

**Universidad Autónoma de Baja California.**

**Facultad de Ingeniería.**

Programa Educativo “Bioingeniero”.



**“Determinación de la actividad citotóxica de los biosurfactantes en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231”.**

**Tesis para obtener el grado de:  
Bioingeniero.**

**Presenta:**  
Carlos Amirr Barragan Vazquez.

**Directora de Tesis:**  
Dra. Angélica López Izquierdo.

Mexicali, Baja California.

Noviembre de 2024.

## **DEDICATORIA.**

A mi madre, mis abuelos, a Abraham Villegas que es como un padre para mí, y amigos de los cuales destaco a Juan C. Delgado Torres, les agradezco infinitamente por siempre estar ahí para mí cuando más lo necesitaba, en los momentos donde no me sentía fuerte y quería rendirme por las dificultades que se me presentaron durante esta travesía. Ustedes siempre han sido un gran pilar en mi vida, y me han dado los ánimos suficientes para seguir adelante. Ustedes me enseñaron a nunca darme por vencido, e inculcaron en mí la curiosidad por las cosas desconocidas. Gracias por recordarme siempre mi valor como persona, y por hacerme sentir querido entre ustedes.

A la Dra. Angélica López Izquierdo, por haberme brindado la oportunidad de trabajar bajo su supervisión, por tenerme paciencia en mis etapas de aprendizaje, por siempre aconsejarme en cuestiones académicas, por apoyarme para cumplir mis sueños, metas y ambiciones en la vida. Para mí ha sido un gran privilegio ser su primer tesista de licenciatura, por lo que le agradezco infinitamente la confianza de trabajar en esta investigación bajo su supervisión y dirección.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Esta investigación fue financiada por la 7<sup>ma</sup> Convocatoria Interna de apoyo de proyectos de investigación de la Universidad Autónoma de Baja California, con clave de proyecto 105/1/N/97/7.

A la Facultad de Ingeniería Mexicali de UABC, a la carrera de Bioingeniero, por haberme dado las herramientas necesarias para desarrollar la presente investigación, bajo supervisión de la Dra. Angélica López Izquierdo. Por ayudarme en la adquisición de conocimientos y habilidades en el área de la ingeniería, ciencia y salud.

A la Dra. Angélica López Izquierdo por haberme ofrecido tan maravillosa experiencia, aconsejarme en mi vida académica, darme la oportunidad de haber trabajado bajo su supervisión, y por siempre creer en mis habilidades como Bioingeniero en formación. Le estoy completamente agradecido por darme la confianza de trabajar a su lado, y por enseñarme que no debo ser tan estricto con mi persona.

A la M.C. María Fernanda Gutiérrez Rosas, al Bioingeniero Darwin Bonilla y al estudiante Ernesto Gutiérrez Rosas, por haberme enseñado todo lo relacionado con los métodos de experimentación y la forma de trabajo, todo con el fin de dar lo mejor de mí dentro de esta investigación.

A mis compañeros de servicio social, quienes siempre hicieron más ameno el trabajo, me hicieron reír en muchas ocasiones. Por esas veces donde me abrazaron y me hicieron sentir como parte de una bonita comunidad. Les agradezco por todas esas veces que me ayudaron con la experimentación o con la preparación de material, sin duda me ayudaron reduciendo la carga de muchas formas. De esta forma quiero mencionar a Darwin Bonilla, Ernesto Gutiérrez Rosas, Pascual Marcos, Miriam Carrillo, Aldo García, Melchor Salaices, Abraham Saucedo y Alondra Gordillo, siendo ellos mis compañeros de servicio social profesional.

A la Dra. Aseneth Herrera Martínez y al Dr. Fernando Amílcar Solís por haber brindado los aislados microbianos que se utilizaron para la síntesis de los biosurfactantes que fueron empleados durante esta investigación.

A mis amigos más cercanos, aquellos que me vieron llorar y derrumbarme cuando no podía más con todo lo que estaba sucediendo en mi vida. Le estoy infinitamente agradecido a mi mejor

amigo Juan Carlos Delgado Torres, a Wendy Valdez, Fernando Verduzco, Paola Lepe, Fernando Castilla, Samuel Jiménez, Roxanna Romero, Octavio Leopoldo, Monse Padilla, Lydia Luna, Alejandro Ituarte y Ricardo Vargas. Gracias a todos ustedes chicos, porque en algún momento de mi vida me han hecho reír, me han visto llorar o me han apoyado sin duda en mis tonterías, los quiero muchísimo.

A todas aquellas personas que nunca me han apoyado desde que era niño, haciéndome dudar día tras día sobre mis habilidades y mis conocimientos. A aquellas personas que siempre me han querido ver derrotado o mal frente a los demás. Les agradezco infinitamente por eso, porque aunque me generaron miles de inseguridades, me han hecho sentir más fuerte, y es gracias a eso que ahora estoy empezando a cumplir mis metas y sueños en pasos pequeños.

A mi madre, abuelos maternos, y mi papá Abraham Villegas, que aunque no he sido un perfecto hijo o nieto, siempre han estado ahí para mí, hemos tenido nuestros tropiezos, pero nunca me han dejado caer y siempre se han preocupado por mí. Gracias por darme el empujón que tanto necesitaba para salir adelante y empezar una nueva etapa de mi vida a partir de este día.

Por último me gustaría agradecer a mi persona, por aquellos momentos donde lloramos en las noches, donde sentíamos que no podríamos con todo esto, donde a pesar de la presión, la ansiedad y los momentos donde no queríamos levantarnos de la cama, aquellos momentos donde no queríamos comer, pudimos salir adelante sin importar cuantos obstáculos se nos atravesaron. Sé paciente contigo mismo, quíete mucho, y lucha por esos sueños que tanto anhelas, pero recuerda que no siempre vas a poder solo. No hagas caso de aquellos comentarios que limitan tus habilidades, sé fuerte siendo débil.

## ÍNDICE.

<b>RESUMEN.</b>	<b>5</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.</b>	<b>6</b>
1.1 Antecedentes.	6
1.1.1 Cáncer.	6
1.1.2 Cáncer de mama.	9
1.1.3 Cáncer de mama triple negativo.	11
1.1.4 Surfactantes.	12
1.1.5 Biosurfactantes.	13
1.1.5.1 Generalidades de los biosurfactantes	13
1.1.6 Aplicaciones de los biosurfactantes en la biomedicina y biotecnología.	15
1.1.6.1 Aplicaciones de los biosurfactantes en el cáncer.	17
1.2 Planteamiento del problema.	20
1.3 Justificación.	22
1.4 Hipótesis.	24
1.5 Objetivos.	24
Objetivo General.	24
Objetivos Específicos.	24
<b>2 METODOLOGÍA.</b>	<b>25</b>
2.1 Obtención de los aislados microbianos.	25
2.2 Obtención de los biosurfactantes producidos por los aislados microbianos.	25
2.3 Resiembra de mantenimiento celular.	25
2.4 Ensayo de herida.	26
2.5 Ensayo por exclusión de azul de tripano.	27
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>28</b>
3.1 Resultados.	28
3.1.1 Ensayo de herida.	28
3.1.1.1 Determinación de la actividad citotóxica de los biosurfactantes sobre la migración celular de la línea tumoral MDA-MB-231.	28
3.1.1.2 Análisis de la dependencia de la concentración sobre la migración.	30
3.1.1.3 Análisis de la dependencia del tiempo sobre la migración.	33
3.1.2 Ensayo de viabilidad.	35
3.2 Discusión.	41
<b>4 CONCLUSIONES.</b>	<b>51</b>
<b>5 REFERENCIAS.</b>	<b>52</b>
<b>6 ANEXOS.</b>	<b>60</b>
6.1 Ensayo de herida en exposición a un campo electromagnético de baja frecuencia.	60
6.2 Ensayo morfológico.	61
6.3 Modelo matemático para la línea celular MDA-MB-231.	62

## **RESUMEN.**

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la división, crecimiento y diferenciación de células anormales. Puede desarrollarse en cualquier región del cuerpo, tomando su clasificación dependiendo de la sección anatómica de origen. El cáncer de mama es registrado como una de las problemáticas que se plantean actualmente. Dentro de las investigaciones relacionadas al cáncer de mama, aún quedan bastantes interrogantes relacionadas a la proliferación celular y sus procesos de invasividad. Los tratamientos actuales contra el cáncer de mama como la mastectomía y la quimioterapia en algunos casos, se ven limitados debido al grado de reincidencia de la enfermedad, y los efectos secundarios que dichos procedimientos conllevan. Por lo que, se han planteado diversas alternativas para el tratamiento de la enfermedad. En estudios recientes se ha reportado que los biosurfactantes, los cuales son metabolitos secundarios generados en condiciones de estrés del microorganismo productor, cuentan con diversas aplicaciones en el área de la biomedicina y biotecnología. Estudios previos mencionan que los biosurfactantes cuentan con actividad antitumoral, antiviral, antifúngica, y de sinergia con algunos fármacos, con un bajo nivel de toxicidad, y una alta selectividad dependiente de su estructura química y sus características fisicoquímicas; su estructura es determinada de acuerdo al microorganismo productor, así como sus condiciones medioambientales a los que son expuestos en cultivo (pH, salinidad, temperatura, CO<sub>2</sub>, fuente de carbono y nitrógeno). En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto citotóxico en la línea celular MDA-MB-231, de cinco biosurfactantes producidos por microorganismos extremófilos, que fueron aislados de la región de Mexicali. Las características únicas del Valle de Mexicali, podría proveerles propiedades fisicoquímicas y estructuras diferenciales con otros biosurfactantes reportados hasta el momento en la literatura. Se analizó la viabilidad celular, implementando el ensayo de exclusión por azul de tripano, y la migración celular a través del *wound healing assay* o *scratch*. Además de identificar una posible correlación entre el tiempo de exposición y la concentración de los biosurfactantes con el efecto que estos producen en la línea celular MDA-MB-231. En esta investigación se reporta que los biosurfactantes producidos por los aislados con las claves S1, S2 y X disminuyen significativamente la migración y viabilidad celular de la línea tumoral MDA-MB-231, la cual se encuentra asociada con el cáncer de mama triple negativo. Adicionalmente, se analizan las posibles vías de señalización reportadas en la literatura, por las cuales, los biosurfactantes podrían estar disminuyendo la migración y la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231.

# **1 INTRODUCCIÓN.**

## **1.1 Antecedentes.**

### **1.1.1 Cáncer.**

El cuerpo humano se encuentra conformado por órganos, tejidos y a su vez de diversas células especializadas en distintos procesos dentro del organismo [1]. Por lo general, las células humanas crecen y se multiplican, este proceso se llama división celular, el cual puede afectarse por la participación de diversos genes. Los tres tipos principales de genes involucrados son: los protooncogenes, los genes supresores de tumores y aquellos que se encargan de la reparación del ADN [2]. Los protooncogenes participan directamente en el proceso de crecimiento y división celular, por lo que las alteraciones genéticas en estos, pueden derivar en una tasa de proliferación celular descontrolada incidiendo directamente en la presencia de cáncer [3]. Esta enfermedad provoca un crecimiento acelerado de las células y tiene la capacidad de propagarse a otras partes del cuerpo, este último proceso es denominado como metástasis [4].

La metástasis es responsable del 90% de la mortalidad asociada al cáncer. De acuerdo con Yin et al. (2022), la cascada metastásica está asociada con dos factores principales: la translocación física de una célula cancerosa del tumor primario al microambiente de un tejido distante, y la colonización. Existen diversas perspectivas que sugieren la activación de la ruta metastásica en el cáncer: (a) las células tumorales primarias pueden trasladarse del tumor primario a un órgano distante y colonizar dentro de él, (b) las células madre tumorales circundantes pueden ser aquellas que ocasionan metástasis, (c) las células dentro del microambiente tumoral pueden convertirse en células madre tumorigénicas inducidas como consecuencia de la transición epitelial a mesenquimal, (d) las células cancerígenas metastásicas pueden surgir de células de origen mieloide o de células híbridas, tras la fusión entre macrófagos y células cancerosas no metastásicas, que viajan a los ganglios linfáticos y producen metástasis [5-7].

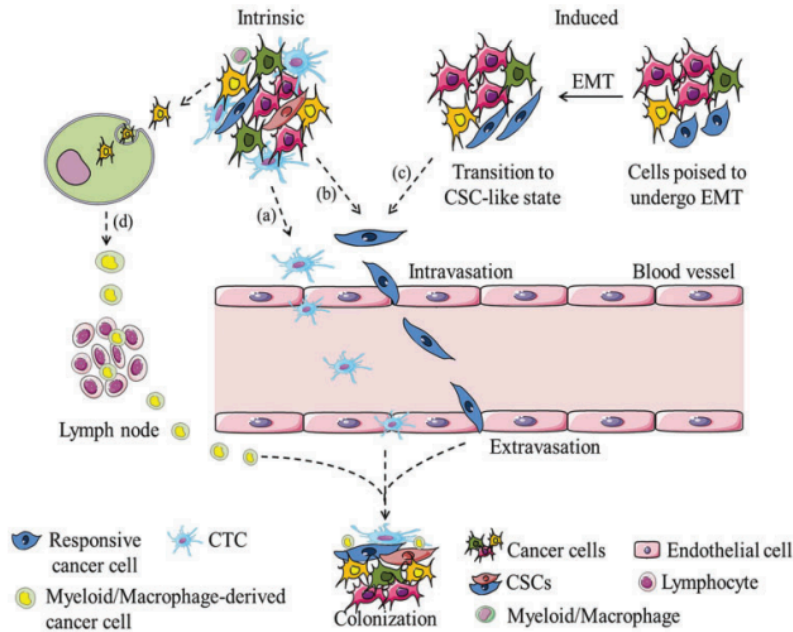


Figura 1. Representación de las posibles rutas metastásicas planteadas para el cáncer. a) Células tumorales circundantes, b) células madre cancerosas, c) transición epitelial mesenquimatosa, d) linaje mieloide/macrófago (Tomado de Yin et al., 2021).

El cáncer crece en cualquier parte del cuerpo, y recibe su clasificación o nombre dependiendo de su localización [8-9]. De acuerdo con la *American Cancer Society* (2022), el cáncer cuenta con dos categorías principales:

**Cánceres hematológicos:** Se encuentran relacionados a las células sanguíneas, en esta categoría se encuentra la leucemia, el linfoma y el mieloma múltiple [8,10].

**Cáncer de tumores sólidos:** Son un tipo de cáncer relacionado a otro tipo de tejidos u órganos, dentro de los más comunes se encuentra el cáncer de mama, próstata y colorrectal.

Entre estas dos categorías existen similitudes en el comportamiento de la enfermedad, sin embargo estas suelen diferenciarse por su crecimiento, propagación y su respuesta al tratamiento. Algunos suelen tener una proliferación más acelerada, otros cuentan con la característica de viajar e incidir en otras regiones del cuerpo. Todas estas características propias de cada tipo de cáncer están asociadas a sus diferentes mecanismos de acción, y regiones específicas de los genes presentes en las células carcinogénicas [2]. Ciertos tipos de cáncer por lo general tienen una mejor respuesta ante la cirugía, otros responden a la quimioterapia, donde por lo general son

tratados con dos fármacos en conjunto para obtener mejores resultados, y reducir el grado de reincidencia de esta enfermedad [10-12].

Existen diversos procedimientos y medicamentos disponibles para el tratamiento del cáncer, sin embargo, debido a su alta tasa de mortalidad se siguen investigando nuevos métodos de diagnóstico y fármacos más eficaces. Los tratamientos suelen clasificarse dependiendo de la región en la que actúan. Algunos de estos son considerados locales, como la cirugía y la radioterapia, actuando en un área específica del cuerpo humano. Por otra parte se encuentran los tratamientos sistemáticos, los cuales son conocidos por afectar todo el cuerpo [10-12]. Los tratamientos más empleados actualmente son:

**Cirugía.** Este tratamiento o intervención contra la diseminación del cáncer es utilizado en tres casos: la extracción completa del tumor carcinoide, extracción parcial (la cual es empleada cuando el riesgo de extracción completo del tumor podría afectar un órgano del cuerpo), y se usa como tratamiento complementario para que la implementación de fármacos contra el cáncer sea óptima, por último, se utiliza para la extracción de tumores que causan presión o dolor sobre algunas regiones del cuerpo [10].

**Inmunoterapia.** Este se describe como un tratamiento que actúa en conjunto con el sistema inmunitario para combatir el cáncer. Este sistema tiene la particularidad de combatir infecciones y otras enfermedades, y se encuentra conformado de glóbulos blancos, órganos y tejidos del sistema linfático. Este tipo de procedimiento es conocido como terapia biológica, la cual es descrita como un tratamiento que usa sustancias producidas por organismos vivos para el tratamiento contra el cáncer [11-12].

**Quimioterapia.** Es un tipo de tratamiento contra el cáncer que utiliza la implementación de fármacos para destruir las células cancerígenas. Funciona al detener o hacer más lento el crecimiento o proliferación de las células cancerosas. Las formas de implementación de la quimioterapia abarcan de forma oral, intravenosa, por inyección, intratecal, intraperitoneal, intraarterial y tópica [9].

**Radioterapia.** Se caracteriza por utilizar altas dosis de radiación para la destrucción de células cancerosas y la disminución de tumores malignos, esto se debe a que provoca un daño estructural en la secuenciación del ADN del carcinoma [9].

Terapia fotodinámica. En este tipo de tratamientos se implementan los fotosensibilizadores, los cuales tienen la característica de activarse mediante la exposición de luz, y como parte de su mecanismo de acción forman radicales libres de oxígeno que se encargan de la reducción de células cancerígenas. Por lo general la luz generada proviene de láseres o LED [9].

Hipertermia. Este tipo de terapia aplica calor de hasta 45°C sobre el tejido donde se encuentra el tumor o donde las células cancerosas han empezado su proceso de proliferación. Cuenta con pocos o nulos daños colaterales sobre el tejido no tumoral presente. Las formas de aplicación de esta terapia son por: microondas mediante sonda, ondas de radio, láser, ecografía, perfusión y calentamiento del cuerpo completo [9].

Para la determinación del tratamiento a utilizar contra el cáncer, se emplean pruebas de biomarcadores; las cuales ayudan a la identificación de los genes, proteínas y otras sustancias relacionadas, que brindan información sobre el tipo de cáncer a estudiar o tratar. Este tipo de pruebas son distintas a las pruebas genéticas, y son implementadas para determinar si alguien heredó alguna mutación que aumenta las probabilidades de incidencia de cáncer [13].

### **1.1.2 Cáncer de mama.**

En la actualidad el cáncer de mama (CM) es considerado uno de los más dañinos, ya que por lo general es diagnosticado en etapas tardías de la enfermedad. Se ha reportado que 1 de cada 10 pacientes diagnosticados con cáncer al año son atribuidos directamente al cáncer de mama, y actualmente es la segunda causa de muerte más común entre mujeres con cáncer en el mundo [14]. Esto debido a su alta tasa de mortalidad y morbilidad. Se tiene registrado que la tasa de supervivencia en mujeres que fueron diagnosticadas con este tipo de cáncer, después de un periodo de cinco años, es menor al 30%, esto incluyendo quimioterapia adyuvante [14].

Para la detección del cáncer de mama se encuentran diversos procedimientos de imagenología de los cuales destacan [17-19]:

Mamografía. Es un procedimiento que mediante la utilización de un equipo especializado para la observación y detección de anomalías en el tejido mamario, se puede determinar la presencia de un tumor. En este caso, el mamógrafo utiliza rayos X en cantidades menores a las utilizadas para el análisis de otras secciones del cuerpo como los pulmones o los huesos, este equipo cuenta con dos placas que comprimen el seno para la separación del tejido.

Ecografía mamaria. Sus principios se basan en la utilización de ondas sonoras, y sus ecos para generar imágenes computarizadas del interior de la mama. Este método de detección puede mostrar ciertos cambios en los senos, como lo son los quistes llenos de líquido, los cuales son difíciles de identificar en la mamografía.

Resonancia magnética. Este método de detección utiliza ondas de radio e imanes para la generación de imágenes para la visualización del interior de los conductos y tejidos mamarios. Se utiliza cuando se sospecha de la presencia de cáncer de seno, y en los casos en donde los estudios de mamografía, y ecografía mamaria no hayan sido del todo claros o precisos sobre el diagnóstico.

Existen diversos factores que influyen directamente al desarrollo de esta enfermedad; edad, sexo y predisposición genética. El cáncer de mama afecta en mayor medida a la población femenina en contraste de la masculina, siendo este último sector el 0.6% del total de muertes reportadas por esta enfermedad en México en el 2022 [20]. La susceptibilidad de obtener cáncer de mama va incrementando conforme la edad; además de ello, se considera un factor de riesgo la predisposición genética originada a partir de familiares con consanguinidad de primer grado. Esto debido a que se ha reportado que diversos genes, como el *BRCA1/2* pueden ser heredados, los cuales son asociados como marcadores tumorales del cáncer de mama. La mutación de estos genes puede deberse a distintos factores, como la exposición a sustancias nocivas o químicas, luces UV, contaminantes ambientales, entre otros [21-22].

El cáncer de mama es descrito como una enfermedad heterogénea caracterizada por distintos perfiles moleculares [23] que, se dividen clínicamente en tres subtipos principales de acuerdo al estado del receptor hormonal. Las diversas características del CM se deben a la expresión del receptor progesterona (PR) [24], receptor de estrógeno (ER) y el receptor 2 encargado del crecimiento epidérmico humano (HER-2). Esta patología se clasifica como receptor hormonal positivo (ER +, PR +, HER-2 -), HER-2 positivo (ER -, PR -, HER-2 +) y cáncer de mama triple negativo (ER -, PR -, HER-2 -). El presente trabajo se enfoca en el cáncer de mama triple negativo [25].

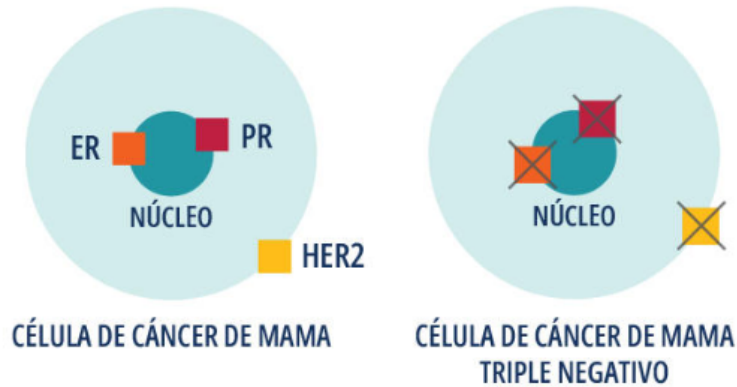


Figura 2. Representación de los receptores hormonales asociados con la actividad del cáncer de mama. Diferencia de la expresión de los marcadores tumorales expresados en el cáncer de mama y cáncer de mama triple negativo (Tomado de Jaber, 2021).

De acuerdo con un estudio realizado por Yin et al (2020), aproximadamente del 15 al 20% de pacientes diagnosticados con CM en el mundo, son asociados al subtipo triple negativo. Este tipo de cáncer es más común en mujeres premenopáusicas (<40 años), y es muy agresivo, con una edad de aparición más temprana, mayor potencial metastásico, y peor resultado clínico, en contraste con el receptor hormonal positivo y HER-2 positivo.

### 1.1.3 Cáncer de mama triple negativo.

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) suele ser uno de los más agresivos debido a su alta capacidad metastásica, incluyendo el cerebro y órganos viscerales [26]. En la actualidad diversos estudios sobre el cáncer de mama han revelado la existencia de distintas variedades de este tipo de cáncer, esto de acuerdo a la anatomía de su tejido (tipos histológicos), los cuales sugieren una preferencia hacia el fenotipo triple negativo [26]. El CMTN de alto grado se caracteriza por poseer altos niveles de inestabilidad genética, genomas complejos y mutaciones recurrentes al gen TP53, el cual es el encargado de la supresión de tumores [27].

Dentro del cáncer de mama triple negativo, existe una subtipificación de acuerdo a sus características presentadas, como lo son las anomalías genéticas, histología y mutaciones. Esto para poder caracterizar su comportamiento a nivel molecular y conocer las posibles rutas para actuar de forma efectiva frente al cáncer [28].

De acuerdo a la clasificación de Lehmann et al. (2021) el CMTN se clasifica en tipo basal 1 y 2 (BL), inmunomodulador (IM), mesenquimatoso (subtipo M), en forma de tallo mesenquimatoso (MSL) y en receptor de andrógeno luminal (LAR) [29].

En el caso del BL-1 existe una expresión anormal de genes que se encargan de la regulación del ciclo celular, y que están relacionados a la reparación del ADN. En este subtipo de CMTN se ha descrito una sobreexpresión de los genes: *MYC*, *PIK3CA*, *CDK6*, *AKT2*, *KRAS*, *FGFR1*, *IGF1R*, *CCNE1* y *CDKN2A* /B. Por otra parte el subtipo BL-2 tiene una activación anormal de vías de señalización, como son las vías: *EGFR*, *MET*, *NGF*, *Wnt/β-catenina* e *IGF-1R* [28-29].

El subtipo IM tiene genes asociados a células inmunitarias y vías de transducción de señales significativamente enriquecidas, como la vía Th1/Th2, la vía de las células NK, la vía de señalización del receptor de células B, la vía de las células dendríticas (DC), la vía de señalización del receptor de células T, la interleucina (IL) -12 vía y vía IL-7 [28-29].

El subtipo LAR tiene un perfil de expresión genética significativamente diferente al de otros subtipos de CMTN. Aunque el subtipo LAR no expresa el receptor ER, tiene vías de señalización relacionadas con hormonas altamente activadas (incluida la síntesis de esteroides, el metabolismo de las porfirinas y el metabolismo de andrógenos/estrógenos) [28-29].

Por último se encuentra el subtipo M (*Mesenchymal stem-like*), este subtipo tiene varias vías de señalización relacionadas con procesos de migración celular altamente activas, las cuales son reguladas por actina, vías de interacción matriz extracelular-receptor y vías de diferenciación. Este tipo de cáncer también es llamado cáncer de mama metaplásico [28-29].

Inicialmente, las opciones para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo se reducían a la quimioterapia citotóxica. No obstante, debido a la heterogeneidad de esta enfermedad, es necesaria la implementación de un tratamiento personalizado. Actualmente se cuenta con la quimioterapia dirigida, la inmunoterapia y la terapia dirigida [30-32].

#### **1.1.4 Surfactantes.**

Los surfactantes, son agentes emulsificantes que disminuyen la tensión superficial de un líquido y también pueden reducir la tensión interfacial entre dos líquidos, esto lo logran a través de la producción de micelas y microemulsiones en dos fases. Las moléculas de surfactante se conforman de dos partes, una región lipófila (apolar), que retiene la grasa, y una hidrofílica (polar) que es miscible con agua. La porción lipófila está formada por una o varias cadenas de hidrocarburos o fluorocarbonos alifáticas, lineales o ramificadas, aromáticas o incluso alquil aromáticas. La porción hidrofílica o cabeza polar consta de uno o más grupos polares, iónicos o no iónicos (ver figura 3) [33].

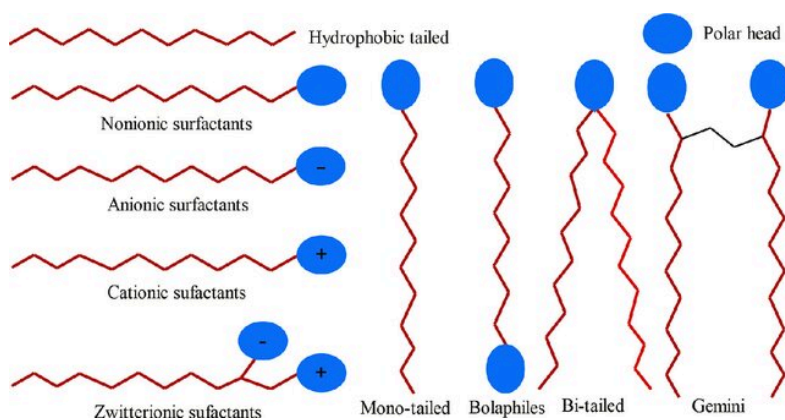


Figura 3. Clasificación de los tensioactivos sintéticos según sus cabezas polares y cadena hidrófoba (Tomado de Khalfallah A., 2023).

Los surfactantes pueden ser de origen biológico (actividad microbiológica) o artificial (síntesis química) [33]. Ambos tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial de dos fases; sólido-líquido, líquido-líquido y sólido-sólido. Esta capacidad de los biosurfactantes les podría permitir interactuar con la membrana lipídica de diferentes células [33]. No obstante, existen diversos inconvenientes en el manejo de surfactantes que tienen como origen la síntesis química a partir del petróleo, y de otros compuestos como lo son los triglicéridos y los aceites de madera, ya que, comúnmente suelen producir agentes contaminantes y tóxicos, los cuales son difíciles de degradar [33]. Por ello, se suele optar por la búsqueda de surfactantes de origen biológico, los cuales son denominados biosurfactantes o biotensioactivos, que en gran parte de los casos suelen provenir de microorganismos como lo son las bacterias y levaduras [36], sin embargo en diversos estudios, se ha encontrado que también pueden ser derivados de la actividad metabólica de hongos, como los ascomicetos. No obstante, la producción de biosurfactantes por ascomicetos depende de diversos factores como lo son la especie, fuentes nutricionales y condiciones ambientales a las cuales se encuentra expuesto el hongo [33-35].

### 1.1.5 Biosurfactantes.

#### 1.1.5.1 Generalidades de los biosurfactantes

Los biosurfactantes (Bs) han tomado auge en la actualidad debido a que representan diversas ventajas en su empleo en la biotecnología, como lo es su alta biodegradabilidad, bajo riesgo de toxicidad, producción a partir de fuentes renovables, funcionalidad en condiciones extremas de pH y temperatura, y estabilidad fisicoquímica a largo plazo. El interés de los biosurfactantes

radica en su actividad antifúngica, antiviral, antibacteriana y anticancerígena, con potencial terapéutico y biomédico [33].

La variabilidad entre los nutrientes, el microorganismo de origen, las condiciones del sitio de aislamiento de estos mismos, son puntos a tomar en cuenta para la producción de biosurfactantes, ya que estas variables son las que determinan la estructura química de los mismos, así como sus propiedades fisicoquímicas [33].

Los biosurfactantes pueden ser sintetizados a partir de animales, plantas y microorganismos. En los procesos de fermentación con bacterias, hongos o levaduras, estas biomoléculas son producidas en la superficie de la célula microbiana o son excretados extracelularmente por el microorganismo, el cual puede utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono y nutrientes durante el proceso de fermentación [33-35]. Estos suelen definirse como metabolitos secundarios, los cuales son compuestos orgánicos sintetizados por diversos microorganismos que no tienen un papel directo en el crecimiento o reproducción del mismo, estos son producidos en la idiofase (fase estacionaria del crecimiento bacteriano).

Los biosurfactantes son moléculas que actúan mejor en su concentración micelar crítica (CMC), debido a que son capaces de realizar un proceso denominado como autoensamblaje, el cual se encuentra determinado por las condiciones del medio en el que se encuentra; sus procesos de autoensamblaje son la producción de (i) micelas, (ii) liposomas, y (iii) microemulsiones. Dentro de su región hidrófila se encuentran los péptidos cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos, y alcoholes, mientras que en su región hidrófoba se encuentran los ácidos grasos de cadena larga [69, 71].

Estos bioagentes tensioactivos se clasifican de acuerdo a su peso molecular, la carga química (iónica y no iónica). Los biosurfactantes segmentados en bajo peso molecular son capaces de reducir la tensión superficial y/o interfacial entre dos líquidos inmiscibles, líquido y sólido, o líquido y gas. Por el contrario, los biosurfactantes de alto peso molecular, son más efectivos para formar emulsiones de aceite en agua o agua en aceite [33].

Los tensioactivos de origen natural se dividen en cinco categorías principales: lipopéptidos, glicolípidos y ácidos grasos, clasificados dentro de los biosurfactantes de bajo peso molecular; y biotensioactivos poliméricos y particulados, comprendidos como de alto peso molecular [33].

- Lipopéptidos: Son péptidos cíclicos o lineales compuestos por aminoácidos unidos a ácidos grasos, cuya modularidad resulta en diversas posibilidades estructurales. El cambio

de un aminoácido puede provocar una modificación de su actividad, afectando sus propiedades fisicoquímicas, como la estructura de las micelas, solubilidad y rendimiento en el medio ambiente. Una de las características únicas de los biosurfactantes es la capacidad de realizar el proceso de autoensamblaje, produciendo de esta forma micelas; se ha reportado que algunos Bs al tener una estructura similar a la bicapa lipídica de las células, podrían ser capaces de unirse a la bicapa alterando los procesos naturales de proteínas transmembranales, afectando procesos metabólicos complejos [37].

- Glicolípidos: Estructuralmente contiene una fracción de carbohidrato, unido por un enlace glicosídico a cadenas de ácidos grasos. Desempeñan diversas funciones biológicas, entre las cuales se encuentra, la comunicación célula-célula, modulación de respuesta inmune, y transporte fotosintético de electrones [38].
- Ácidos grasos: Pueden ser sintetizados por bacterias y hongos en fermentaciones utilizando sustratos hidrofóbicos como n-alcanos. Estructuralmente se encuentran conformados de ácidos carboxílicos alifáticos de cadena larga [33].
- Poliméricos: Están formados por una cadena principal de heteropolisacárido unida covalentemente a ácidos grasos mediante enlaces éster. Son biopolímeros de alto peso molecular, con propiedades como alta viscosidad, resistencia a la tracción y al corte [33].
- Particulados: Son vesículas de membrana extracelular capaces de formar microemulsiones que influyen en la absorción de alcanos en las células microbianas [33].

La baja toxicidad y alta selectividad de los Bs, confiere a estas biomoléculas una amplia gama de aplicaciones, dentro de las cuales se encuentran las siguientes ramas de estudio: (i) farmacéutica, (ii) industria alimentaria, (iii) biorremediación, (iv) recuperación del petróleo, (v) agricultura, y (vi) salud y belleza [69-70].

#### **1.1.6 Aplicaciones de los biosurfactantes en la biomedicina y biotecnología.**

Dentro de las aplicaciones de la biotecnología se encuentra el aprovechamiento de microorganismos para la obtención, modificación y mejoramiento de biomoléculas o procesos moleculares complejos. Los biosurfactantes son considerados como uno de los principales temas de investigación de la biomedicina y la biotecnología, al contar con actividad antiviral, antimicótica, antimicrobiana, antitumoral, regeneración celular y administración de fármacos [69,71].

Una de las grandes desventajas que se presentan en el estudio de los biosurfactantes son los costos de producción de los biometabolitos [69-71]. Su costo de producción se ve principalmente afectado por la biodisponibilidad presente por el microorganismo productor, sin embargo una revisión reciente de Wang et al. (2024), menciona que una de las alternativas plausibles ante esta problemática, es la modificación genética para un mayor aprovechamiento de los organismos productores de Bs [71].

Dentro de las propiedades de estudio de los Bs surfactantes encontramos tres categorías principales, las cuales son: su propiedad de autoensamblaje, su capacidad de interactuar con membranas lipídicas y la síntesis de citocinas [71].

El proceso de autoensamblaje es determinado por la concentración micelar crítica (CMC), los Bs cuentan con tres tipos de autoensamblaje: micelas, liposomas, y microemulsiones. El tipo de autoensamblaje a efectuar depende de las condiciones del medio en el que se encuentre el Bs, así como las características propias de este [69, 71]. La razón principal de estudio de este mecanismo es la capacidad que se les confiere para encapsular fármacos; la sinergia que existe entre fármacos y Bs aumenta de forma exponencial la bioadsorción correspondiente con el sistema inmunitario [69, 71]. El itraconazol es un fármaco conocido por sus propiedades antifúngicas, sin embargo una de sus desventajas es su actividad hemolítica, lo que lo podría descartar como fármaco, no obstante se ha demostrado que el encapsulamiento de itraconazol en micelas producidas por surfactina A (producido por la cepa *Bacillus* NH-100) redujo su actividad hemolítica un  $53 \pm 2.63\%$  [71].

De acuerdo con Wang et al. (2024), los Bs podrían interactuar con la membrana lipídica de las células; los mecanismos de acción más conocidos son: (i) la adsorción de los Bs en la membrana plasmática a través de fuerzas de Vanderwaals, a través de enlaces hidrógeno-hidrofóbicas. (ii) alteración de las propiedades físicas de la membrana; permeabilidad, elasticidad, etc. (iii) alteración de las funciones biológicas; alteración de canales iónicos, flujo de iones y transducción de señales. Es conforme a estas características que los Bs cuentan con actividad antimicrobiana y antitumoral [71].

Por otra parte, se les ha conferido actividad antiviral a cierto tipo de Bs como lo son glicolípidos y lipopéptidos; actuando contra virus envueltos mediante mecanismos físicos y químicos, los cuales reducen la probabilidad de generar resistencia a fármacos [71]. En contraste, algunos antibióticos aumentan la resistencia de las cepas virales, debido a la toxicidad y selectividad que a estos se les confiere. Wang et al. (2024) reportaron que los Bs se adhieren a la cubierta externa

de los virus, cambiando la permeabilidad de sustancias, mediante la afectación de canales iónicos; las cepas de virus que se han reportado bajo este mecanismo son VPH, retrovirus y algunos virus de ARN/ADN envueltos [71]. Hegazy et al. (2022) reportaron que el Bs M6 (producido por *Haloarchaea natrialba* sp.) incapacita la envoltura viral, del virus del herpes simple (VHS) y del virus de la hepatitis C (VHC), impidiendo penetrar a células huésped; M6 produce la inhibición de la replicación viral mediada por ARN/ADN polimerasa [74].

#### **1.1.6.1 Aplicaciones de los biosurfactantes en el cáncer.**

Los procesos para la detección y tratamientos contra el cáncer han ido cambiando con el transcurso del tiempo, debido a la alta probabilidad de algunos tipos de cáncer de desarrollar metástasis [4-6]. El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por su activación de la ruta metastásica, y por su proceso proliferación acelerado [2-3]. La expresión negativa del receptor de estrógeno, progesterona y de HER-2, en este tipo de cáncer, dificulta la obtención de un tratamiento efectivo que reduzca la probabilidad de la metástasis, lo cual impulsa a buscar tratamientos coadyuvantes, y definir distintas dianas terapéuticas no asociadas a estos receptores [26, 28].

En la actualidad se emplean fármacos como el irinotecan, doxorrubicina para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, sin embargo se han observado efectos secundarios presentes en la microbiota gastrointestinal, alterando directamente las concentraciones de microorganismos presentes, desencadenando en diarrea, mucositis intestinal entre otras cosas [39]. Por lo que se buscan fármacos que actúen en conjunto con otros tratamientos contra el cáncer, mejorando la microbiota, la cual actúa en procesos inmunoterapéuticos contra diversas enfermedades [39]. De esta manera, se ha reportado que los biosurfactantes de origen lipopeptídico sintetizados principalmente de *Bacillus spp*, son capaces de autoensamblarse en nanoestructuras funcionalizadas con péptidos.

De acuerdo a una revisión de Chahuan et al (2021) los biosurfactantes lipopeptídicos (Lp), son capaces de disminuir la cantidad de células viables de las líneas tumorales MDA-MB-231 y T47D, siendo este un efecto dependiente de concentración y del tiempo de exposición. A su vez se reportó que los Lp disminuyen la proliferación celular e inducen la apoptosis de la línea celular MCF-7, esto a través de la vía mitocondrial/caspasa que se encuentra mediada por la vía de señalización ROS/JNK. Por último, se menciona que el Iturin A (biosurfactante producido por

*Bacillus subtilis*) inhibe la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 al alterar la vía Akt [33,39, 44-46].

La diferencia entre estructuras de los biosurfactantes, y los diversos mecanismos de acción en los distintos subtipos de cáncer, son factores en consideración para determinar un posible mecanismo de acción para la actividad anticancerígena de los biotensioactivos [33, 40].

La surfactina es uno de los biosurfactantes más estudiados a partir de la década de los 80's, es sintetizado a partir de la especie *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* [40]. Se encuentra clasificado como lipopéptido anfifílico con carga negativa. De acuerdo a lo descrito por Micelli et al. (2023), consiste de un heptapéptido cíclico y un ácido graso B-hidroxilo de 11 a 15 cadenas de carbono [40].

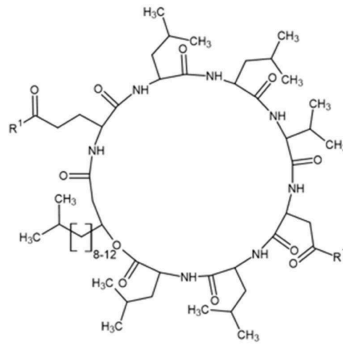


Figura 4. Estructura química de la surfactina. Biosurfactante producido por *Bacillus spp.* gram positivos (Modificado de Micelli et al., 2023).

En la actualidad se busca determinar la relación estructura-actividad de los biosurfactantes con los fenotipos del cáncer, para poder establecer los posibles mecanismos de acción de los surfactantes dentro de sus actividades anticancerígenas [40]. En la estructura de la surfactina se encuentran dos radicales libres, a los cuales se les pueden hacer modificaciones estructurales para la alteración de las propiedades fisicoquímicas del biosurfactante. En el estudio de Micelli et al (2023) se estudiaron cuatro líneas celulares de cáncer de mama, las cuales difieren en agresividad, morfología y receptor celular específico, En este estudio se determinó la actividad anticancerígena de la surfactina y la de sus siete análogos. Los resultados de este trabajo indican que la surfactina posee actividad hemolítica, pero no es capaz de diferenciar entre células tumorales y sanas [40]. Sin embargo, los análogos de la surfactina aumentaron la selectividad por células tumorales, al cambiar sus propiedades fisicoquímicas. Las características fisicoquímicas

evaluadas fueron las siguientes: número de donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno, equilibrio hidrofílico-lipofílico, concentración micelar crítica, peso molecular y carga correspondiente a un pH fisiológico. Dentro de este estudio se reportó que existe una correlación lineal ( $p < 0.05$ ) de la carga a un pH fisiológico de los Bs y la selectividad de los análogos de la surfactina por líneas tumorales. Siendo los análogos cargados aniónicamente los que presentan mayor índice de selectividad (IS) [40].

El índice de selectividad fue determinado tomando en cuenta la dosis letal, y terapéutica de la surfactina y sus análogos sobre eritrocitos de oveja y fibroblastos derivados de mama, en contraste con las líneas tumorales BT-474, MCF-7, AU-565 y MDA-MB-231. Micelli et al (2023) reportaron que el tercer análogo de la surfactina es el que presenta un mayor índice de selectividad sobre líneas tumorigénicas [40]. La modificación estructural de este análogo fue la adición del aminoácido conocido como ácido aspártico sobre uno de los radicales libres presentes en la molécula de la surfactina. Esta alteración estructural presentó las siguientes propiedades fisicoquímicas: peso molecular de 1266 Da, 13 y 18 grupos donadores y aceptores de hidrógeno respectivamente, 52.1 balance hidrofílico-lipofílico, concentración micelar crítica de 18.5  $\mu\text{g/mL}$ , y una carga de -4.0 a un pH fisiológico (7.4). Los índices de selectividad reportados en contraste con fibroblastos de mama fueron los siguientes: BT-474 (1.9), MCF-7 (4.8), AU-565 (N/A) y MDA-MB-231(4.6). Mientras que la IS reportada en comparación con los eritrocitos de oveja fueron: BT-474 (10.5), MCF-7 (26.0), AU-565 (N/A) y MDA-MB-231 (25.0). En el caso de la línea tumoral AU-565 no se pudo determinar la  $IC_{50}$  para el tercer análogo, por lo que se reportó que su IS es indefinida. Tomando en cuenta que hubo un menor IS por las líneas BT-474 (ER, PR, HER-2 positivos) y AU-565 (HER2 sobreexpresado), en comparación con las líneas tumorales MCF-7 (ER, PR positivos, y HER-2 negativo) y MDA-MB-231 (ER, PR, HER-2 negativo), se podría decir que existe una correlación del receptor HER-2 que inhibe la actividad anticancerígena de los análogos aniónicos de la surfactina. Sin embargo, es necesario la implementación de más estudios para su confirmación.

## **1.2 Planteamiento del problema.**

El término cáncer hace alusión a una gran gama de enfermedades producidas por el crecimiento descontrolado de células en cualquier región del cuerpo humano. En la actualidad, la variedad en agresividad, morfología y receptor de acción, de cada uno de los tipos de cáncer presentan una gran adversidad en el sector salud. Por lo que se considera una de las principales causas de muerte a nivel mundial; En el 2020 se atribuyeron 10 millones de defunciones ocasionadas por este grupo de enfermedades (OMS 2022).

Se tiene registrado que en el 2020 hubieron 2.26 millones de casos registrados de cáncer de mama, siendo este el más común dentro de esta gama de enfermedades (OMS 2022). Este tipo de cáncer tiene la capacidad para formar tumores debido a la alta tasa de proliferación celular, y es capaz de diseminarse a otras partes del cuerpo a través de las distintas vías metastásicas (*The American Cancer Society*, 2019).

INEGI reportó para el periodo del 2022 una incidencia en el cáncer de mama de 23, 790 para la población mayor a 20 años. Por lo que se describe que por cada 100 mil habitantes hay una incidencia de 27.64. El 9% de las defunciones reportadas en los Estados Unidos Mexicanos, que son relacionadas con el cáncer, se atribuyen directamente con el tipo originado en la mama. Para la entidad federativa de Baja California se atribuyen un total de 19.82 defunciones por cada 100 mil habitantes, en el periodo correspondiente al 2022. Dentro de la distribución porcentual de defunciones por tumor maligno de mama en los Estados Unidos Mexicanos, el sector mayor a 60 años es el que reporta mayor índice de defunciones, siendo el 51.3% del total de los casos (INEGI, 2023).

El cáncer de mama triple negativo hace referencia a un perfil específico de subtipos del cáncer de mama, los cuales son independientes en su perfil molecular, su agresividad en los procesos metastásicos, su morfología, y la ausencia de los receptores de estrógeno, progesterona y el receptor-2 encargado del crecimiento epidérmico humano. En contraste con otros tipos de cáncer de mama, se describe a este como uno de los que cuentan con un mayor grado de reincidencia. A su vez, se determina que es de los que cuenta con menor pronóstico de detección temprana y de tratamientos efectivos, lo cual es causado por la heterogeneidad de este tipo de cáncer (Yin et al., 2020).

El cáncer de mama triple negativo representa un total del 10 al 15% de los casos relacionados con cáncer de seno. En el periodo comprendido del 2012 al 2018 los pacientes que fueron diagnosticados con esta enfermedad presentan una tasa relativa de supervivencia a 5 años, del 12 al 91%. La variabilidad de la tasa relativa de supervivencia está estrechamente relacionada con la propagación a otras regiones del cuerpo humano, siendo aquellos pacientes que no presentaron metástasis los que cuentan con una mayor tasa de supervivencia, en contraste con aquellos que presentaron migración de la enfermedad hacia otras secciones del cuerpo, como los ganglios linfáticos, pulmones hígado o huesos (*American Cancer Society, 2023*).

El mal pronóstico y tratamiento del subconjunto relacionado con el cáncer de mama triple negativo, requiere una investigación ferviente de distintos mecanismos de acción sobre la enfermedad. La heterogeneidad de este tipo de cáncer, su alta agresividad proliferativa y metastásica, son factores cruciales que priorizan la investigación del cáncer de mama triple negativo en el sector salud a nivel mundial. En la actualidad todavía existen innumerables controversias sobre los mecanismos de acción de la enfermedad, y la forma en la que este puede ser controlado o erradicado (Yin et al., 2020). Tomando en consideración la premisa anterior, se determina que el cáncer de mama es un factor de estudio de suma importancia, por lo que se deben de buscar nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad, disminuir el riesgo de metástasis, contribuyendo y cumpliendo con el artículo cuarto de la constitución política de los Estados Unidos Mexicanos, brindando a la población una buena calidad en el sector salud (Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, Última Reforma, 2024). El presente trabajo de investigación plantea estudiar los efectos citotóxicos de biosurfactantes producidos por aislados microbianos, en una línea celular de cáncer de mama triple negativo, esperando contribuir de esta forma en la obtención de nuevas terapias contra la enfermedad.

### **1.3 Justificación.**

Existen diversos factores de riesgo los cuales pueden derivar en la aparición del cáncer, dentro de sus factores se encuentra la exposición a sustancias nocivas y carcinogénicas, exposición directa o prolongada a rayos UV, edad, sexo, y mutaciones genéticas heredadas. El estudio de la diversidad genética y sus procesos de invasividad, así como los procesos derivados de las rutas metastásicas en el cáncer, son de vital importancia para la comprensión de la enfermedad; y de esta forma generar tratamientos más efectivos para la eliminación del cáncer (Yin et al.,2021).

El cáncer de seno es el más común en el sector femenino en los Estados Unidos de América, seguido del cáncer de piel. Se tiene contemplado una incidencia 310,720 personas con cáncer de seno invasivo, 56,500 pacientes con carcinoma ductal *in situ* y alrededor de 42, 250 defunciones ocasionadas por esta enfermedad para el 2024, en el sector femenino de USA (*American Cancer Society, 2023*).

En México, en 2020, el cáncer de seno fue la enfermedad más frecuente y la principal causante de defunciones en la población femenina, con una tasa de incidencia de 40.5 y de mortalidad de 10.6 por cada 100 mil habitantes. Por otra parte, en el Instituto Mexicano del Seguro Social se detectaron 4,780 casos nuevos y 2,225 defunciones para el 2021, con una tasa de incidencia de 25.14 y de mortalidad de 11.70 por cada 100 mil habitantes (Gobierno de México, 2022).

Aunque en la actualidad existen diversos tratamientos contra el cáncer, resulta difícil la comprensión de la enfermedad. Esto debido a la heterogeneidad que lo comprende, contando con diversos genes que son esenciales en el desarrollo y en las características que lo comprenden. En el caso del cáncer de mama triple negativo, la expresión negativa de los receptores hormonales ER, PR, HER-2 complica su pronta detección y tratamiento, esto debido a diversas características tales como: perfil genético que lo comprende, aspectos morfológicos, procesos de señalización, invasividad tisular, metástasis, y la alta tasa de proliferación descontrolada [28-29].

Por lo tanto, es por ello que se continúa con la búsqueda de tratamientos alternos más eficaces y con menos efectos adversos para las células sanas. Una de estas alternativas, son los compuestos de origen natural con efecto anticancerígeno, estos compuestos pueden ser derivados de plantas o microorganismos, los cuales pueden representar un gran potencial debido a su rango de actividades biológicas y baja toxicidad. Los Bs son tensioactivos con alta biodisponibilidad y que varían su composición estructural dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales del

microorganismo productor. La diversidad estructural de los Bs supone cambios en las propiedades fisicoquímicas de los mismos, lo que podría fomentar una mayor selectividad sobre células tumorales en contraste con células sanas implicadas en los procesos fisiológicos humanos (Micelli et al., 2023).

En el presente trabajo de investigación se estudiaron los efectos citotóxicos de distintos biosurfactantes sobre la línea celular de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231, por medio de ensayos de migración y viabilidad celular; con la finalidad de encontrar alternativas a los tratamientos actuales contra el cáncer, los cuales pueden llegar a ser bastante agresivos con los pacientes. Además que se utilizarán microorganismos endémicos de la región Mexicalense, cuya producción de sustancias activas no ha sido explorada en líneas celulares.

#### **1.4 Hipótesis.**

La viabilidad y migración celular de la línea celular MDA-MB-231 disminuyen significativamente por acción de los biosurfactantes producidos por los aislados microbianos Q5, S1, S2, X y XXV.

#### **1.5 Objetivos.**

##### **Objetivo General.**

Evaluar el efecto de los biosurfactantes producidos por aislados microbianos sobre la migración y viabilidad celular de la línea celular tumoral MDA-MB-231.

##### **Objetivos Específicos.**

- 1.- Estudiar el efecto de los biosurfactantes sobre la migración celular en la línea celular MDA-MB-231.
- 2.- Comparar las curvas de crecimiento celular de la línea celular MDA-MB-231 en presencia de los distintos biosurfactantes.
- 3.- Analizar los efectos citotóxicos de los biosurfactantes obtenidos de la región de Mexicali sobre la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

## **2 METODOLOGÍA.**

### **2.1 Obtención de los aislados microbianos.**

Los 5 aislados microbianos utilizados en esta tesis para la obtención de biosurfactantes, pertenecen al banco de microorganismos del Cuerpo Académico de Biotecnología y Cuidado Ambiental, proporcionados por la Dra. Aseneth Herrera Martínez y el Dr. Fernando A. Solís Domínguez. Estos aislados fueron conservados por liofilización o en glicerol al 15%, y almacenados en refrigeración y congelación, respectivamente. La nomenclatura de los aislados microbianos se debe a la zona en la que fueron recolectados en la zona suroeste de la ciudad de Mexicali.

Derivado de un trabajo previo, Ríos (2021) reportó la morfología colonial y microscópica de cada uno de los aislados utilizados en este trabajo, encontrando que aislados con las claves Q5, S1, S2, X, XXV son pertenecientes a la especie *Bacillus subtilis*.

### **2.2 Obtención de los biosurfactantes producidos por los aislados microbianos.**

#### **2.2.1 Aislamiento de los Biosurfactantes.**

Se incubaron 8.3 mL del preinóculo microbiano en 1L de medio MSM a distintas concentraciones de carbono y nitrógeno a 35°C a 100 rpm, durante 72 h. Posteriormente se obtuvo el caldo libre de células, y se realizó una extracción líquido-líquido con acetona en relación 1:1 (v/v). El precipitado se dejó reposar a 4°C durante 24 h y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min, descartando el sobrenadante. Por último, en un crisol llevado a peso constante, se colocó el precipitado obtenido, y se mantuvo en el horno para su secado a 37°C por no más de 6 h (Ríos Noemí, 2021).

#### **2.2.2 Solubilidad de los Biosurfactantes.**

Conforme a lo reportado por Noemí (2021), los biosurfactantes no se disuelven completamente o parcialmente en presencia de agua destilada, etanol 70%, y acetona grado HPLC. Por lo que se optó por dejar los biosurfactantes en proceso de humedad durante una semana y se utilizó DMSO como diluyente.

### **2.3 Resiembra de mantenimiento celular.**

La línea celular MDA-MB-231 (*American Type Culture Collection*, USA) se cultivó en placas de 69 x 15 mm con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% (Gibco, USA) y una mezcla de antibiótico-antimicótico 2x (200

unidades/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina y 0.50 µg/mL de anfotericina B), manteniéndose dentro de una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>-95% aire. El mantenimiento de la línea tumoral se llevó a cabo a través de subcultivos de baja densidad en periodos de tiempo de 3-5 días. El proceso de dispersión celular para la resiembra de mantenimiento consistió en aplicar dos lavados con PBS-EDTA (Na<sub>2</sub> 0.5 mM) durante 30 s cada uno sobre la monocapa, posterior a los lavados se llevó a cabo el proceso de dispersión enzimática con Tripsina (0.125% m/v), este proceso se inactivó agregando medio DMEM al 10% SFB, posterior a ello se llevó a cabo el proceso de dispersión mecánica y se centrifugó a 2500 rpm durante 2 minutos. Por último, se decantó el sobrenadante, y el precipitado celular se resuspendió en medio DMEM al 10% de SFB.

#### **2.4 Ensayo de herida.**

Para el análisis de la migración celular de la línea tumoral se utilizó el ensayo de herida, en el cual las células de la línea celular MDA-MB-231 se sembraron con una densidad celular inicial de  $181,496 \pm 48,132$  células/mL 48 h previas al experimento, en multiplacas de 12 pocillos. Una vez alcanzado un 90-100% de confluencia, con la ayuda de una punta de micropipeta se realizaron varias heridas verticales sobre el cultivo en monocapa. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS-EDTA, con la finalidad de desechar las células desprendidas. Consecuentemente se agregó medio DMEM suplementado con 0.5% de SFB, esto para disminuir el proceso de proliferación celular y evaluar de esta forma la migración. Una vez agregado el medio con bajo suplemento de SFB, se añadieron los biosurfactantes producidos por los aislados microbianos Q5, S1, S2, X, XXV sobre la monocapa. Las concentraciones utilizadas fueron Q5 (9.3 mg), S1 (15.5 y 23 mg), S2 (6.7mg), X (0.06 y 14.6 mg), XXV (5.1 mg), los biosurfactantes fueron disueltos en 100 µL de DMSO, tomando como relación máxima del diluyente 0.5% v/v para la realización de los ensayos. Por último, se fotodocumentaron las heridas a distintos tiempos (0, 24 y 48 h), utilizando un microscopio invertido; las células se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% aire. El análisis del cierre de las heridas se procesó utilizando el software ImageJ, el cual, mediante un conteo de píxeles, analiza el área de apertura producida por la herida.

#### **2.5 Ensayo por exclusión de azul de tripano.**

Para el análisis de la viabilidad y la obtención de las curvas de crecimiento de la línea tumoral, se realizó el ensayo por exclusión de azul de tripano, los experimentos se realizaron por triplicado

en cultivos independientes en multiplaca de 24 pocillos. La densidad inicial del cultivo fue de  $27,224 \pm 7,220$  células/mL, 24 h después de estar en cultivo, se agregaron los biosurfactantes producidos por los aislados Q5, S1, S2, X, XXV. Las concentraciones utilizadas fueron Q5 (9.3 mg), S1 (15.5mg), S2 (6.7mg), X (0.06mg), XXV (11.6 mg), los biosurfactantes fueron disueltos en 100  $\mu$ L de DMSO, tomando como relación máxima del diluyente 0.5% v/v para la realización de los ensayos.

El ensayo consistió en hacer recuento celular de las células viables (“vivas”) y no viables (“muertas”), utilizando una cámara de Neubauer, a distintos tiempos posteriores a la resiembra (48, 72, 96, 120 h). Se utilizó una relación de 1:9 para la mezcla de conteo celular, tomando 10  $\mu$ L de azul de tripano y 90  $\mu$ L de células a partir de una muestra de 500  $\mu$ L de suspensión celular. Posteriormente se colocaron 10  $\mu$ L de la mezcla entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos. El recuento de células se llevó a cabo en microscopio simple utilizando un aumento de 10x. Por último el análisis de la viabilidad celular y las curvas de crecimiento se realizaron con el software Origin 2023b.

### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

#### **3.1 Resultados.**

##### **3.1.1 Ensayo de herida.**

###### **3.1.1.1 Determinación de la actividad citotóxica de los biosurfactantes sobre la migración celular de la línea tumoral MDA-MB-231.**

Para analizar los efectos de la migración celular se realizó el ensayo de herida, en el cual se estudiaron los diversos efectos ocasionados por los biosurfactantes de origen microbiano.

El dimetil sulfóxido (DMSO) se utilizó como vehículo para diluir los cinco biosurfactantes, se utilizó como porcentaje máximo 0.5%, de acuerdo a lo reportado por Yun et al., 2014 en la línea celular MDA-MB-231. Para cada biosurfactante se realizó un stock de 100  $\mu$ L en DMSO.

Se realizó el ensayo de herida en condiciones control y en presencia de los biosurfactantes producidos por los aislados Q5 [46.5 mg/L], XXV [58 mg/L], S1 [77.5 mg/L], S2 [79.5 mg/L] y X [0.3 mg/L]. En la figura 7 se observa el efecto que tienen los distintos biotensioactivos estudiados en este trabajo, sobre la migración de las células de la línea MDA-MB-231 a las 0 y 24 h de exposición. Los biosurfactantes estudiados presentaron diferentes efectos sobre la migración celular, donde el cierre de herida para los Bs producidos por los aislados Q5 y XXV fue prácticamente el mismo que en condiciones control. Por otra parte, los Bs sintetizados a partir de S1, S2 y X, en contraste con su control, muestran una disminución de la migración de las células tumorales de la línea MDA-MB-231, 24 h posteriores a la herida.

En la figura 8 se muestra el porcentaje de cierre de herida en condiciones control y 24 h después de la exposición a los cinco biosurfactantes. El porcentaje de cierre de herida correspondiente para cada aislado es el siguiente: Q5 ( $99.87\% \pm 4.36\%$ ), XXV ( $95.12\% \pm 3.27\%$ ), S1 ( $77.12\% \pm 8.23\%$ ), S2 ( $76.5 \pm 5.26\%$ ) y X ( $56.31 \pm 2.93\%$ ). Los resultados obtenidos se analizaron a partir del software imageJ. Existe una disminución en el porcentaje de cierre de herida 24 h posteriores a la exposición de los biosurfactantes producidos por los aislados S1, S2 y X. Comparando los porcentajes de cierres con el control se obtuvo una disminución significativa de la migración en presencia de los biosurfactantes S1 y S2 ( $p < 0.05$ ) y X ( $p < 0.001$ ). Similar a lo previamente descrito, los tensioactivos producidos por los aislados Q5 y XXV no presentan una inhibición ( $p > 0.05$ ) de la migración sobre las células de la línea MDA-MD-231, a concentraciones de 46.5 mg/L y 58 mg/L, respectivamente.

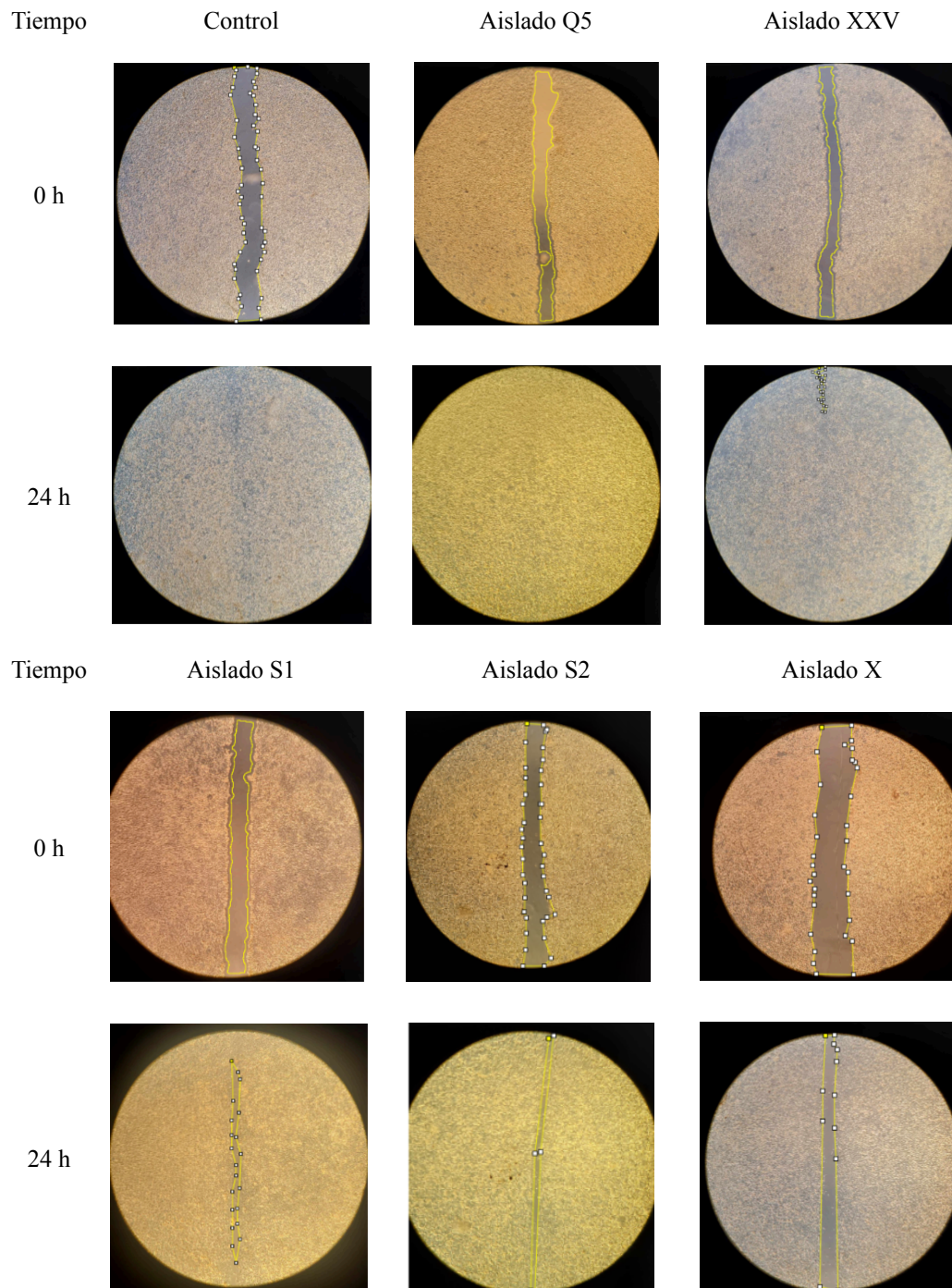


Figura 7. Ensayo de herida en presencia de biosurfactantes producidos por distintos aislados microbianos. Imágenes representativas del ensayo de herida en la línea celular MDA-MB-231 a un tiempo inicial de 0 h y final de 24 h, en condiciones control y después de tratar las células con los biosurfactantes producidos por los aislados Q5 [46.5 mg/L], XXV [58 mg/L], S1 [77.5 mg/L], S2 [79.5 mg/L] y X [0.3 mg/L].

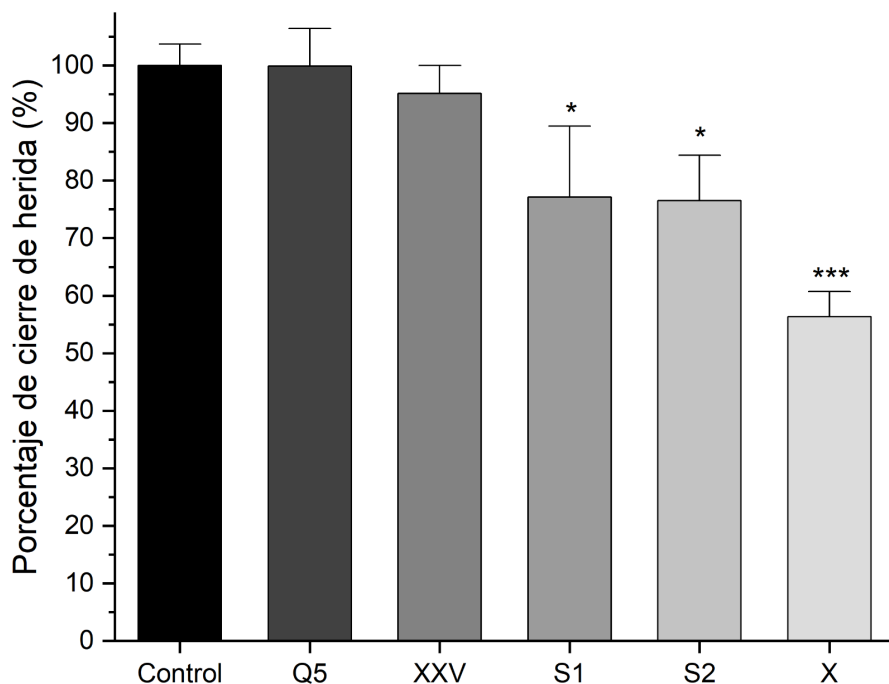


Figura 8. Porcentaje de cierre de herida en presencia de biosurfactantes producidos por distintos aislados microbianos. Comparación del porcentaje de cierre de los ensayos de herida después de la exposición a diferentes biosurfactantes. Las condiciones experimentales implementadas fueron las siguientes: control (n=28), Q5 (n=16), XXV (n=8), S1 (n=16), S2 (n=8) y X (n=16), y se analizó el porcentaje de cierre de herida 24 h posteriores al ensayo. \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001).

### 3.1.1.2 Análisis de la dependencia de la concentración sobre la migración.

Posteriormente, se comparó y analizó el porcentaje de cierre herida ocasionado por los biosurfactantes producidos por S1 y X, a dos diferentes concentraciones. Las concentraciones utilizadas fueron: para S1 [77.5 mg/L y 115 mg/L] y X [0.3 mg/L y 73 mg/L]. Esta prueba se realizó con la finalidad de establecer un efecto en la migración de la línea celular MDA-MB-231 dependiente de la concentración de biosurfactante.

En la figura 9 se muestran los resultados de ensayos de herida, con las dos concentraciones utilizadas del Bs sintetizado por el aislado microbiano S1; 115 mg/L y 77.5 mg/L. En condiciones control se puede observar el cierre total de la herida a las 24 h consecuentes del ensayo. Mientras que, en ambas concentraciones del Bs producido por S1 se ve una reducción de la migración. No obstante, se observa que al aumentar la concentración del aislado S1, el efecto sobre la migración celular de la línea celular MDA-MB-231 es menor, en contraste con lo obtenido con la aplicación del Bs a una concentración más baja. Es decir, a menor concentración mayor efecto del Bs sobre la migración celular.

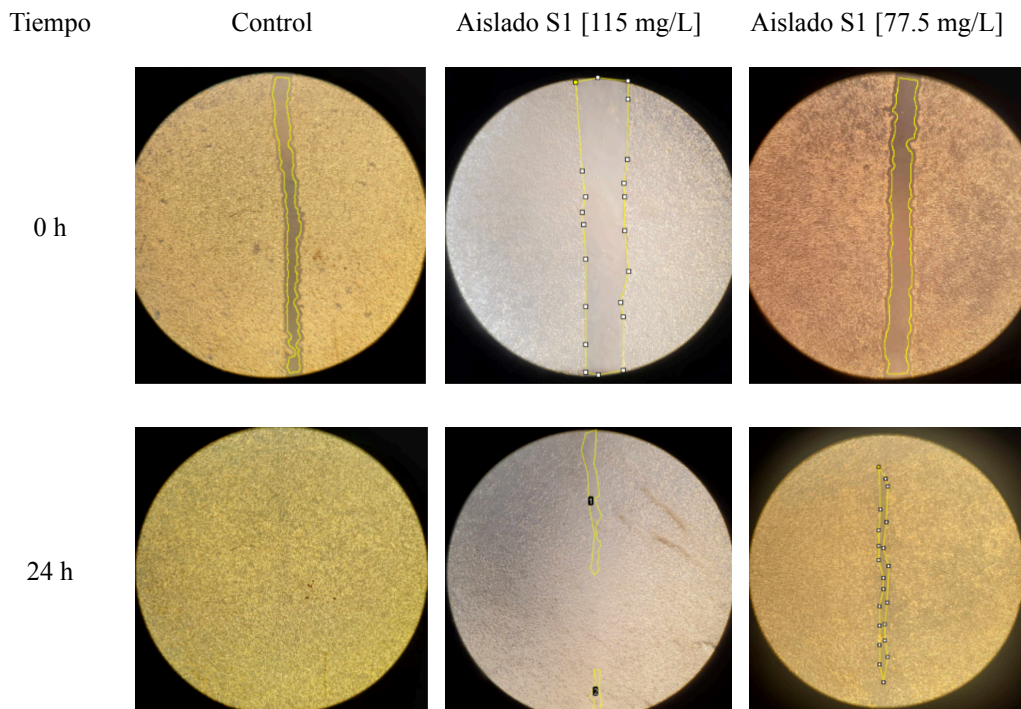


Figura 9. Comparación del cierre de herida en presencia de diferentes concentraciones del biosurfactante producido por el aislado microbiano S1. Imágenes ilustrativas del cierre de herida en la línea celular MDA-MB-231 a las 0 h y 24 h después de tratar el cultivo con las concentraciones de 77.5 y 115 mg/L del biosurfactante producido por el aislado S1.

Por otra parte, en la figura 10 se puede observar el ensayo de migración de la línea MDA-MB-231 con dos concentraciones del Bs producido por el aislado X; 73 mg/L y 0.3 mg/L. El control experimental cierra completamente transcurridas 24 h. En el caso de ambas concentraciones empleadas del Bs, se muestra una disminución de la migración en comparación con su testigo. Sin embargo, el mayor efecto de la migración se presenta en su concentración más baja analizada (0.3 mg/L), por lo que se podría inferir que el efecto del Bs sobre la migración de la línea tumoral MDA-MB-231 es dependiente de concentración.

El efecto sobre la migración de la línea tumoral MDA-MB-231 se ve disminuido al aumentar la concentración de los Bs producidos por S1 y X (ver figura 11). En el caso del Bs producido por S1 el porcentaje de cierre de herida fue el siguiente: a una concentración de 77.5 mg/L ( $77.12 \pm 8.23\%$ ), y 115 mg/L ( $89.25 \pm 5.92\%$ ). En comparación con su testigo experimental, a la concentración más alta (115 mg/L) el efecto sobre la migración de la línea tumoral MDA-MB-231 no es estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ), y a la concentración más baja

empleada (77.5 mg/L) el efecto sobre la migración se considera estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). Para el Bs del microorganismo productor X, el porcentaje de cierre de herida que se observa en la figura 11 es el siguiente: a 0.3 mg/L ( $56.31 \pm 2.93\%$ ), y 73 mg/L ( $82 \pm 4.74\%$ ); ambas concentraciones presentan una diferencia significativa con el control experimental, sin embargo, a mayor concentración del Bs, menor efecto 0.3 mg/L ( $p < 0.001$ ), y a 73 mg/L ( $p < 0.01$ ).

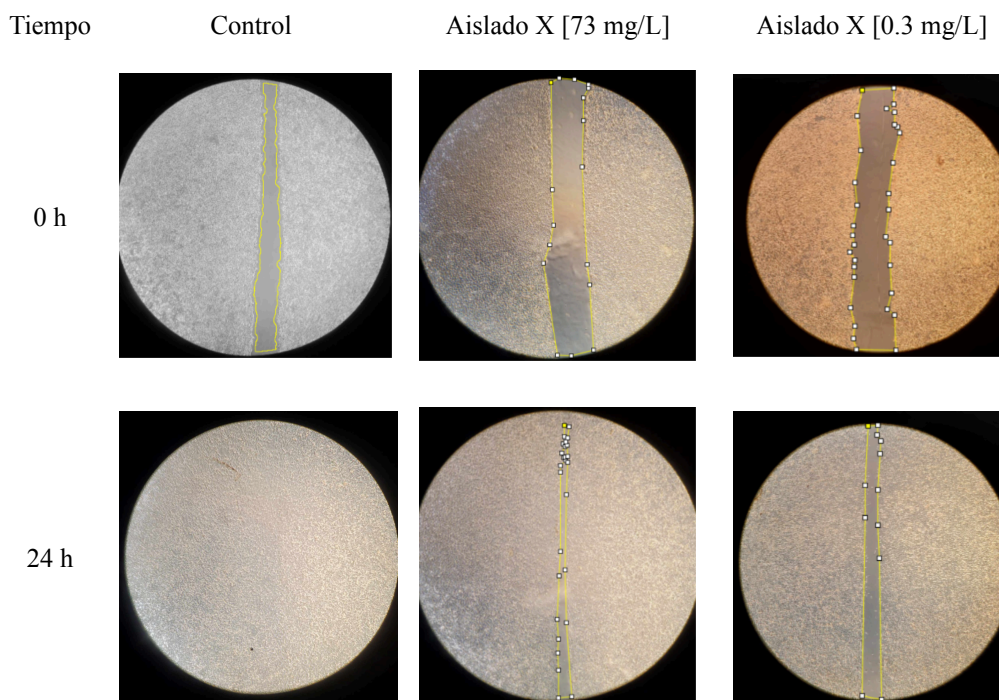


Figura 10. Comparación del ensayo de cierre de herida en presencia de dos concentraciones del biosurfactante producido por el aislado microbiano X. Imágenes ilustrativas del cierre de herida en la línea celular MDA-MB-231 a las 0 h y 24 h después de tratar el cultivo con las concentraciones de 0.3 y 73 mg/L del biosurfactante producido por el aislado X.

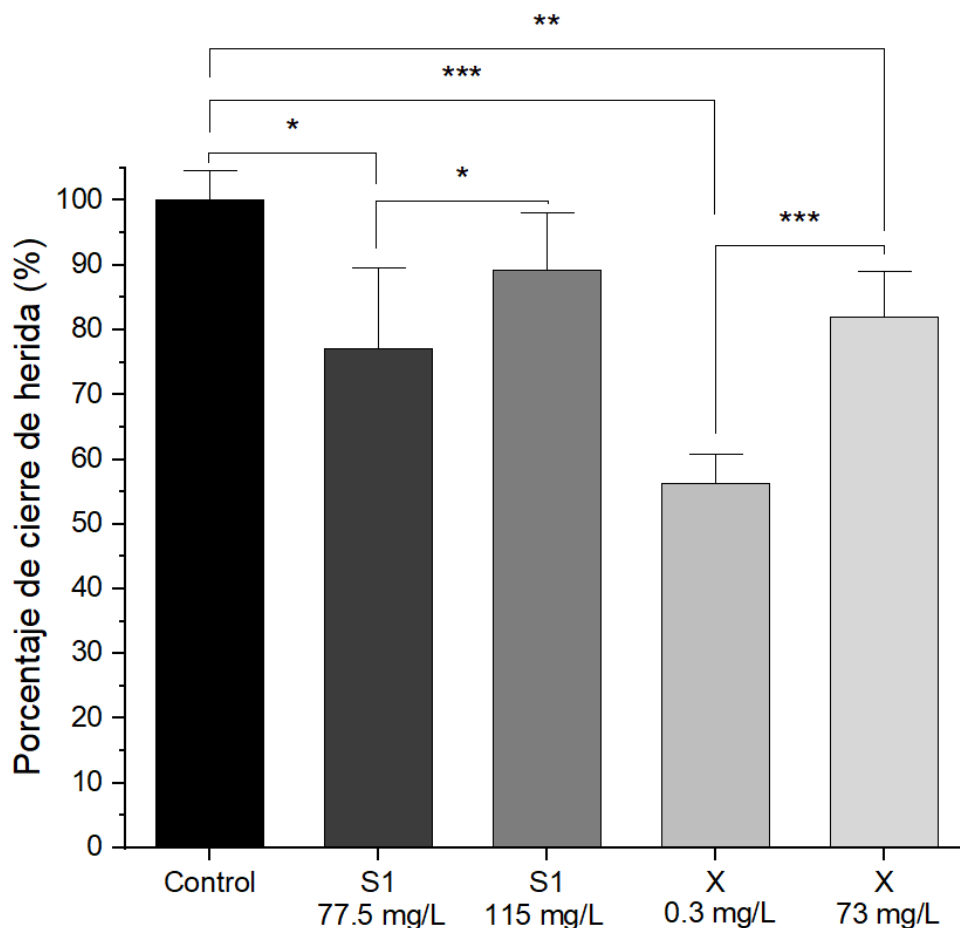


Figura 11. Porcentaje de cierre de herida en presencia de los biosurfactantes producidos por los aislados S1 y X a distintas concentraciones. Comparación del porcentaje de cierre de los ensayos de herida después de la exposición a diferentes biosurfactantes. Las condiciones experimentales utilizadas fueron las siguientes: control (n=12); S1 [77.5 mg/L] (n=16), [115 mg/L] (n=12); X [0.3 mg/L] (n=16), [73 mg/L] (n=12), y se analizó el porcentaje de cierre de herida 24 h posteriores al ensayo. \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001).

### 3.1.1.3 Análisis de la dependencia del tiempo sobre la migración.

Después de analizar los posibles efectos sobre la migración celular a distintas concentraciones, se estudió el porcentaje de cierre de herida con respecto al tiempo, para ello, se utilizaron los biosurfactivos producidos por los aislados S1 [115 mg/L] y X [73 mg/L]. En la figura 12 se muestran los cierres de las heridas a distintos tiempos (0 h, 24 h y 48 h). Existió una disminución de la migración celular independientemente del tiempo de exposición en el caso del biosurfactante X. El análisis estadístico realizado indica que no existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la migración de la línea celular MDA-MB-231 entre los tiempos de exposición (24 h y 48 h) para ambos biosurfactantes (ver figura 13). Por lo tanto, los resultados encontrados indican

que no existe un efecto dependiente del tiempo de exposición a los biosurfactantes probados (el efecto producido en las primeras 24 h, se mantiene hasta las 48 h).

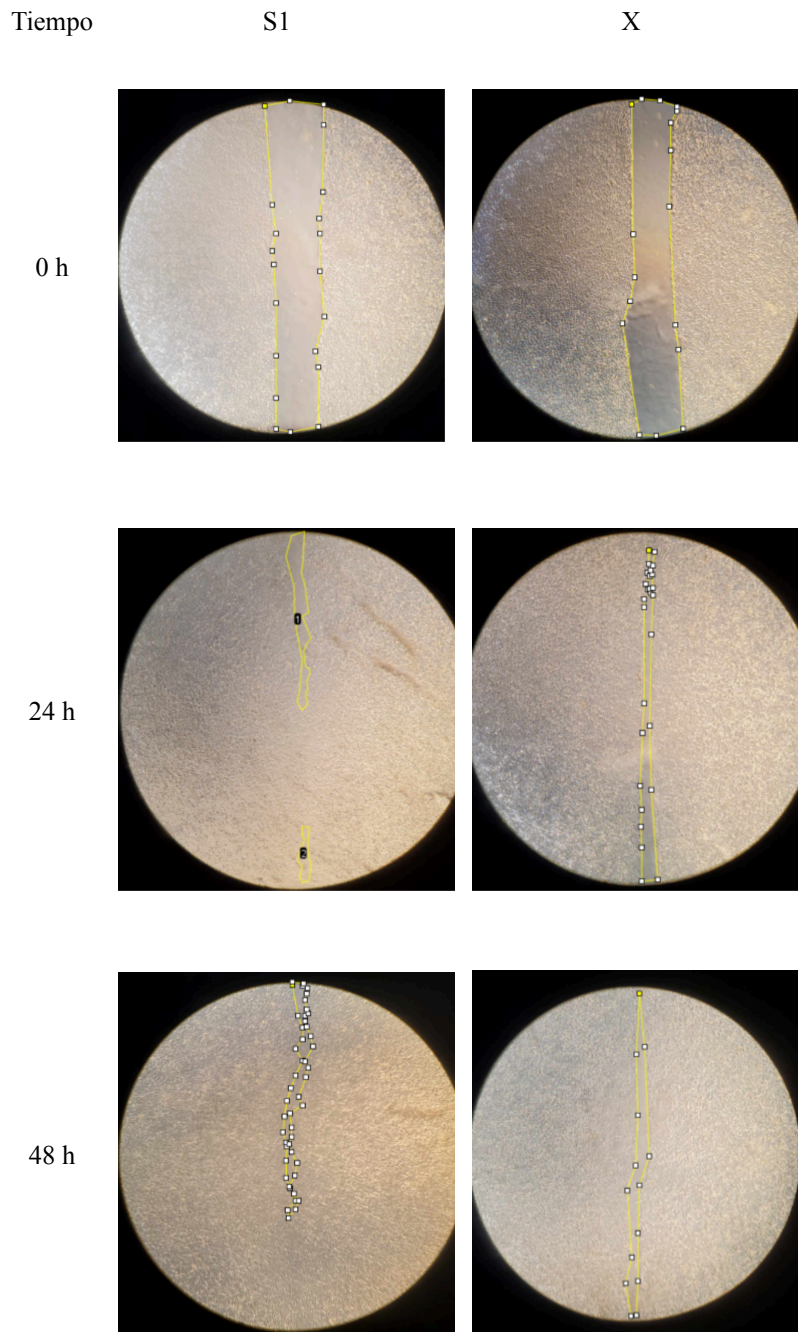


Figura 12. Curso temporal de ensayo de cierre de herida en presencia de los biotensioactivos producidos por dos aislados microbianos. Imágenes representativas del cierre de herida en la línea celular MDA-MB-231 a las 0, 24 y 48 h después de tratar el cultivo a concentraciones de 115 mg/L y 73 mg/L de los biosurfactantes producidos por los aislados S1 y X, respectivamente.

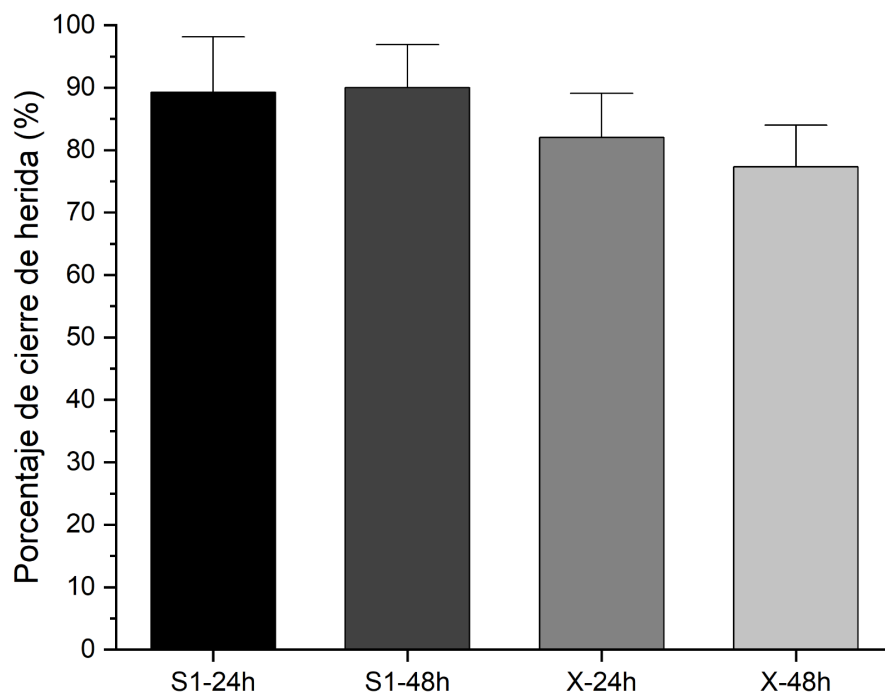


Figura 13. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de los biosurfactantes producidos por los aislados S1 y X a distintos tiempos. Las condiciones experimentales utilizadas fueron las siguientes: S1 24 h (n=12), 48 h (n=12); X 24 h (n=12), X 48 h (n=12).

### 3.1.2 Ensayo de viabilidad.

Se analizaron los efectos de los biosurfactantes sobre la viabilidad celular, esto se llevó a cabo mediante la implementación de conteo celular en cámara de Neubauer, utilizando una relación 1:9 de células y azul de tripano. A partir de las células viables se realizaron las curvas de crecimiento celular de la línea MDA-MB-231 en condiciones control y presencia de los biosurfactantes de origen microbiano.

En la figura 14 se observa la relación existente entre el crecimiento de las células de la línea MDA-MB-231 en condiciones control y en presencia del Bs producido por el aislado Q5. Para este ensayo se utilizó una concentración de 46 mg/L del biosurfactante. A partir de ello se registraron el número de células viables en presencia del Bs producido por el aislado Q5 a las: 48 h (n=8), 72 h (n=24), 96 h (n=24) y 120 h (n=24). A los tiempos estudiados, no se observa una disminución de la cantidad de células viables, por lo que se considera que el Bs producido por el aislado Q5 no afecta la viabilidad celular de la línea tumoral MDA-MB-231.

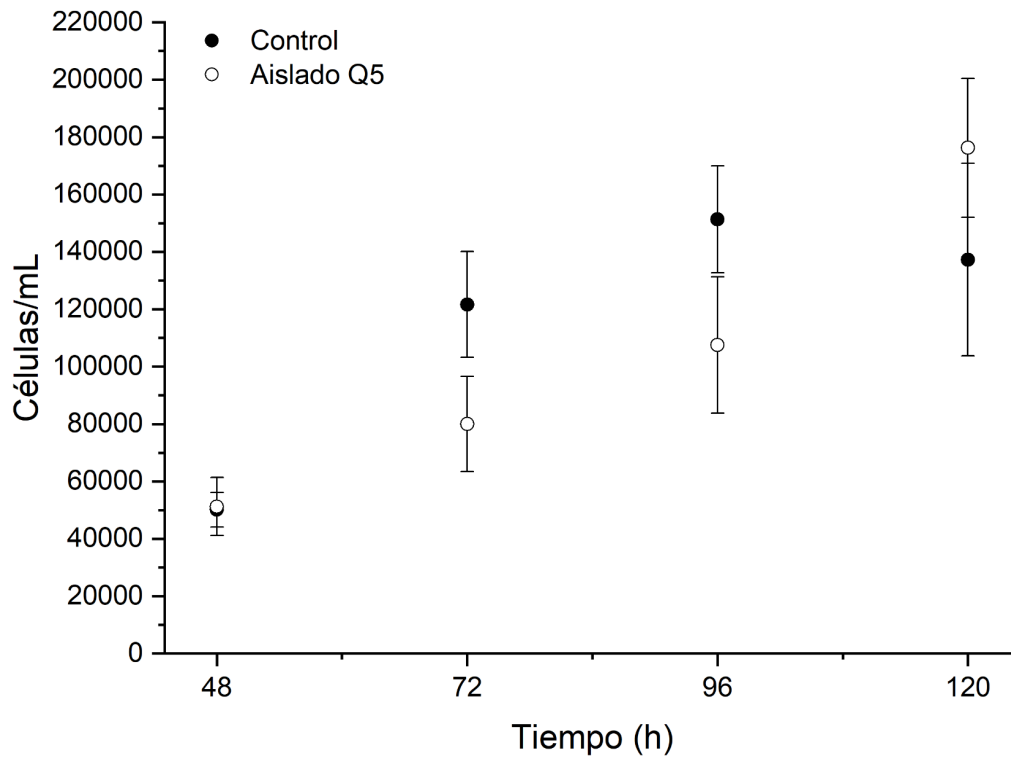


Figura 14. Crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231. Curvas de crecimiento de la línea celular en condiciones control y en presencia del biosurfactante producido por el aislado Q5 [46.5 mg/L]. Se graficaron y analizaron los resultados de los conteos celulares a 48 h (n=8), 72 (n=24), 96 h (n=24), 120 h (n=24).

En la figura 15 se muestra el comportamiento de las curvas de crecimiento de la línea celular MDA-MB-231 en presencia y ausencia (control) del Bs producido por el aislado XXV. La concentración utilizada de Bs fue de 58 mg/L, y se registró el crecimiento de las células viables a través del tiempo: 48 h (n=24), 72 h (n=24), 96 h (n=24) y 120 h (n=12). Dentro del periodo establecido para el análisis de la viabilidad, no se encontraron diferencias significativas. Debido a ello no se considera que el Bs producido por el aislado XXV afecte la viabilidad de la línea tumoral MDA-MB-231.

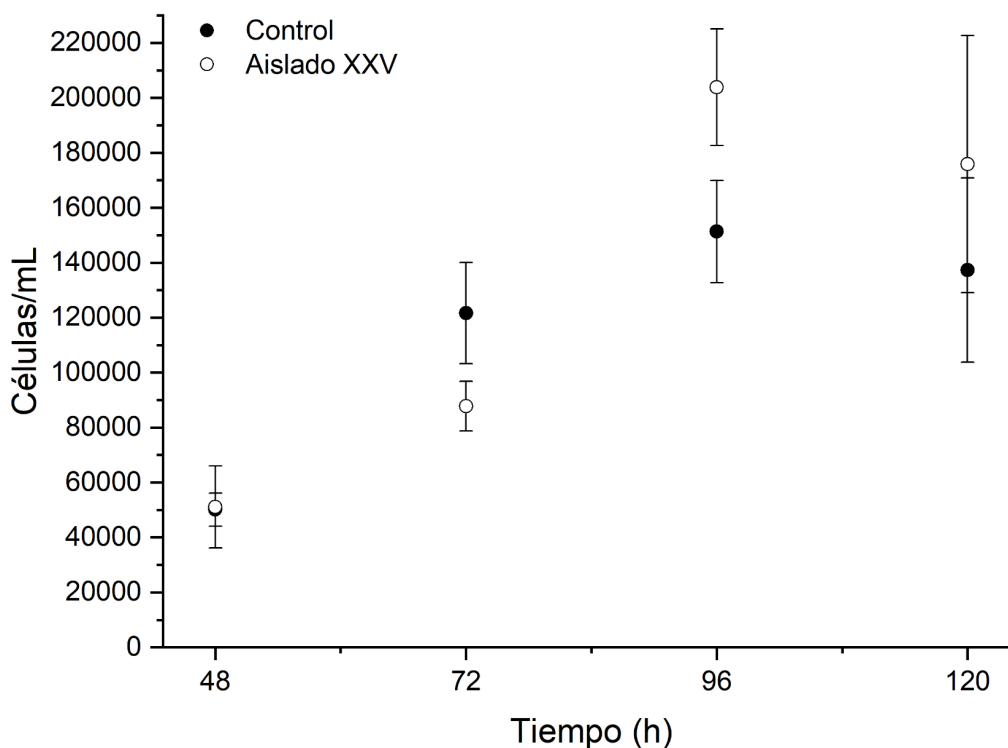


Figura 15. Curva de crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231. Ilustración de las curvas de crecimiento de la línea celular en condiciones control y en presencia del biosurfactante producido por el aislado XXV [58 mg/L]. Se graficaron y analizaron los resultados de los conteos celulares a 48 h (n=24), 72 h (n=24), 96 h (n=24), 120 h (n=12).

En la figura 16 se representa el crecimiento celular a través del tiempo en presencia del biosurfactante producido por el aislado S1 [77.5 mg/L] y en condiciones control. Los tiempos registrados para este experimento fueron a las 48 h (n=24), 72 h (n=24) y 96 h (n=24), siendo este periodo de tiempo la fase exponencial del crecimiento celular para la línea tumoral MDA-MB-231. Dentro de las primeras 72 h posteriores del experimento no se encuentra una disminución del número de células en comparación con el control. Por otro parte, a las 96 h se presenta una disminución de células viables en cultivo ( $p < 0.001$ ). Tomando en cuenta la premisa anterior, se puede decir que el Bs producido por el aislado S1 afectó la viabilidad de las células después de 96 h de exposición al biosurfactante.

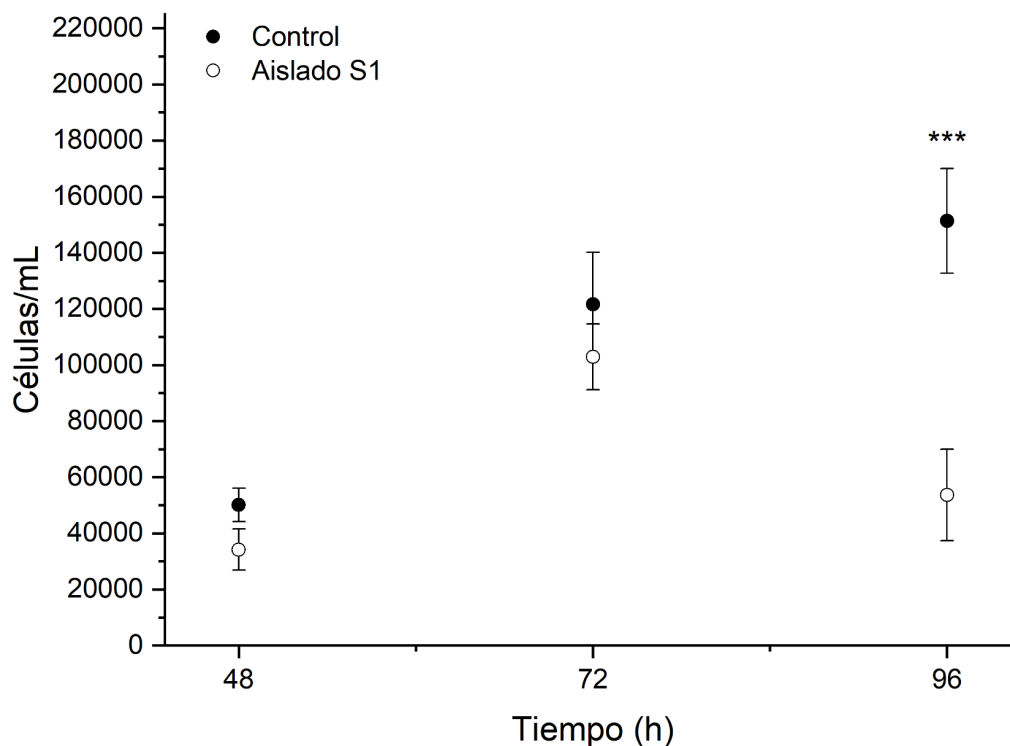


Figura 16. Curva de crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231. Ilustración de las curvas de crecimiento de la línea celular en condiciones control y en presencia del biosurfactante producido por el aislado S1 [77.5 mg/L]. Se graficaron y analizaron los resultados de los conteos celulares a 48h (n=24), 72 (n=24), 96h (n=24). \*\*\* (P<0.001).

De acuerdo con las curvas de crecimiento celular de la línea MDA-MB-231 en condiciones control y bajo el efecto del biosurfactante producido por el aislado S2, existe una disminución de la cantidad de células viables presentes en cultivo a las 120 h ( $p < 0.05$ ), ver figura 17. El efecto del biotensioactivo en la viabilidad, se considera de esta forma dependiente del tiempo de exposición. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: en concentración S2 [79.5 mg/L], los tiempos después del pasaje fueron a las 48 h (n=24), 72 h (n=24), 96 h (n=24) y 120 h (n=12).

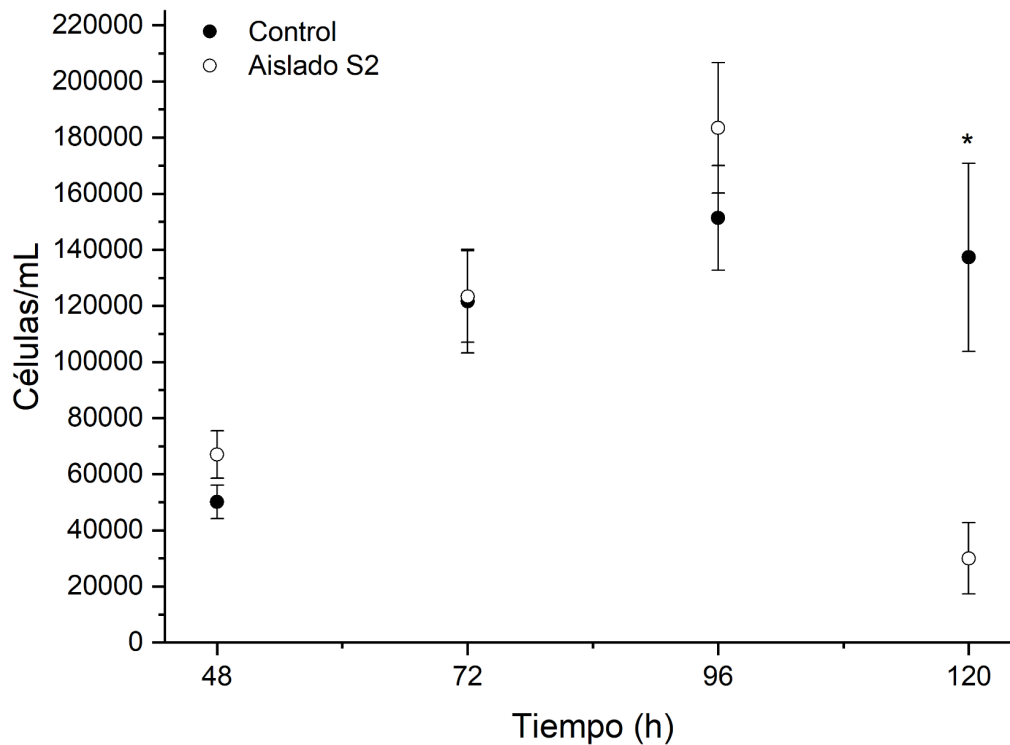


Figura 17. Curva de crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231. Ilustración de las curvas de crecimiento de la línea celular en condiciones control y en presencia del biosurfactante producido por el aislado S2 [79.5 mg/L]. Se graficaron y analizaron los resultados de los conteos celulares a 48 h (n=24), 72 h (n=24), 96 h (n=24), 120 h (n=12). \* (P<0.05)

En la figura 18 se puede analizar el crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231, en condiciones control y en presencia del Bs producido por el aislado X [0.3 mg/L]. Se estudió el mismo tiempo de exposición que en los casos anteriores: 48 h (n=24), 72 h (n=24), 96 h (n=24). Dentro de las primeras 72 h no se encontró una inhibición del crecimiento celular, observándose hasta las 96 h una disminución de la cantidad de células viables en cultivo ( $p < 0.01$ ). A partir de lo anterior se considera que el efecto del Bs producido por el aislado microbiano X es dependiente del tiempo de exposición.

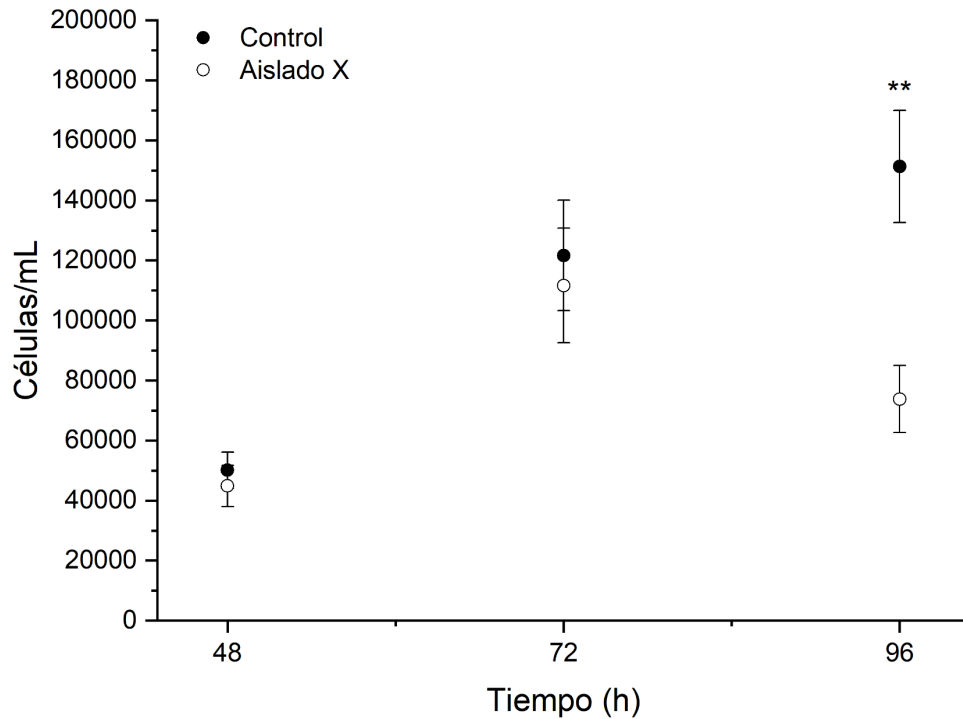


Figura 18. Curva de crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231. Ilustración de las curvas de crecimiento de la línea celular en condiciones control y en presencia del biosurfactante producido por el aislado X [0.3 mg/L]. Se graficaron y analizaron los resultados de los conteos celulares a 48 h (n=24), 72 h (n=24), 96 h (n=24). \*\* (P<0.01).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad por exclusión de azul de tripano, llevado a cabo en la presente investigación, se inferió lo siguiente: Los Bs sintetizados a partir de los aislados microbianos Q5 [46.5 mg/L] y XXV [58 mg/L] no presentaron una disminución significativa ( $p > 0.05$ ) en la viabilidad celular de la línea tumoral MDA-MB-231, dentro del transcurso temporal implementado (48 h-120 h). No obstante, no se descarta la posibilidad de que a concentraciones distintas ambos biosurfactantes puedan presentar actividad citotóxica con respecto a la viabilidad celular. Los biosurfactantes que presentaron una disminución de la viabilidad celular fueron los siguientes: sintetizado a partir del microorganismo productor S1 [77.5 mg/L], S2 [79.5 mg/L], y X [0.3 mg/L]; para los Bs producidos por S1 y X no se encontró una inhibición de la viabilidad las primeras 72 h, siendo hasta las 96 h en cultivo que la cantidad de células viables disminuyó significativamente en contraste con su control experimental: S1 ( $p < 0.001$ ) y X (0.01). Por último el Bs producido por el aislado S2 no presentó inhibición de las células viables en cultivo durante las primeras 96 h, siendo hasta las 120 h que disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la viabilidad celular, en comparación con el testigo.

### **3.2 Discusión.**

El presente trabajo de investigación se centró en la determinación de los posibles efectos citotóxicos de los tensioactivos de origen microbiano en una línea celular de cáncer de mama triple negativo. Este proceso se llevó a cabo realizando ensayos de herida y conteo celular por exclusión con azul de tripano, con la finalidad de determinar y cuantificar la inhibición de los procesos de migración y viabilidad celular. El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por su alta tasa proliferativa, invasividad tisular y metástasis [26]. Por lo que, tratamientos convencionales como la quimioterapia y la extirpación de la mama son poco efectivos contra este tipo de enfermedad. En la actualidad no se cuenta con terapias dirigidas para los subtipos moleculares del cáncer de mama triple negativo, esto se debe principalmente a la heterogeneidad de este tipo de cáncer [30-32]. La búsqueda de nuevos tratamientos contra esta enfermedad abre una amplia gama de posibilidades para su investigación. El reconocido potencial y naturaleza química de los biosurfactantes ha conducido al estudio de distintos surfactantes, enfocándose en sus posibles aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en el desarrollo de nuevos vehículos para la administración de fármacos (Santos et al., 2016). Diversos tipos de biosurfactantes han surgido como posibles agentes para quimioterapia o bioterapia, y como vehículos o ingredientes en fármacos anti-cancerígenos, debido a su estructura y propiedades biofísicas. Convirtiéndolos en una de las posibilidades plausibles para la obtención de nuevas estrategias en la terapia oncogénica. En este trabajo se encontró que los biosurfactantes producidos por los aislados microbianos con las claves S1, S2, X son capaces de inhibir los procesos de migración celular y disminuir la viabilidad celular de la línea tumoral MDA-MB-231.

Al existir una amplia variedad de estructuras químicas para cada biosurfactante en específico, y teniendo en cuenta que, dentro de la familia del cáncer existe diversidad en los mecanismos de acción de acuerdo a la carga genética de cada uno de ellos, así como los marcadores protumorales que se encuentran presentes, no es de extrañar que, los mecanismos de acción sobre los que actúan los biotensioactivos sean diversos. Por lo que es de vital importancia el estudio de dichos metabolitos, para la determinación de posibles efectos citotóxicos sobre las células tumorales, y con ello, analizar y proponer las posibles rutas de señalización o mecanismos de acción en las que podrían estar actuando los Bs sobre las células tumorales para la inhibición de la migración, metástasis y proliferación celular.

Tomando como precedente la surfactina, se ha demostrado que esta es capaz de inhibir o disminuir los procesos relacionados con el cáncer. Algunas de las líneas celulares sobre las cuales se ha estudiado son: MCF-7, BT-474, AU-565, y MDA-MB-231. Donde se reporta que la surfactina es capaz de disminuir la viabilidad de las células tumorales. Sin embargo una de las desventajas que presenta la surfactina es su capacidad para producir hemólisis, siendo así, un biometabolito que presenta un bajo índice de selectividad por células tumorales, actuando sobre eritrocitos y fibroblastos de mama no tumorales. No obstante, se ha demostrado que la modificación de la estructura química de la surfactina en sus radicales libres, agregando compuestos aminados, es capaz de aumentar la selectividad por células tumorales, disminuyendo considerablemente la destrucción de glóbulos rojos ante una respuesta autoinmune (Micelli et al., 2023).

En el caso de los biosurfactantes producidos por los aislados Q5 y XXV, empleados en esta tesis, no se encontró una inhibición de los procesos de migración celular y viabilidad celular. Una de las posibilidades existentes de esto, es la relación estructura-efecto de los Bs y la línea celular empleada, sin embargo, se requieren estudios adicionales para descartar o confirmar esta relación. De manera similar, de acuerdo a lo reportado por Micelli et al (2023), algunos análogos de la surfactina no presentan inhibición de la viabilidad celular sobre líneas tumorales, como lo fue en el caso de los análogos cargados aniómicamente, los cuales no afectan la viabilidad de la línea tumoral AU-565. Por último, se podría considerar que las concentraciones de Bs empleadas de Q5 y XXV no son las adecuadas para la inhibición de la migración y la viabilidad celular, aunado a que se desconocen las características estructurales o fisicoquímicas de estos biosurfactantes.

Por otra parte, los Bs producidos por los aislados microbianos S1, S2 y X inhibieron la migración celular a las 24 y 48 horas posteriores a la herida. En el curso temporal del efecto estudiado en este trabajo, para los Bs producidos por S1 [115 mg/L] y X [73 mg/L] se determinó que no hay un cambio significativo en función al tiempo de exposición ( $p > 0.05$ ). Por otra parte se determinó que los Bs utilizados durante esta investigación producen un mayor efecto cuando la concentración empleada del Bs es menor. Las concentraciones más efectivas para los Bs producidos por los aislados fueron los siguientes S1 [77.5 mg/L], S2 [79.5 mg/L] y X [0.3 mg/L], donde los porcentajes de cierre en las primeras 24 horas fueron de  $77.12\% \pm 8.23\%$ ,  $76.5 \pm 5.26\%$  y  $56.31 \pm 2.93\%$  respectivamente. Por lo que se podría inferir que a menor concentración mayor es la inhibición del proceso migratorio de las células tumorales. De manera similar, se ha

reportado que un fármaco que actúa en condiciones similares es la naltrexona, el cual es un antagonista opioide que inhibe la proliferación celular a concentraciones bajas, este proceso se lleva a cabo al interferir con la señalización celular y al modificar el sistema inmunológico. De acuerdo con Couto (2021), la naltrexona tiene efectos dependientes de concentración, a menor concentración mayor es el efecto, promoviendo resultados prometedores para personas con cáncer primario de vejiga, mama, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, colon y recto.

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizaron las mismas concentraciones implementadas con los ensayos de herida. Se encontró que a las 96 h los Bs producidos por los aislados S1 ( $p < 0.001$ ) y X ( $p < 0.01$ ) disminuyeron significativamente la cantidad de células viables totales. En el caso del Bs producido por el aislado S2 se cuantificó una disminución de la cantidad de células viables a las 120 h posteriores a la resiembra, teniendo una diferencia significativa en comparación con el control ( $p < 0.05$ ).

Se ha propuesto que los canales Nav1.5 en su isoforma adulta y neonatal, se encuentran sobreexpresados en la membrana lipídica de las células de la línea tumoral MDA-MB-231, impulsando de esta manera los procesos de invasividad y migración celular del cáncer de mama triple negativo. Una de las alternativas a agentes terapéuticos contra el cáncer, son fármacos, anestésicos locales o biometabolitos, que sean capaces de inhibir los canales Nav1.5 y disminuir los procesos de migración asociados con esta enfermedad.

Una de las hipótesis planteadas sobre el proceso de invasividad del cáncer de mama triple negativo describe la siguiente pauta: en las células mamarias, el canal Nav1.5 en sus dos isoformas se encuentra coexpresado con el intercambiador NHE-1. El cual es un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , donde la corriente de iones  $\text{Na}^+$  al medio intracelular regula directamente la salida de  $\text{H}^+$  al medio extracelular. Este intercambio puede derivar en la acidificación del medio extracelular, lo que favorece la actividad proteolítica de las catepsinas de cisteína y las metaloproteinasas de matriz. Como consecuencia del aumento de la proteólisis de las enzimas, la invasividad de las células de cáncer de mama aumenta (Brisson et al., 2013).

De acuerdo a lo encontrado en este trabajo, y lo reportado sobre la expresión de canales iónicos y su relación con las características metastásicas del cáncer de mama triple negativo; se pueden plantear distintos mecanismos de acción de los biosurfactantes con las células tumorales estudiadas. De esta manera, se puede hipotetizar y proponer el siguiente modelo sobre el posible

mecanismo de acción de los BS asociado a la sobreexpresión de los Nav1.5 en la línea celular MDA-MB-231. Existen diversas formas de regular la actividad que desarrollan los canales iónicos, una de las principales es la modulación alostérica, en el caso de los biosurfactantes, dependiendo de su estructura química y propiedades fisicoquímicas, podrían anclarse al sitio de unión alostérico, causando un cambio en la conformación del canal, lo que derivaría en la alteración en la funcionalidad del mismo o en su inactivación. Asimismo, tomando en cuenta la carga presente del Bs y el canal iónico, si la carga del biometabolito es negativa podría actuar directamente con la carga positiva del canal iónico, esto posiblemente derivaría en cambios estructurales o de actividad del canal, llevando a la inactivación de este.

Debido a que el efecto de los BS probados en este trabajo es directamente sobre la migración celular, se pueden plantear diversos modelos hipotéticos del modo de acción de éstos en las células tumorales MDA-MB-231. De acuerdo a lo reportado en la literatura sobre las características fisicoquímicas de los Bs, y la habilidad de interactuar con la membrana plasmática alterando sus características físicas y biológicas, y el papel clave funcional de las proteínas de membrana (como los canales iónicos de sodio Nav) en el proceso de migración celular de las células de cáncer de mama triple negativo, en el presente trabajo se plantean los siguientes posibles mecanismos de acción de los Bs.

Derivado de lo anterior, tras una posible inactivación de los canales Nav1.5 se regularía la actividad en conjunto que se lleva a cabo con el intercambiador NHE-1. Disminuyendo posiblemente las concentraciones de  $H^+$  en el medio extracelular (ME), manteniendo un pH fisiológico óptimo en el ME. De esta manera se interrumpiría la actividad proteolítica de las catepsinas de cisteína y las metaloproteinasas de matriz, inhibiendo de esta forma la actividad metastásica del cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, estos modelos hipotéticos requieren estudios alternos que permitan dilucidar por completo el posible mecanismo de acción de los BS en las células tumorales.

De manera similar, también se podría hipotetizar sobre un mecanismo asociado a la naturaleza química de los biosurfactantes. Debido a que los Bs son moléculas anfífilas, estos biometabolitos quizá serían capaces de atravesar la membrana lipídica por difusión simple, e inhibir directamente la función de los canales iónicos. Sin embargo, una de las posibles dificultades que tendrían los Bs de bloquear la actividad de los Nav1.5, se debería al tamaño de estas biomoléculas. Por lo que es más plausible que los Bs actúen sobre sitios alostéricos

encargados de la apertura del canal iónico, y estos sean atraídos por las cargas electrostáticas de la proteína transmembranal y el biometabolito en cuestión. El hecho de que los biosurfactantes se adhieran a sitios de unión alostéricos, representaría una alta selectividad hacia los Nav1.5, esto debido a que, aunque las isoformas de la subunidad  $\alpha$  del canal Nav (Nav 1.1- Nav 1.9) presentan alta homología estructural, existe una divergencia en la secuenciación de aminoácidos entre sus dominios C-terminales constituyentes, lo que permite interacciones de tipo proteína estructural y funcionalmente específicas con proteínas auxiliares.

En el caso de que la actividad de los Bs se lleve a cabo en la matriz extracelular. La capacidad de los Bs de producir micelas, daría pie a plantear la posibilidad de que exista un reacomodo de la cadena de fosfolípidos presentes en la membrana lipídica, dando lugar a un posible reordenamiento de la estructura de los canales iónicos, inhibiendo de esta manera el paso de iones al cerrar de forma permanente o temporal al canal.

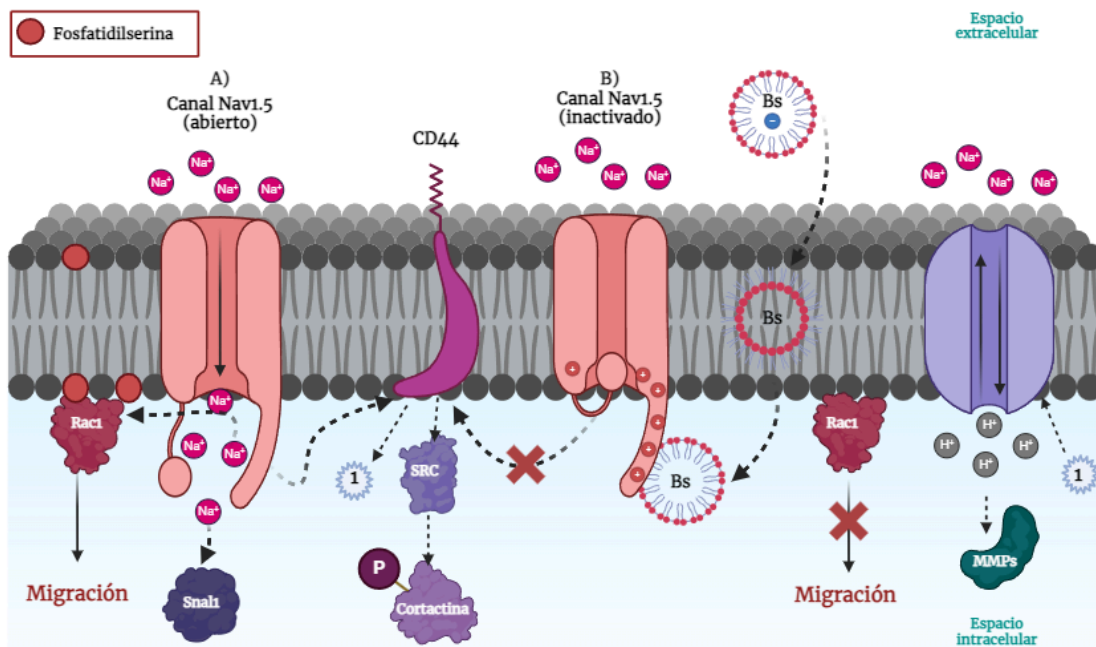


Figura 19. Modelo hipotético de sobreexpresión de los canales Nav1.5 en presencia/ausencia de biosurfactantes. A) Condiciones de ausencia de los Bs: los canales de sodio afectan al intercambiador NEH-1, encargado de la regulación del pH intracelular, en primer instancia se produce un desbalance de la cantidad de iones  $H^+/Na^+$  de forma intra y extracelular, produciendo una acidificación del medio extracelular, activando la actividad proteolítica de las catepsinas de cisteína, en consecuencia se produce la degradación de la membrana extracelular, facilitando la invasión de las células tumorales. B) En presencia de los Bs: el Bs produce micelas cargadas que interactúan con la membrana celular, invirtiendo su estructura de fosfolípidos al entrar en contacto con la membrana celular,

ocasionando la difusión simple del biometabolito hacia el espacio intracelular, al entrar en contacto con el espacio intracelular el Bs es capaz de revertir su cadena de fosfolípidos a su conformación original, por último el Bs es atraído por fuerzas electrostáticas hacia el canal Nav1.5, anclándose al sitio de unión alostérico del canal, lo que podría derivar en la inactivación del canal al posiblemente haber un cambio estructural del canal iónico, impidiendo la señalización de los diferentes receptores encargados de la migración de las células tumorales (Modificado de Rajaratinam et al., 2022).

Como se observa en la figura 19, existen diversos elementos que actúan a la par que los canales Nav1.5 dentro del proceso de migración celular. Una de las proteínas que se encuentran presentes es el Rac1 que promueve la migración del cáncer de mama triple negativo, esto en respuesta a cambios iónicos presentes en el medio intracelular. Por otra parte se encuentra el eje de señalización CD44, el cual a través de regulación negativa de los canales Nav1.5, aumenta la capacidad metastásica de las células tumorales. En última instancia se cuenta con la proteína SNAIL, la cual se encarga de promover la transición epitelio-mesénquima. Es debido a estas rutas de señalización para la invasividad tisular del cáncer que, los canales Nav1.5 son uno de los objetos de estudio más prometedores para el tratamiento del cáncer de mama. Es por medio de la inhibición o bloqueo de los canales de sodio, que se podría reducir la capacidad de las células de migrar y proliferar.

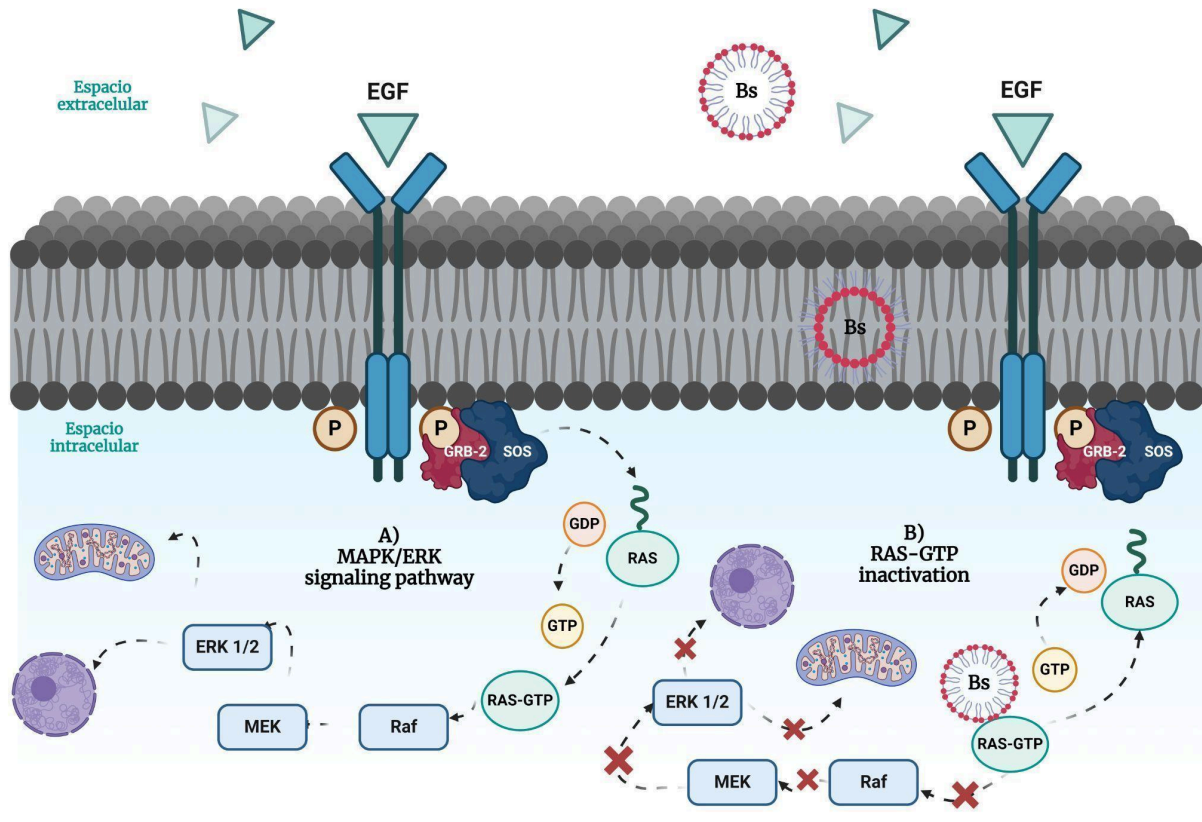


Figura 20. Modelo hipotético de la vía de señalización de MAPK/ERK en presencia/ausencia de biosurfactantes. A) Ausencia de biosurfactantes: Al unirse *EGF* a sus receptor membranar (*EGFR*), se dimeriza el receptor en su región intracelular, señalizando a la proteína GRB-2 para su unión en su dominio SH-2 con los residuos de tirosina, desencadenando en la unión de la proteína SOS al dominio SH-3 de GRB-2, pasando del estado inactivo a activo de la proteína RAS, activando la cascada quinasa, que a través de la proteína ERK 1/2 se afectan los factores de transcripción que se encuentran en el núcleo celular o la región citoplasmática. B) Presencia de biosurfactantes: El Bs se autoensambla produciendo micelas que entran en contacto con la membrana plasmática para llegar a la región intracelular, produciendo una regulación negativa de la proteína RAS-GTP, pasando a su estado inactivo, deteniendo la activación de la cascada quinasa, impidiendo que ERK 1/2 afecte los factores de transcripción de la región citoplasmática y el núcleo celular (Modificado de Guo et al., 2020).

Como se observa en la figura 20, otra de las vías de señalización involucradas en la metástasis celular, es la ruta *MAPK/ERK* (Wang et al., 2024), la cual interviene en la proliferación y diferenciación celular del sistema humano; es la desregulación de esta vía la que promueve la tumorigénesis. Dentro de esta cascada protumoral se encuentra el receptor del factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés *EGFR*, al cual se une directamente el factor de crecimiento epidérmico (*EGF*), a partir de esta unión empieza el proceso de dimerización del

receptor, lo cual es provocado por la autofosforilación de los residuos de tirosina en la región intracelular del receptor. Produciendo la señalización de la proteína *GRB-2*, uniéndose a los residuos de tirosina fosforilados en el dominio SH-2 de la proteína, desencadenando la activación de esta. Es este mecanismo, el que envía una señal a la proteína *SOS*, la cual se une directamente al dominio SH-3 de la proteína *GRB-2*; *SOS* es conocida por ser un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, es esta característica la que actúa sobre la proteína *RAS*, pasando de su estado inactivo a activo, al intercambiar los nucleótidos de guanina de *GDP* a *GTP*. Es a partir de este proceso que, la cascada de señalización quinasa se activa, iniciando la cascada de fosforilación de *RAF/MAP-KKK*, a *MEK/MAP-KK*, a *ERK/MAPK*. Es esta última proteína que al ser activada entra en contacto con el núcleo celular o sustratos de la región mitocondrial, con la finalidad de afectar los factores de transcripción, y de esta manera promover la metástasis y proliferación celular.

En una revisión de Wang et al. (2024) mencionan que los Bs son capaces de afectar la vía mitocondrial a partir de la generación de especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés *ROS*. Algunos soforolípidos lactónicos son capaces de aumentar los niveles de *ROS*, modulando el potencial de membrana mitocondrial e impactando en la migración de las células tumorales. De acuerdo con una revisión de Malla et al. (2021), el Bs MEL-B , produce necrosis en líneas celulares de cáncer de pulmón (A549), cáncer de mamá triple negativo (MDA-MB-231) y en melanoma de piel de ratón (B16-F10), al aumentar la cantidad de especies reactivas de oxígeno, dañando la vía mitocondrial.

En etapas tempranas del cáncer de mama triple negativo las *ROS* promueven la actividad tumoral, a través del estrés oxidativo y la sustitución de pares de bases (*RAS*). La comunicación de las *ROS* con las vías de señalización se lleva a cabo en el microambiente tumoral (*TME*); promoviendo la progresión tumoral y la metástasis. Las *ROS* son sustancias producidas a través del metabolismo celular por naturaleza, teniendo la capacidad de modificar las vías de señalización *MAPK*, *PI3K-AKT*, y *NF- $\kappa$ B* (Malla et al., 2021). No obstante, un aumento significativo de las especies reactivas de oxígeno en el *TME* puede llegar a inducir apoptosis celular, a través del daño a proteínas, el ADN mitocondrial y los lípidos, planteando el siguiente mecanismo de acción hipotético de los Bs.

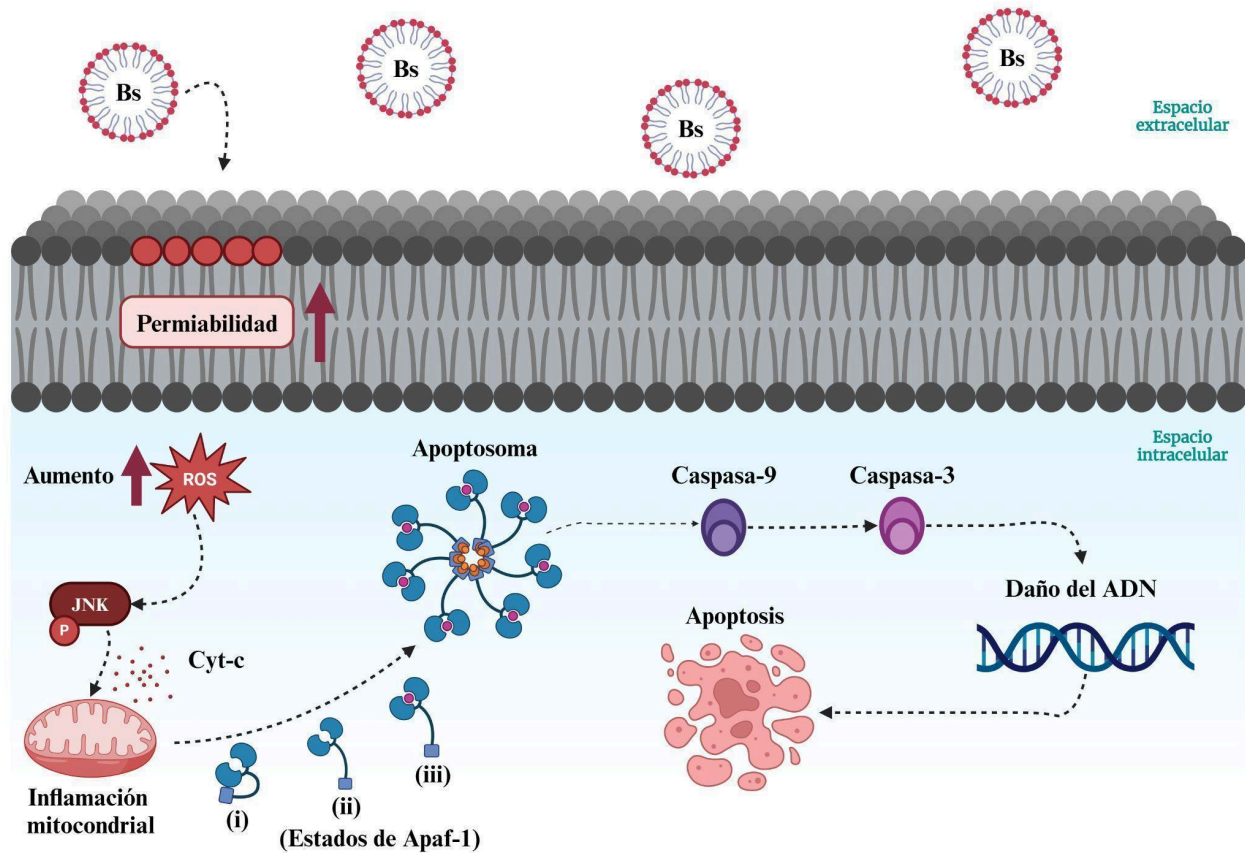


Figura 21. Modelo hipotético de la vía de señalización ROS/JNK; inducción de la apoptosis (muerte celular programada) mediada por la activación de caspasa 3. El Bs inicia su proceso de autoensamblaje produciendo micelas con la capacidad de unirse a la membrana plasmática, aumentando significativamente la permeabilidad de la bicapa lipídica. Iniciando el proceso de estrés oxidativo al aumentar la cantidad de ROS en el medio intracelular, por el aumento de iones en el medio. ROS activa la proteína *p-JNK*, incrementando la permeabilidad de la membrana mitocondrial; la liberación del citocromo c (*cyt-c*) activa la proteína *Apaf-1* mediante un proceso dependiente de ATP, generando un apoptosoma. El apoptosoma activa directamente la caspasa 9, siendo esta la principal promotora de la activación de la caspasa 3, eliminando en el proceso la poli-ADP-ribosa polimerasa, fragmentando el ADN e iniciando la muerte celular programada (Apoptosis) (Modificado de Wang et al., 2024).

Las ROS se encuentran por naturaleza en el medio intracelular permitiendo la homeostasis de las células. No obstante, como se muestra en la figura 21 un aumento significativo de las ROS en el medio intracelular, podría inducir la apoptosis mediante la activación *p-JNK*, que actúa como cofactor de la activación de las caspasas 3/9 (Gao et al, 2023). Dentro de esta vía de señalización, el biosurfactante cuenta con su propiedad de autoensamblaje, pudiendo generar micelas; siendo capaces de unirse a la membrana celular, esto debido a la gran similitud que existe entre los Bs y

los grupos fosfatos de la bicapa lipídica de las células animales. La adsorción del Bs se podría llevar a cabo mediante fuerzas de Van der Waals, alterando sus propiedades físicas (permeabilidad y elasticidad). Al aumentar la permeabilidad y elasticidad de la membrana, el flujo de iones se incrementa hacia el medio intracelular, generando estrés oxidativo en la célula. Activando directamente a la proteína Cinasa c-jun N-terminal (*p-JNK*). Este proceso aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberando citocromo c al medio intracelular, el cuál al unirse al Factor-1 Activador de la Proteasa de Apoptosis (*Apaf-1*) mediante la regulación de ATP, se genera un apoptosoma. Este último, está relacionado directamente con la activación de la caspasa 9, promoviendo la activación de la caspasa 3. La función de la caspasa 3 es eliminar la poli-ADP-ribosa polimerasa (encargada de la reparación del ADN), induciendo la fragmentación del ADN y la muerte celular programada.

Finalmente, de acuerdo a lo descrito, la relación estructura-actividad de los Bs, hace plausible la obtención de nuevos agentes terapéuticos altamente selectivos y biodisponibles. No obstante, es necesario mayor investigación de las propiedades fisicoquímicas, la estructura y el tamaño conformacional de estos biometabolitos, así como su estudio en células no tumorales, y un estudio más detallado que involucre diferentes vías de señalización y proteínas asociadas a los procesos tumorales para la determinación del posible mecanismo de acción de estas biomoléculas.

#### **4 CONCLUSIONES.**

En el presente trabajo, se determinó la actividad citotóxica de cinco biosurfactantes producidos por aislados microbianos de la región de Mexicali, con las claves S1, S2, Q5, X, XXV. Algunas características del sitio de aislamiento de los microorganismos como el pH, salinidad, temperatura, fuente de nitrógeno y carbono, les podría conferir a los biosurfactantes propiedades fisicoquímicas diferentes a las marcadas en la literatura por otros microorganismos extremófilos productores de biosurfactantes.

La administración de los biosurfactantes producidos por Q5 [46.5 mg/L] y XXV [58 mg/L] sobre la línea celular MDA-MB-231 no presentó una disminución de la viabilidad y migración celular. No obstante, los biosurfactantes producidos por los aislados S1, S2, y X inhiben la viabilidad y la migración celular sobre la línea tumoral MDA-MB-231. Por lo que, se decidió evaluar dos concentraciones distintas para los Bs sintetizados por S1 y X. Teniendo un mayor efecto sobre la migración celular a concentraciones bajas para ambos Bs; S1 [77.5 mg/L] y X [0.3 mg/L], por lo que, se considera que el efecto de los Bs sintetizados por S1 y X es dependiente de concentración. A su vez se evaluó la dependencia del efecto de los Bs producidos por S1 y X en el tiempo, generando persistencia en el efecto sobre la migración celular en el transcurso de 24 h a 48 h de exposición.

Algunos de los modelos planteados hasta el momento en la literatura, sobre las vías de señalización en las que podrían estar interfiriendo los Bs son: I) Los canales Nav1.5, II) la ruta ROS/JNK, y III) la ruta MAPK/ERK. Estas tres vías de señalización se encuentran relacionadas con la ruta metastásica y la proliferación de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231. Sin embargo, para la determinación de la vía de señalización en la que se encuentran involucrados los Bs producidos por los aislados S1, S2, y X es necesario implementar otro tipo de ensayos que permitan identificar la estructura química del Bs así como sus propiedades fisicoquímicas, lo que permitirá plantear hipótesis fundamentadas sobre el mecanismo de acción de estos biometabolitos.

## 5 REFERENCIAS.

- [1] Sherwood, L. (2010). *Human physiology: From Cells to Systems*. Thomson Brooks/Cole.
- [2] What is cancer? (2021, 11 octubre). National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [3] Dhanasekaran, R., Deutzmann, A., Mahauad-Fernandez, W. D., Hansen, A. S., Gouw, A. M., & Felsher, D. W. (2022). The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature reviews. Clinical oncology*, 19(1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00549-2>
- [4] Priestley, P., Baber, J., Lolkema, M. P., Steeghs, N., de Bruijn, E., Shale, C., Duyvesteyn, K., Haidari, S., van Hoeck, A., Onstenk, W., Roepman, P., Voda, M., Bloemendal, H. J., Tjan-Heijnen, V. C. G., van Herpen, C. M. L., Labots, M., Witteveen, P. O., Smit, E. F., Sleijfer, S., Voest, E. E., ... Cuppen, E. (2019). Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours. *Nature*, 575(7781), 210–216. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1689-y>
- [5] Gerstberger, S., Jiang, Q., & Ganesh, K. (2023). Metastasis. *Cell*, 186(8), 1564–1579. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.003>
- [6] de Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer cell*, 41(3), 374–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
- [7] Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 246(16), 1791–1801. <https://doi.org/10.1177/15353702211005390>
- [8] Andrades, A., Peinado, P., Alvarez-Perez, J. C., Sanjuan-Hidalgo, J., García, D. J., Arenas, A. M., Matia-González, A. M., & Medina, P. P. (2023). SWI/SNF complexes in hematological malignancies: biological implications and therapeutic opportunities. *Molecular cancer*, 22(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01736-8>
- [9] Types of Cancer Treatment. (2022). National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- [10] Surgery for cancer. (s. f.). American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/surgery.html>

- [11] Cha, J. H., Chan, L. C., Song, M. S., & Hung, M. C. (2020). New Approaches on Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(8), a036863. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036863>
- [12] Oliveira, G., & Wu, C. J. (2023). Dynamics and specificities of T cells in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 23(5), 295–316. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00560-y>
- [13] Pu, M., Messer, K., Davies, S. R., Vickery, T. L., Pittman, E., Parker, B. A., Ellis, M. J., Flatt, S. W., Marinac, C. R., Nelson, S. H., Mardis, E. R., Pierce, J. P., & Natarajan, L. (2020). Research-based PAM50 signature and long-term breast cancer survival. *Breast cancer research and treatment*, 179(1), 197–206. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05446-y>
- [14] Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., Zaguia, A., Koundal, S., & Belay, A. (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *BioMed research international*, 2022, 9605439. <https://doi.org/10.1155/2022/9605439> (Retraction published *Biomed Res Int*. 2023 Dec 29;2023:9872034)
- [15] Alkabban, F. M., & Ferguson, T. (2022). Breast Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- [16] Katsura, C., Ogunmwoyi, I., Kankam, H. K., & Saha, S. (2022). Breast cancer: presentation, investigation and management. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)*, 83(2), 1–7. <https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0459>
- [17] Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. H. (2021). Breast Cancer Treatment. *American family physician*, 104(2), 171–178.
- [18] Zhang, Y. N., Xia, K. R., Li, C. Y., Wei, B. L., & Zhang, B. (2021). Review of Breast Cancer Pathological Image Processing. *BioMed research international*, 2021, 1994764. <https://doi.org/10.1155/2021/1994764>
- [19] Breast Cancer Treatment (PDQ®). (2024, 19 enero). National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>
- [20] INEGI. (2023). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA INTERNACIONAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE). [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP\\_CMAMA23.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_CMAMA23.pdf)

- [21] Casaubon, J. T., Kashyap, S., & Regan, J. P. (2023). BRCA1 and BRCA2 Mutations. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- [22] Yadav, S., Boddicker, N. J., Na, J., Polley, E. C., Hu, C., Hart, S. N., Gnanaolivu, R. D., Larson, N., Holtegaard, S., Huang, H., Dunn, C. A., Teras, L. R., Patel, A. V., Lacey, J. V., Neuhausen, S. L., Martinez, E., Haiman, C., Chen, F., Ruddy, K. J., Olson, J. E., ... Couch, F. J. (2023). Contralateral Breast Cancer Risk Among Carriers of Germline Pathogenic Variants in ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, and PALB2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(9), 1703–1713. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01239>
- [23] Thennavan, A., Beca, F., Xia, Y., Recio, S. G., Allison, K., Collins, L. C., Tse, G. M., Chen, Y. Y., Schnitt, S. J., Hoadley, K. A., Beck, A., & Perou, C. M. (2021). Molecular analysis of TCGA breast cancer histologic types. *Cell genomics*, 1(3), 100067. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2021.100067>
- [24] Li, Z., Wei, H., Li, S., Wu, P., & Mao, X. (2022). The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug design, development and therapy*, 16, 305–314. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S336643>
- [25] Turner, K. M., Yeo, S. K., Holm, T. M., Shaughnessy, E., & Guan, J. L. (2021). Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *American journal of physiology. Cell physiology*, 321(2), C343–C354. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00109.2021>
- [26] Derakhshan, F., & Reis-Filho, J. S. (2022). Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annual review of pathology*, 17, 181–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042420-093238>
- [27] Shahbandi, A., Nguyen, H. D., & Jackson, J. G. (2020). TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends in cancer*, 6(2), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.007>
- [28] Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- [29] Lehmann, B. D., Colaprico, A., Silva, T. C., Chen, J., An, H., Ban, Y., Huang, H., Wang, L., James, J. L., Balko, J. M., Gonzalez-Ericsson, P. I., Sanders, M. E., Zhang, B., Pietenpol, J. A., & Chen, X. S. (2021). Multi-omics analysis identifies therapeutic

vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nature communications*, 12(1), 6276. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26502-6>

[30] Bergin, A. R. T., & Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1342. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>

[31] So, J. Y., Ohm, J., Lipkowitz, S., & Yang, L. (2022). Triple negative breast cancer (TNBC): Non-genetic tumor heterogeneity and immune microenvironment: Emerging treatment options. *Pharmacology & therapeutics*, 237, 108253. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108253>

[32] Won, K. A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *International journal of oncology*, 57(6), 1245–1261. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>

[33] Santos, B. L. P., Vieira, I. M. M., Ruzene, D. S., & Silva, D. P. (2024). Unlocking the potential of biosurfactants: Production, applications, market challenges, and opportunities for agro-industrial waste valorization. *Environmental research*, 244, 117879. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117879>

[34] Sanches, M. A., Luzeiro, I. G., Alves Cortez, A. C., Simplicio de Souza, É., Albuquerque, P. M., Chopra, H. K., & Braga de Souza, J. V. (2021). Production of Biosurfactants by Ascomycetes. *International journal of microbiology*, 2021, 6669263. <https://doi.org/10.1155/2021/6669263>

[35] Ramalingam, V., Krishnamoorthy, V., Ravikumar, V. T., & Rajendran, R. (2019). Production and structure Elucidation of anticancer potential surfactin from marine actinomycete micromonospora marina. *Process Biochemistry*, 78, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.002>

[36] Bjerck, T. R., Severino, P., Jain, S., Marques, C., Silva, A. M., Pashirova, T., & Souto, E. B. (2021). Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 8(8), 115. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8080115>

[37] Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [Updated 2024]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>

- [38] Mnif, I., Ellouz-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2018). Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. *Journal of Polymers and The Environment*, 26(5), 2192-2206. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1076-4>
- [39] Chauhan, V., & Kanwar, S. S. (2021). Lipopeptide(s) associated with human microbiome as potent cancer drug. *Seminars in cancer biology*, 70, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.012>
- [40] Miceli, R. T., Totsingan, F., Naina, T., Islam, S., Dordick, J. S., Corr, D. T., & Gross, R. A. (2023). Molecularly Engineered Surfactin Analogues Induce Nonapoptotic-Like Cell Death and Increased Selectivity in Multiple Breast Cancer Cell Types. *ACS omega*, 8(16), 14610–14620. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00454>
- [41] Kim, H., Jung, H., Kim, H., & Jeong, H. (2021). Surfactin exerts an anti-cancer effect through inducing allergic reactions in melanoma skin cancer. *International Immunopharmacology*, 99, 107934. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107934>
- [42] Abdelli, F., Jardak, M., Elloumi, J., Stien, D., Cherif, S., Mnif, S., & Aifa, S. (2019). Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. *Biodegradation*, 30(4), 287–300. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-09865-4>
- [43] Callaghan, B., Twigg, M. S., Baccile, N., Van Bogaert, I. N. A., Marchant, R., Mitchell, C. A., & Banat, I. M. (2022). Microbial sophorolipids inhibit colorectal tumour cell growth in vitro and restore haematocrit in Apcmin<sup>±</sup> mice. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(18), 6003–6016. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12115-6>
- [44] Ismail, R., Baaity, Z., & Csóka, I. (2021). Regulatory status quo and prospects for biosurfactants in pharmaceutical applications. *Drug Discovery Today*, 26(8), 1929-1935. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.029>
- [45] Haque, F., Khan, M. S. A., & AlQurashi, N. (2021). ROS-Mediated Necrosis by Glycolipid Biosurfactants on Lung, Breast, and Skin Melanoma Cells. *Frontiers in oncology*, 11, 622470. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.622470>
- [46] Cao, X., Wang, A., Wang, C., Mao, D., Lu, M., Cui, Y., & Jiao, R. (2010). Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/Caspase pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 183(3), 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.11.027>

- [47] Tank, J. G., & Pandya, R. V. (2022). Anti-proliferative activity of surfactins on human cancer cells and their potential use in therapeutics. *Peptides*, 155, 170836. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170836>
- [48] Voltage-gated ion channels. (s. f.). [Video]. JoVE. <https://www.jove.com/es/science-education/12245/voltage-gated-ion-channels>
- [49] Petkov, G. V. (2009). Ion channels. En *Elsevier eBooks* (pp. 387-427). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-369521-5.00016-6>
- [50] Ion Channels. (2011). *British Journal of Pharmacology*, 164(Suppl 1), S137–S174. [https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649\\_5.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649_5.x)
- [51] News-Medical. (2018, 26 octubre). Types of ion channels in the body. <https://www.news-medical.net/health/Types-of-Ion-Channels-in-the-Body.aspx#:~:text=Based%20on%20the%20stimulus%20to,and%20mechano%2Dsensitive%20ion%20channels.>
- [52] Haworth, A., & 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>
- [53] Voltage-Gated Sodium Channel | Complete Anatomy. (s. f.). [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com). <https://www.elsevier.com/resources/anatomy/synapse/presynaptic-region/voltage-gated-sodium-channel/16129>
- [54] De Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(18), 7093-7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>
- [55] Kefauver, J. M., Ward, A. B., & Patapoutian, A. (2020). Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. *Nature*, 587(7835), 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2933-1>
- [56] Delisi, D. A., & Saatloo, M. V. (2023). Ion channels and their role in chemo-resistance. En *Current Topics in Membranes* (pp. 125-150). <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2023.09.008>
- [57] Erdoğan, M. A., Ugo, D., & Fasolino, I. (2023). The role of ion channels in the relationship between the immune system and cancer. En *Current Topics in Membranes* (pp. 151-198). <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2023.09.001>

- [58] Bian, Y., Ji, T., He, L., Li, W., Li, S., Chu, H. M., & Zhao, Y. (2023). Voltage-gated sodium channels in cancer and their specific inhibitors. *Pathology - Research and Practice*, 251, 154909. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154909>
- [59] Horne, J., Mansur, S., & Bao, Y. (2021). Sodium ion channels as potential therapeutic targets for cancer metastasis. *Drug Discovery Today*, 26(5), 1136-1147. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.026>
- [60] Loussouarn, G., & Tarek, M. (2021). Editorial: Molecular Mechanisms of Voltage-Gating in Ion Channels. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.768153>
- [61] Luo, Q., Wu, T., Wu, W., Chen, G., 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. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01111>
- [62] Rao, R., Shah, S., Bhattacharya, D., Toukam, D. K., Cáceres, R., Pomeranz Krummel, D. A., & Sengupta, S. (2022). Ligand-Gated Ion Channels as Targets for Treatment and Management of Cancers. *Frontiers in physiology*, 13, 839437. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.839437>
- [63] Rosendo-Pineda, M. J., Moreno, C., & Vaca, L. (2020). Role of ion channels during cell division. *Cell Calcium*, 91, 102258. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102258>
- [64] Sanchez-Sandoval, A. L., Hernández-Plata, E., & Gomora, J. C. (2023). Voltage-gated sodium channels: from roles and mechanisms in the metastatic cell behavior to clinical potential as therapeutic targets. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1206136. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1206136>
- [65] Del Seguro Social, I. M. (2022). Epidemiología del cáncer de mama. *gob.mx*. <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
- [66] Brisson, L., Driffort, V., Benoist, L., Poet, M., Counillon, L., Antelmi, E., Rubino, R., Besson, P., Labbal, F., Chevalier, S., Reshkin, S. J., Gore, J., & Roger, S. (2013). NaV1.5 Na<sup>+</sup> channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *Journal of cell science*, 126(Pt 21), 4835–4842. <https://doi.org/10.1242/jcs.123901>
- [67] - Atkins, P.; de Paula, J. *Química Física*, 8<sup>a</sup> ed.; Médica Panamericana: Buenos Aires, 2008.

- [68] Couto, R. D., & Fernandes, B. J. D. (2021). Low Doses Naltrexone: The Potential Benefit Effects for its Use in Patients with Cancer. *Current drug research reviews*, 13(2), 86–89. <https://doi.org/10.2174/2589977513666210127094222>
- [69] Abbot, V., Paliwal, D., Sharma, A., & Sharma, P. (2022). A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals. *Heliyon*, 8(8), e10149. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10149>
- [70] Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 330, 124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>
- [71] Wang, X., An, J., Cao, T., Guo, M., & Han, F. (2024). Application of Biosurfactants in Medical Sciences. *Molecules* (Basel, Switzerland), 29(11), 2606. <https://doi.org/10.3390/molecules29112606>
- [72] Malla, R., Surepalli, N., Farran, B., Malhotra, S. V., & Nagaraju, G. P. (2021). Reactive oxygen species (ROS): Critical roles in breast tumor microenvironment. *Critical Reviews In Oncology/Hematology*, 160, 103285. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103285>
- [73] Gao, S., Zhang, X., Liu, J., Ji, F., Zhang, Z., Meng, Q., Zhang, Q., Han, X., Wu, H., Yin, Y., Lv, Y., & Shi, W. (2023). Icariin Induces Triple-Negative Breast Cancer Cell Apoptosis and Suppresses Invasion by Inhibiting the JNK/c-Jun Signaling Pathway. *Drug design, development and therapy*, 17, 821–836. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S398887>
- [74] Hegazy, G. E., Abu-Serie, M. M., Abou-Elela, G. M., Ghozlan, H., Sabry, S. A., Soliman, N. A., Teleb, M., & Abdel-Fattah, Y. R. (2022). Bioprocess development for biosurfactant production by *Natrialba* sp. M6 with effective direct virucidal and anti-replicative potential against HCV and HSV. *Scientific reports*, 12(1), 16577. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20091-0>
- [75] Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental And Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>

## 6 ANEXOS.

### 6.1 Ensayo de herida en exposición a un campo electromagnético de baja frecuencia.

Se realizó un ensayo de herida en presencia de un campo electromagnético de baja frecuencia en complemento con el biosurfactante producido por el aislado X a la concentración más alta (14.6 mg). El campo electromagnético implementado cuenta con las siguientes características: Forma de onda senoidal, una frecuencia de  $7.83 \pm 0.3$  Hz, con pasos de 0.05 Hz, un campo magnético de 0.115mT, una fuente de voltaje de 12V a 0.5A, con un tiempo de exposición de 48 h. Las condiciones de cultivo fueron las mismas utilizadas que en multiplaca de 12 pocillos. El ensayo fue realizado por duplicado en cultivos independientes.

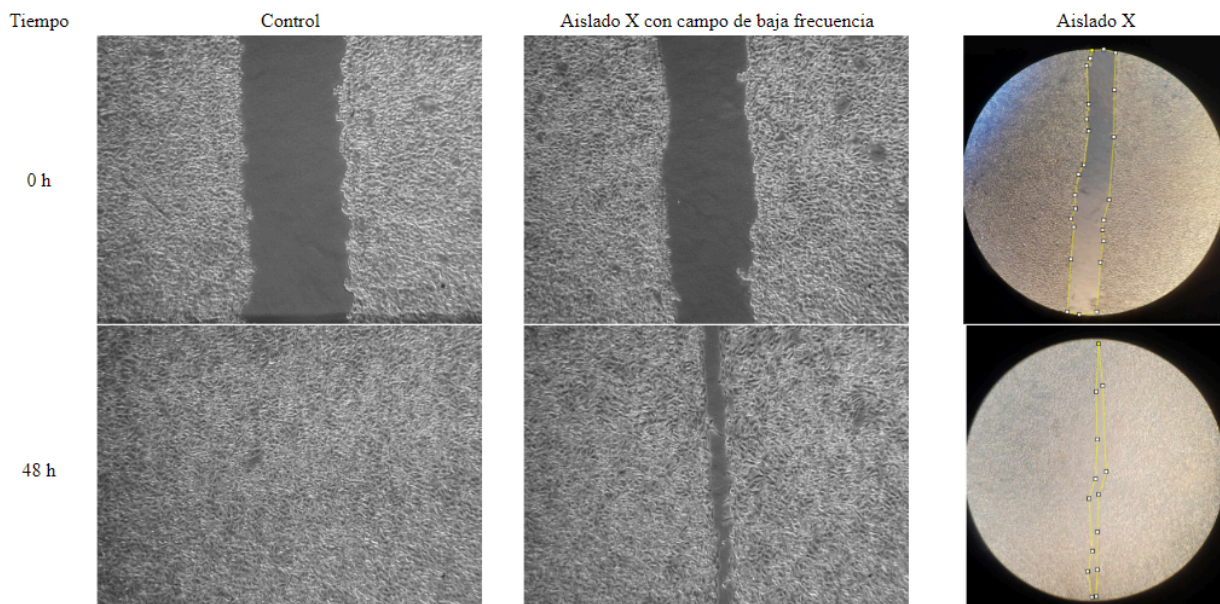


Figura 22. Ensayo cierre de herida en presencia del biosurfactante producido por el aislado X, expuesto a un campo electromagnético de baja frecuencia (CEMBF). Imágenes representativas del cierre de herida en la línea celular MDA-MB-231 a las 0 y 48 h después de tratar a las células con una concentración de 73 mg/L del Bs producido por el aislado X, y en presencia de un CEMBF con una frecuencia de  $7.83 \pm 0.3$  Hz, y campo magnético de 0.115mT.

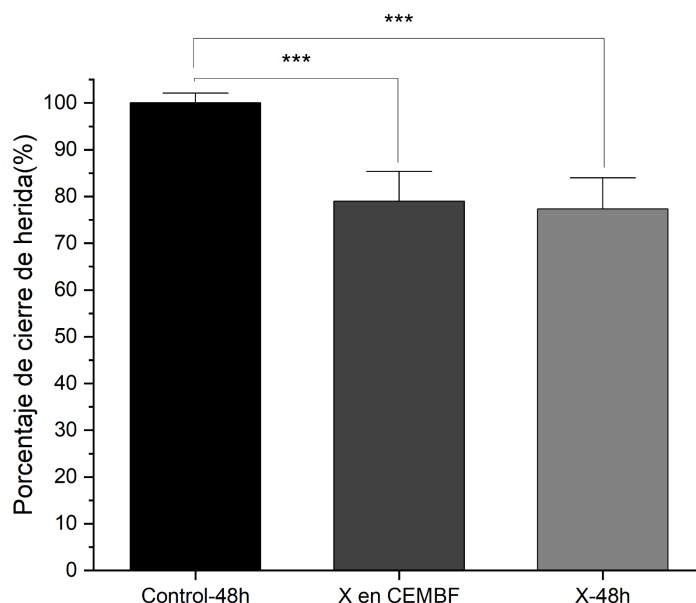


Figura 23. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia del Bs producido por el aislado X con y sin exposición a un campo electromagnético de baja frecuencia. Las condiciones experimentales utilizadas fueron las siguientes: control (n=12); X (n=12) y X expuesto al CEMBF (n=6), el porcentaje de cierre de herida se obtuvo 48h posteriores al ensayo. \*\*\* (P<0.001).

Dentro de los resultados obtenidos para el ensayo de herida en presencia de un campo electromagnético de baja frecuencia en conjunto con el Bs producido por el aislado microbiano X, se determinó que hay una diferencia ( $p < 0.001$ ) de ambos experimentos con respecto al control a un tiempo de 48 horas posteriores a la herida en monocapa. Sin embargo, al comparar la inhibición de la migración celular en presencia/ausencia del biometabolito, se registra que no hay cambios significativos entre ambos ( $p > 0.05$ ), por lo que se deduce que el efecto citotóxico presentado en ambos casos, es directamente atribuible al Bs, por lo que el CEMBF bajo estas condiciones implementadas, no produce alteraciones en el comportamiento de la línea tumoral MDA-MB-231.

## 6.2 Ensayo morfológico.

Se fotodocumento la morfología de las células en condiciones control y en presencia de los Bs producidos por los aislados S1 [115 mg/L] y X [26mg/L], a las 48, 72 y 96 horas posteriores a la resiembra. Este análisis se realizó con la finalidad de identificar posibles cambios morfológicos en la línea tumoral MDA-MB-231 en presencia de los Bs por posibles efectos citotóxicos. El monitoreo del control fue empleado para asegurar que los experimentos realizados sean confiables, al indicar que las células están teniendo un comportamiento normal.

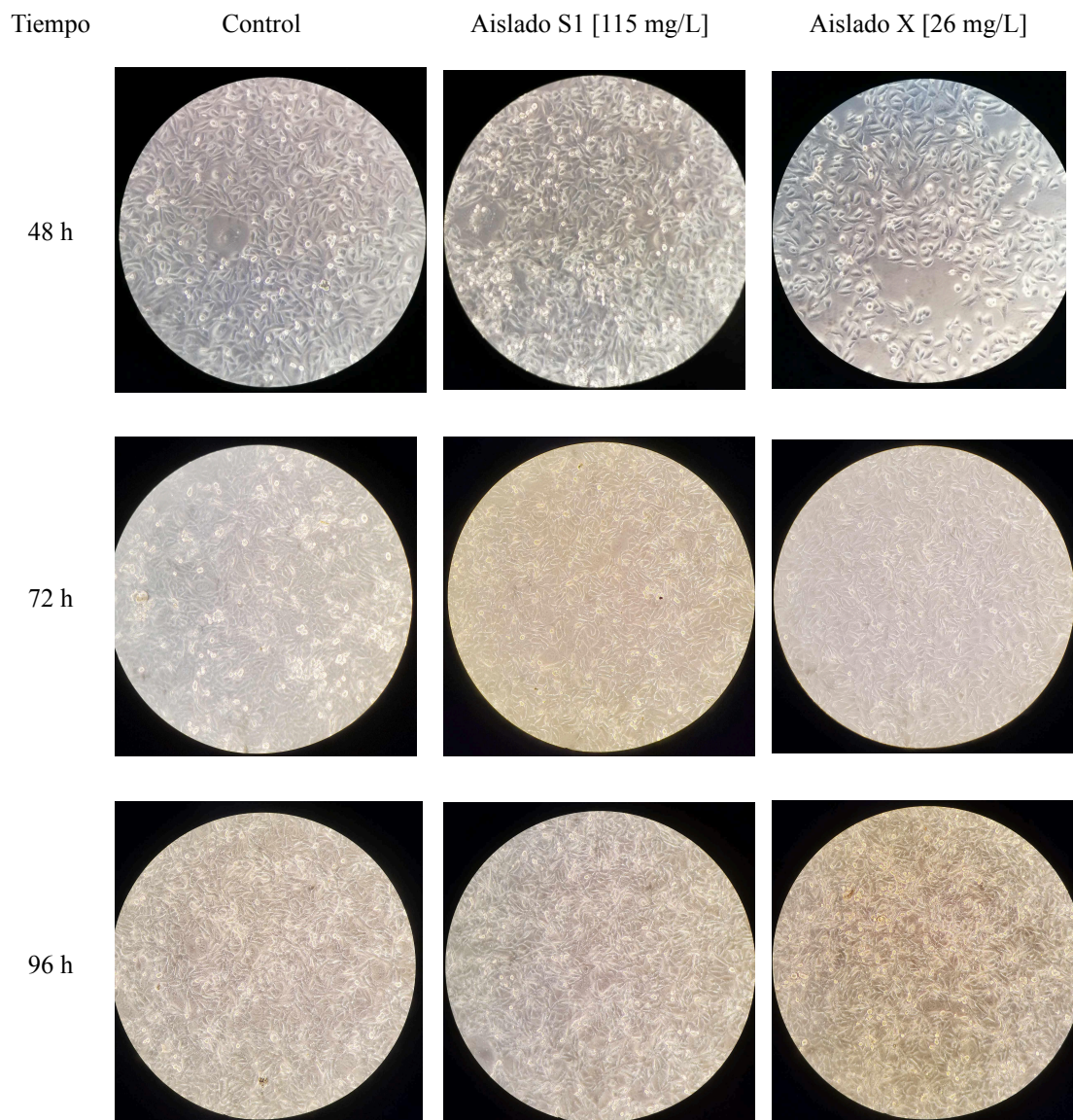


Figura 24. Ensayo morfológico de la línea celular MDA-MB-231. Imágenes ilustrativas de la morfología celular 48, 72 y 96 h posteriores a la resiembra. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: control (n=3), S1 (n=3), X (n=3).

### 6.3 Modelo matemático para la línea celular MDA-MB-231.

Tomando en cuenta las condiciones biológicas presentes en el cultivo en monocapa de la línea tumoral MDA-MB-231 se desarrolló un modelo matemático para determinar las fases de crecimiento presentes en cultivo en un curso temporal (0 h-168 h). El modelo matemático empleado, toma como referencia las seis fases existentes para el crecimiento poblacional; fase lag, fase de aceleramiento, fase exponencial, fase de desaceleramiento, fase de confluencia celular, fase de latencia o muerte celular. El presente modelo toma en cuenta la carga máxima de crecimiento celular presente de forma *in vitro*.

$$N(t) = \frac{N_{m\acute{a}x}}{1 + \left[ \left( \frac{N_{m\acute{a}x}}{N_0} - 1 \right) \cdot e^{-kt} \right]} \quad (1)$$

Donde:

$N(t)$ = Es la cantidad de células en un tiempo determinado.

$N_{m\acute{a}x}$ = Es la cantidad máxima de células que pueden crecer en cultivo (carga máxima).

$N_0$ = Son las condiciones iniciales del cultivo, número de células sembradas/mL.

$k$ = Es la constante de crecimiento por fase de cultivo.

Tabla 1. Constantes de crecimiento celular para la línea MDA-MB-231 en sus diferentes fases de crecimiento celular.

Tiempo (h)	k	Fase de crecimiento
0		Latencia o lag
24	0.018334307	Proliferación
48	0.018334307	Proliferación
72	0.040348084	Desaceleración
96	9.087688454	Confluencia celular
120	0.031688999	Latencia o muerte
168	0.003546558	Latencia o muerte

La ecuación empleada para la determinación de la constantes por cada fase fue la siguiente:

$$k = \frac{\left[ \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{\ln(f)} \right]}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

Donde:

$k$ =constante de crecimiento por fase.

$N$ = número de células presentes en un tiempo determinado.

$f$ = valor del a evaluar en el logaritmo natural dependiendo la fase de crecimiento.

Tabla 2. Valores de f para cada una de las fases de crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231.

Tiempo	f
0	
24	2
48	2
72	$\geq 2$
96	1.001
120	<1
168	0.001

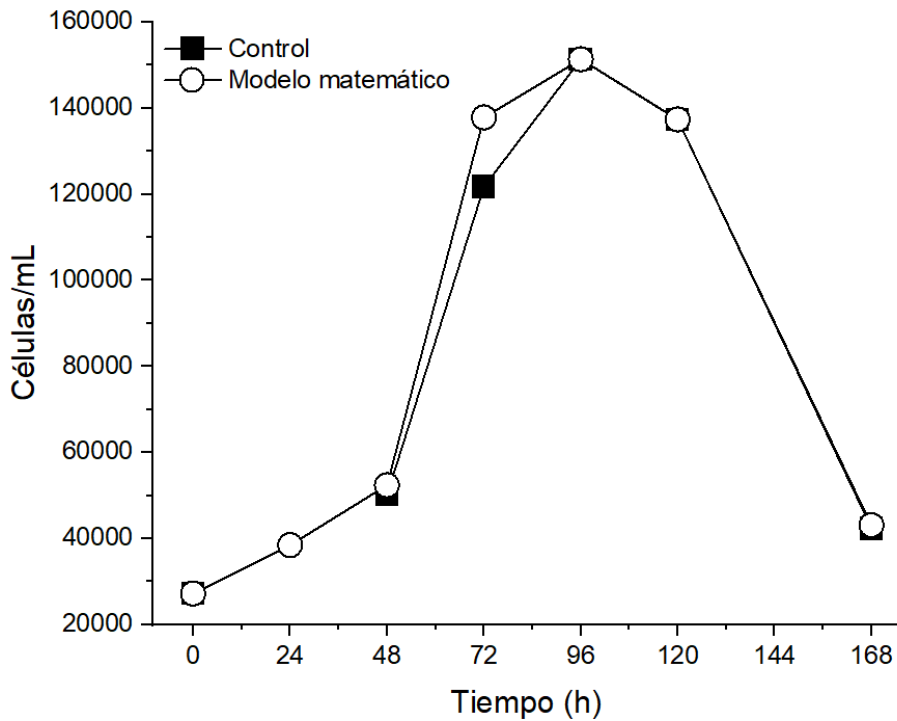


Figura 25. Curva de crecimiento de la línea celular MDA-MB-231. Ilustración comparativa de las curvas de crecimiento de la línea tumoral en condiciones control y aplicando la ecuación logística de Verhulst. Se analizaron y graficaron los resultados cuando  $t=0h$  ( $n=13$ ),  $48h$  ( $n=13$ ),  $72h$  ( $n=13$ ),  $96h$  ( $n=13$ ),  $120h$  ( $n=13$ ),  $168h$  ( $n=13$ ).