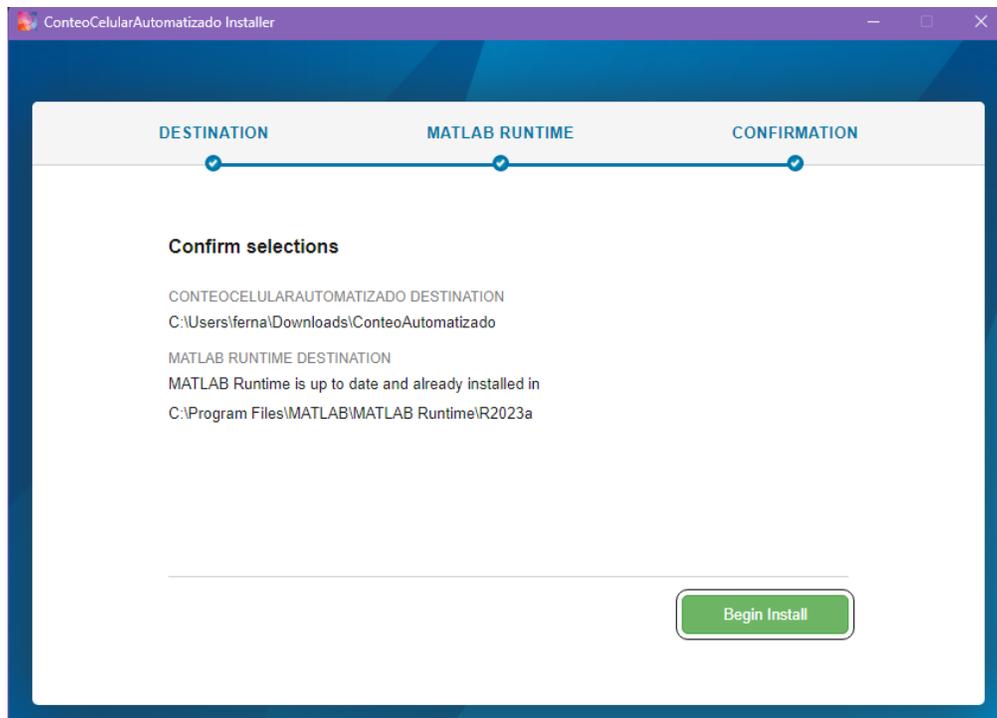
Para utilizar el programa de “Conteo Celular Automatizado” se necesita descargar el instalador, el cual tiene por nombre Instalador_CCA.exe



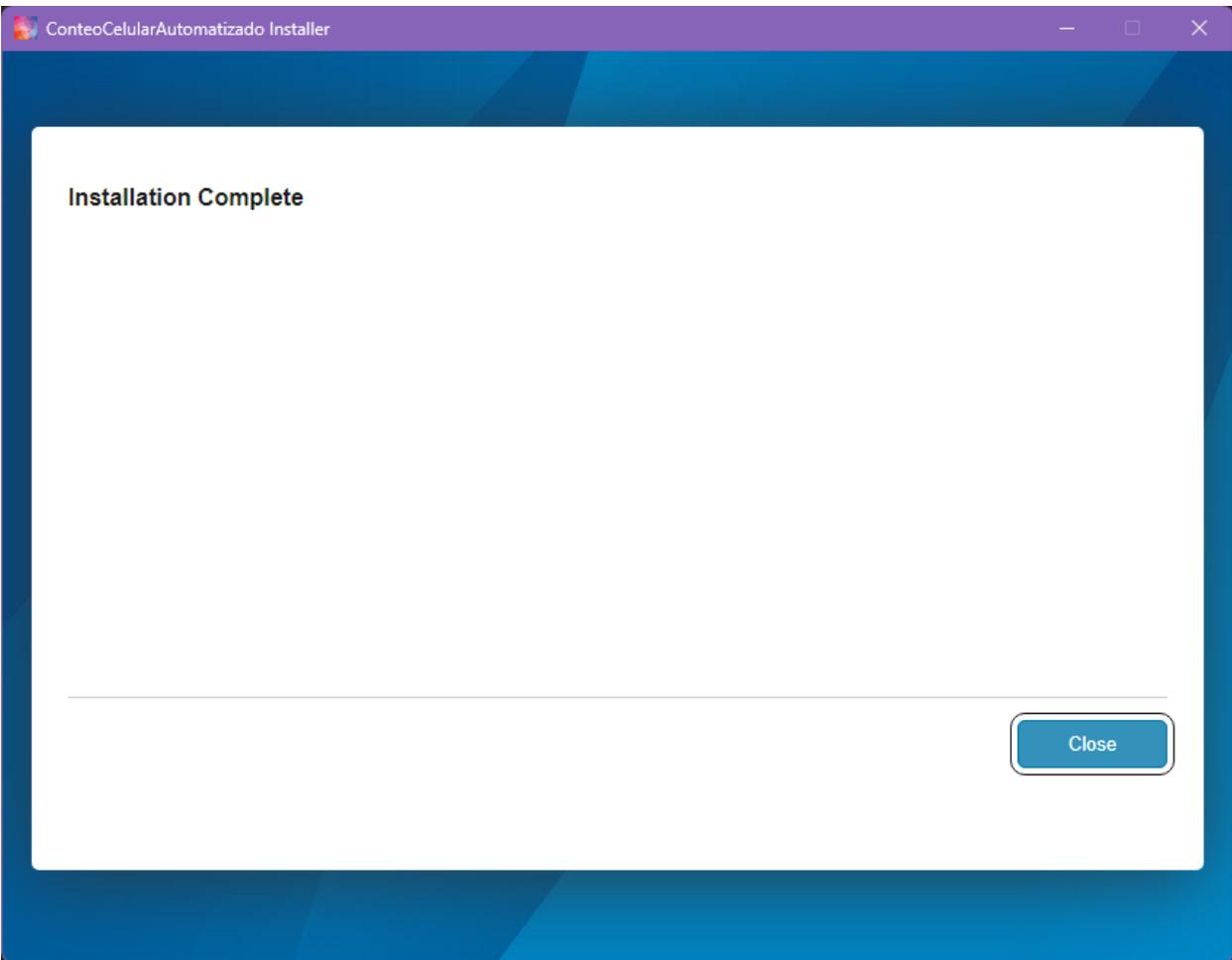
Se le dará clic al botón “Next” para continuar con la instalación. Luego aparecerá la opción para que el usuario seleccione en donde se descargará el programa. Seleccione la carpeta donde desea que se instale el programa en su equipo. Ya que se seleccione donde se descargará, se le da clic a “Next” para empezar la instalación.



Después se le pedirá al usuario la confirmación de la ubicación del archivo. Si es que esta es correcta, se deberá de hacer clic en “install” para inicial la instalación.



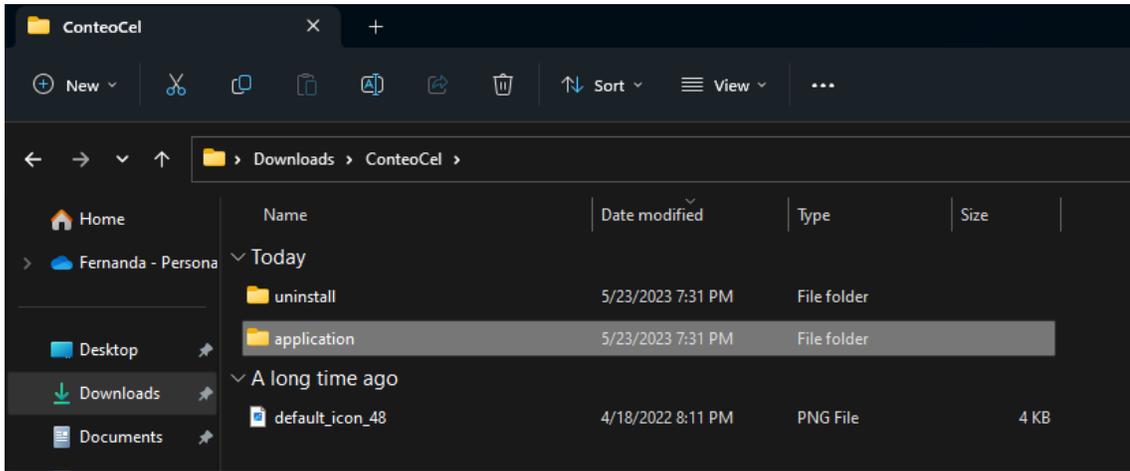
Confirme la instalación del programa y espere a que la instalación se complete, esto puede tardar varios minutos. Ya instalado aparecerá el mensaje de instalación completa.



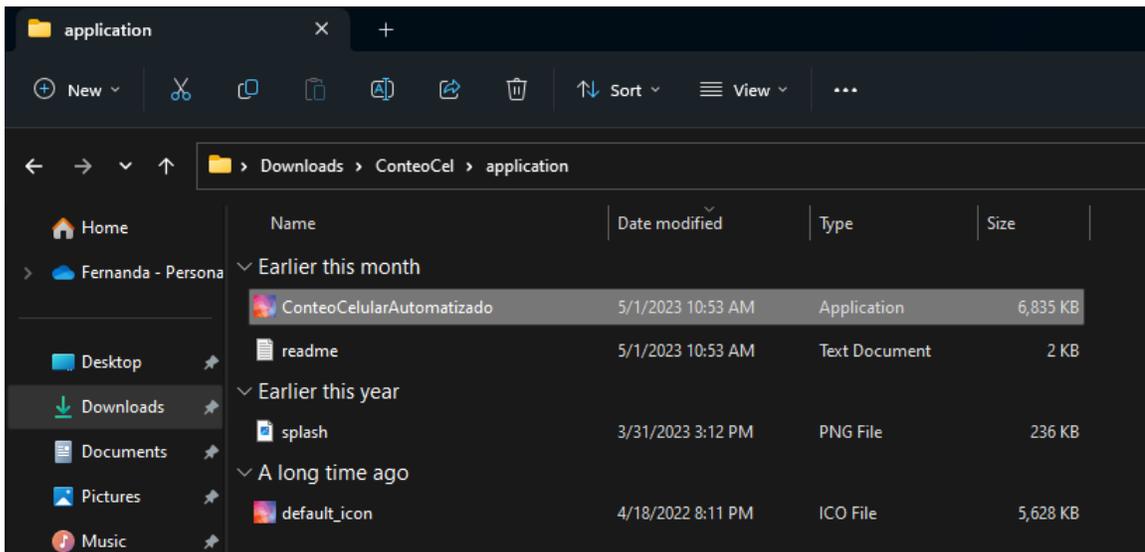
MANUAL DE USO

Para utilizar el programa de “Conteo Celular Automatizado” se necesita realizar previamente el ensayo de viabilidad y obtener imágenes de las células teñidas en la cámara de Neubauer. Después de obtener las imágenes siga los siguientes pasos:

1. Abrir el programa. En la ubicación que usted eligió para instalar el programa seleccione la carpeta de “application”.



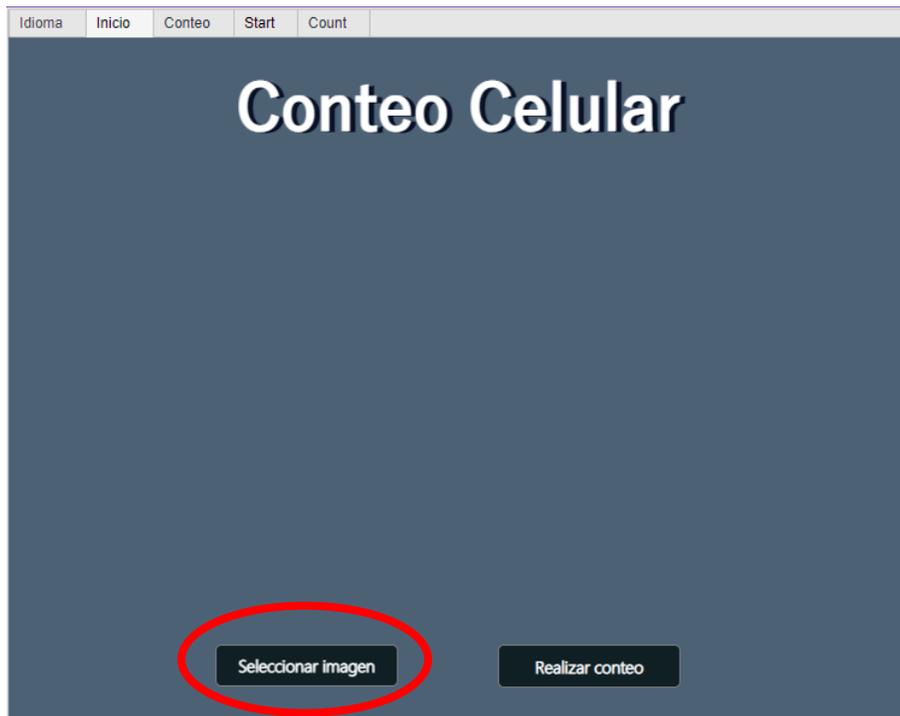
Dentro de esta carpeta elija el archivo titulado “ConteoCelularAutomatizado”. De esta manera se abrirá el programa.



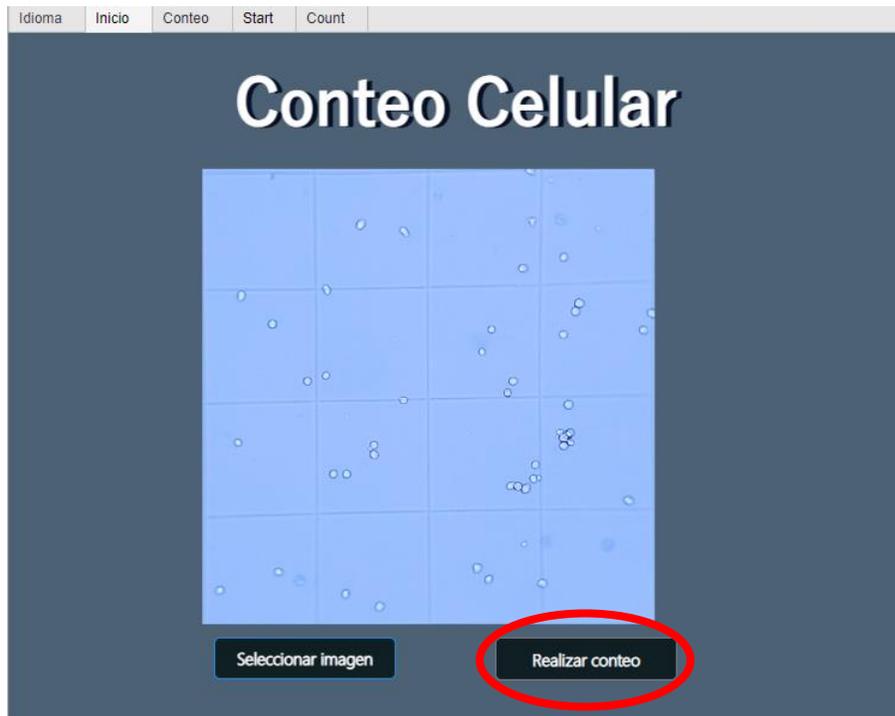
2. Seleccione el idioma de preferencia.



3. Darle clic a “seleccionar imagen” y escoger una imagen de sus documentos.



4. Luego de seleccionar la imagen, dar clic en “realizar conteo”.



Al seleccionar “realizar conteo” el programa realizará un procesamiento a la imagen seleccionada por el usuario, y se hará el conteo, como lo muestra la figura 4.

Idioma	Inicio	Conteo	Start	Count
--------	--------	--------	-------	-------

Número de células: 43

Imagen original

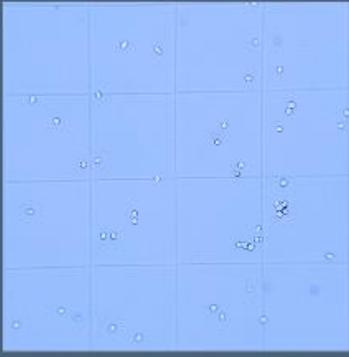


Imagen procesada



Círculos encontrados

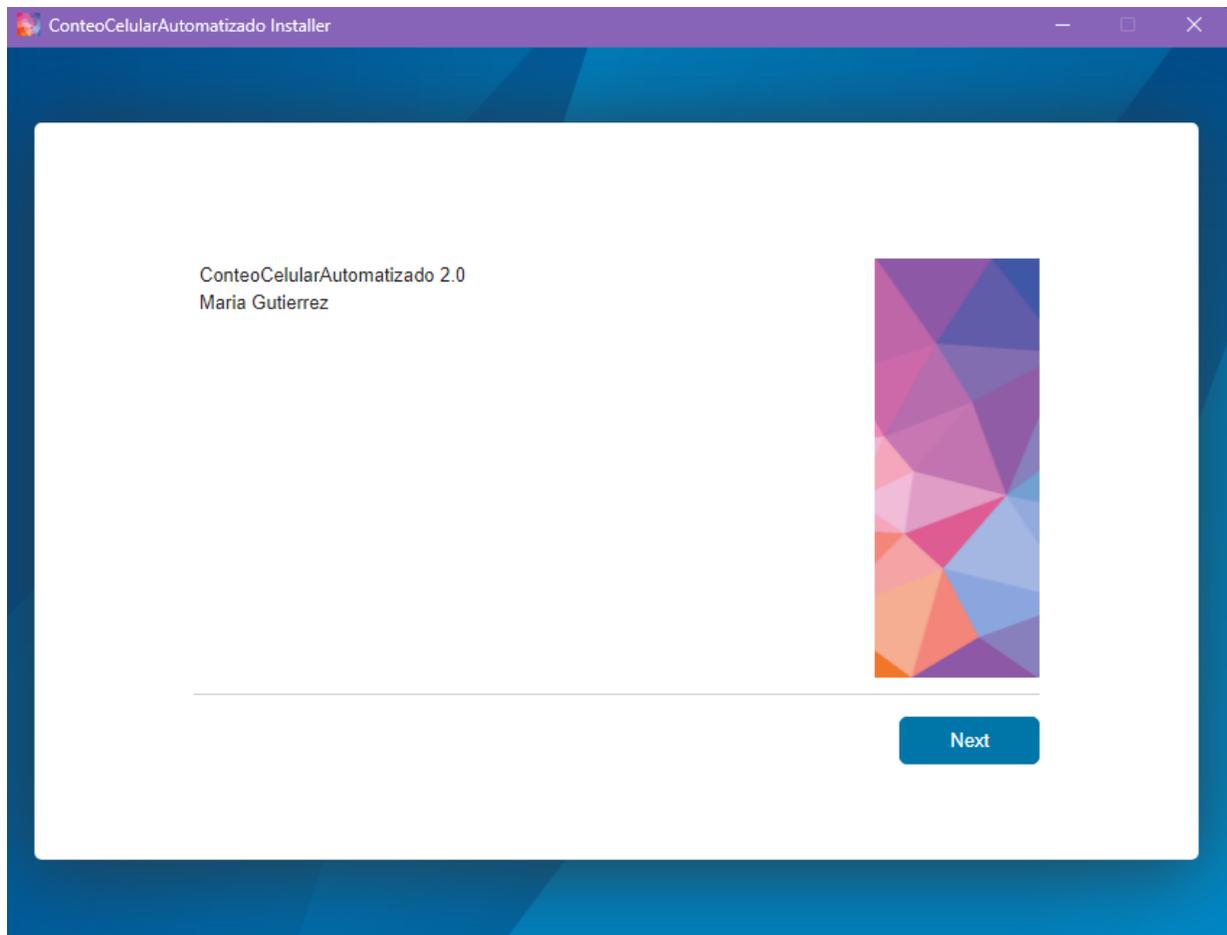


English

"Automated Cell Count" user manual

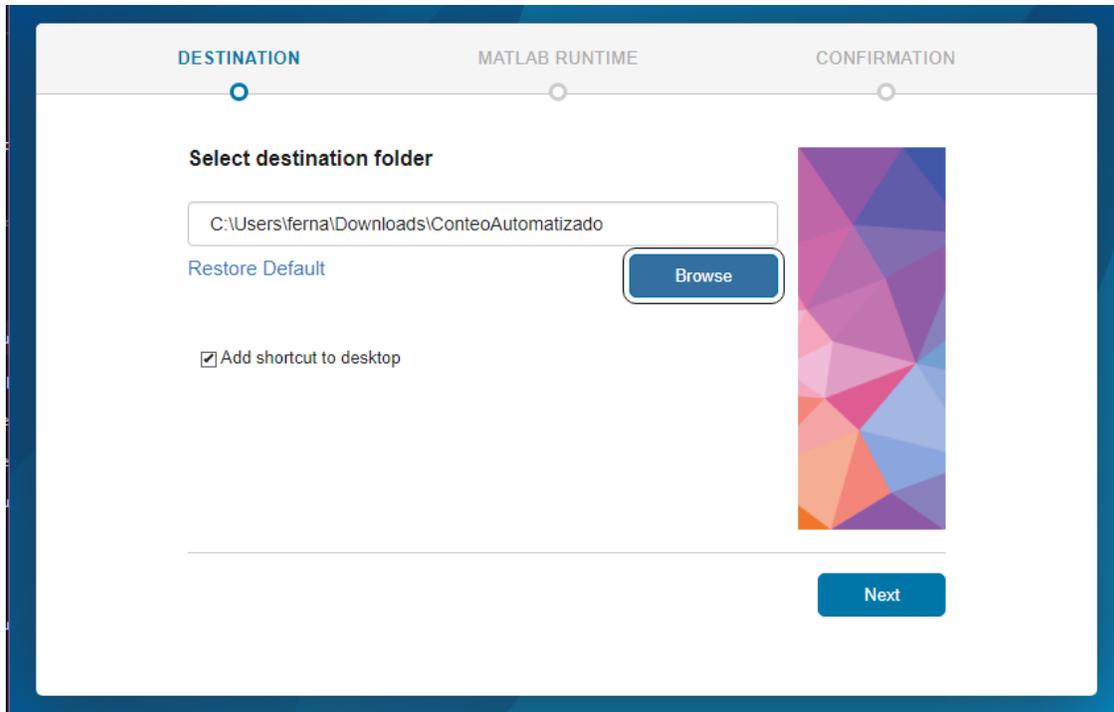
INSTALLATION MANUAL

To use the "Automated Cell Count" program, the user needs to download the installer, Instalador_CCA.exe



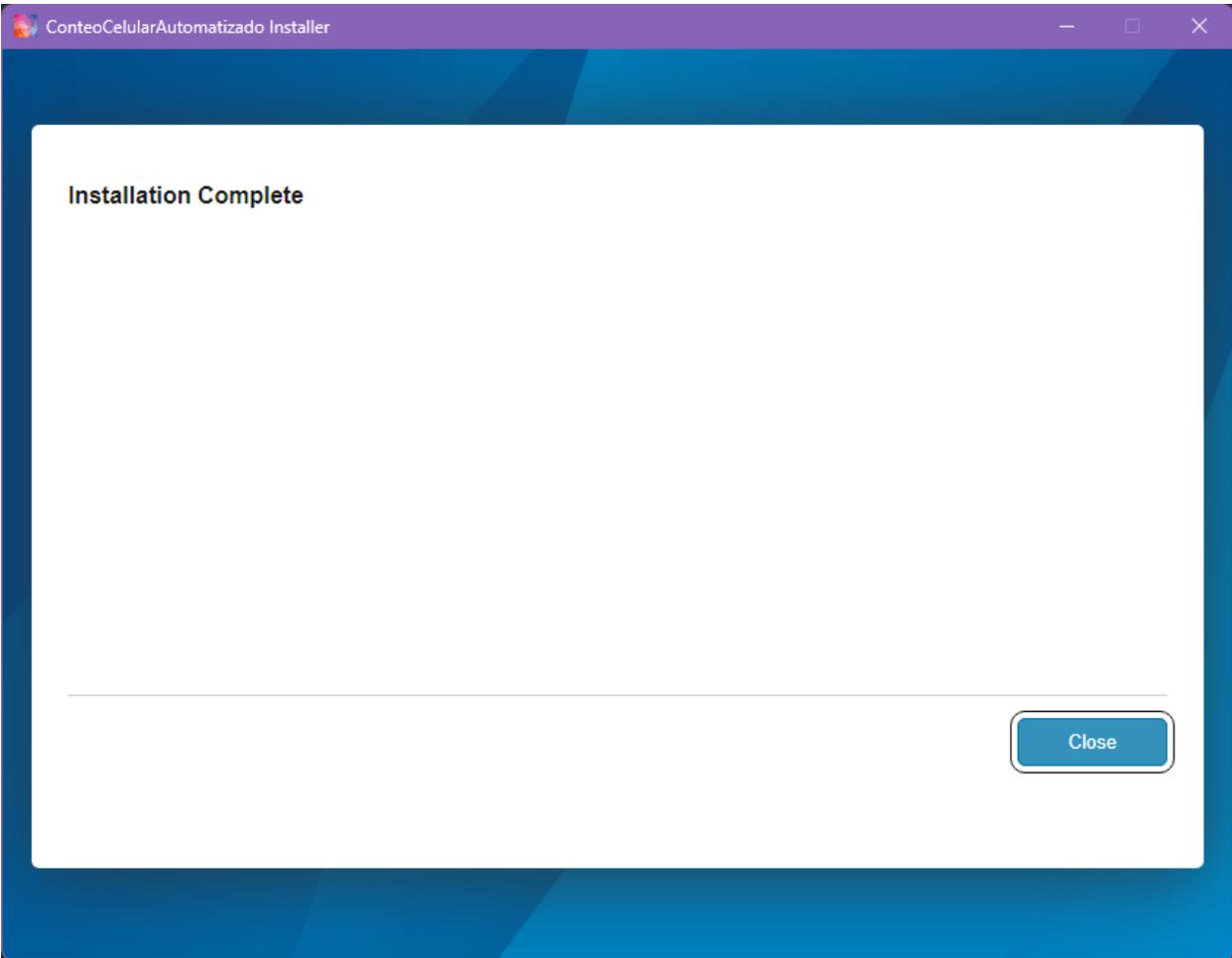
Click the "Next" button to continue with the installation. Then the option will appear for the user to select where the program will be downloaded.

Select the folder in which the program will be installed. Then click "Next" to start the installation.



The user will then be asked to confirm the location of the file. If this is correct, you must click on "Begin install" to start the installation.

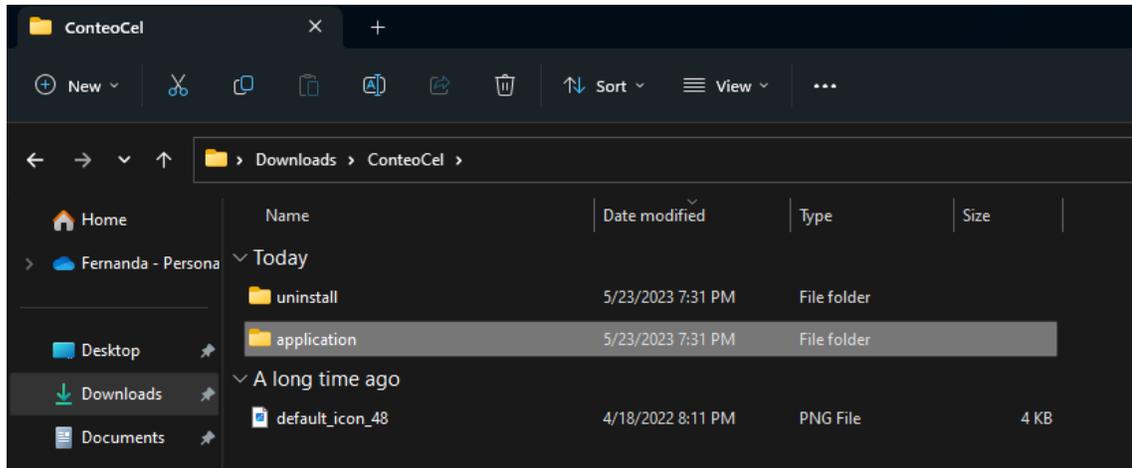
Wait for the installation to be completed, this could take a few minutes. When it's done, an "Installation Complete" message will appear.



USER MANUAL

To use the "Automated Cell Count" program, it is necessary to previously perform the viability assay and obtain images of the stained cells in the Neubauer chamber. After obtaining the images follow the steps below:

1. Open the program. In the folder that the program was downloaded, clic the "application" folder.



Then, select the "ConteoCelularAutomatizado" file. That way the program will open.

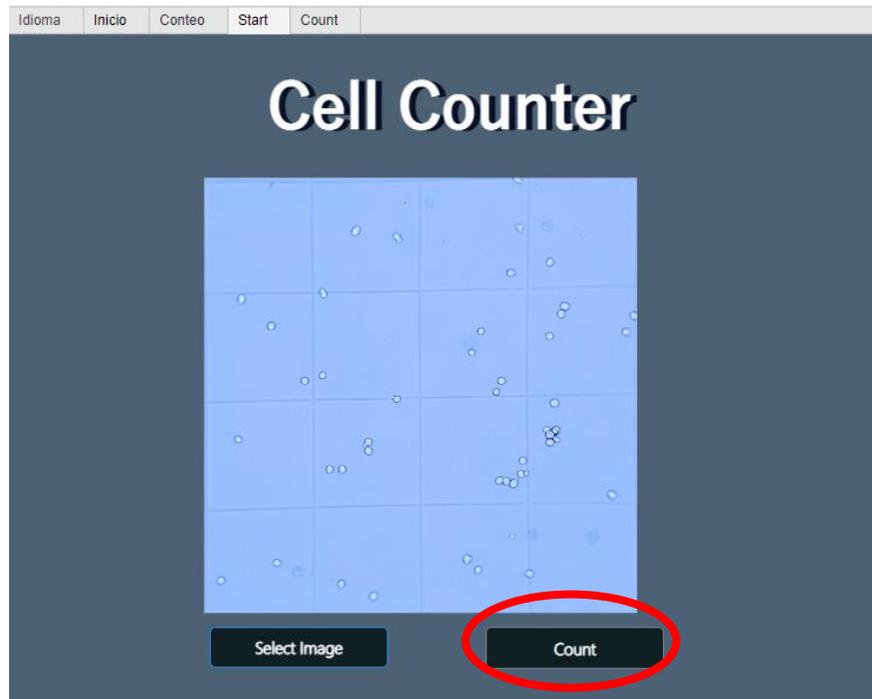
2. Select your preferred language.



3. Click on “select image” and choose an image from your documents.



4. After selecting the image, click on “Count”.

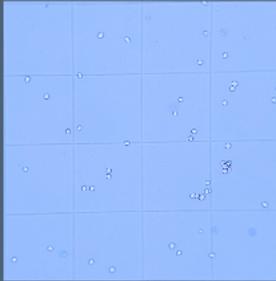


By selecting "perform count" the program will process the image selected by the user, and the count will be done, as shown in Figure 4.

Number of cells:

43

Original Image



Processed Image



Circles in image

