

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

---

**Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de cáncer  
de mama triple negativo en modelos de xenoinjertos en el pez  
cebra (*Danio rerio*)**

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

Presenta:

**José Jorge Hernández Sánchez**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**José Jorge Hernández Sánchez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
Directora de tesis

**Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**

**Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas**

**Dr. Fernando López Casillas**



---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **José Jorge Hernández Sánchez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

**Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo en modelos se xenojertos en el pez cebra (Danio rerio).**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Patricia Juárez Camacho  
**Directora de tesis**

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es un subtipo de cáncer de mama (CM) altamente agresivo y muy frecuente en mujeres latinoamericanas jóvenes. Hasta hoy no existen terapias eficaces para tratarlo, ya que las células de CMTN no expresan los receptores hormonales típicos de las células de CM que suelen utilizarse como blancos terapéuticos. Actualmente, los fármacos con capacidad para inducir estrés del retículo endoplásmico (ERE) se han postulado como una alternativa para el desarrollo de terapias contra el cáncer, ya que el ERE se asocia al aumento de estrés oxidativo en células cancerígenas, que conduce a su apoptosis. El reposicionamiento de fármacos es una estrategia que ayuda a optimizar el desarrollo de terapias en oncología. En conjunto con colaboradores, nuestro laboratorio identificó a través de un análisis computacional de firmas transcripcionales cuatro fármacos que inducen ERE y tenían potencial para ser reposicionados contra el CMTN. Los fármacos fueron probados In vitro, donde se evidenció su capacidad para inducir ERE sobre células de CMTN y determinar su efecto citotóxico. En el presente estudio se hipotetizó que dichos efectos podrían estar acompañados de un aumento de estrés oxidativo en las células cancerosas por exposición a los fármacos. Para probarlo, se cuantificaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las líneas celulares MDA-MB-231, 4T1 y 293T al exponerse a distintas concentraciones de penfluridol y NNC 55-0396. Los resultados evidenciaron la capacidad pro-oxidante de los fármacos, así como sus propiedades anticancerígenas In vitro. Asimismo, se inició el escalamiento de los resultados hacia un modelo in vivo con el pez cebra (Danio rerio) como modelo. Para ello, se construyó un sistema de crianza capaz de albergar peces adultos y con condiciones óptimas para reproducción. En embriones de pez cebra, se observó que la exposición aguda al penfluridol en etapas tempranas del desarrollo induce teratogénesis, y produce efectos tóxicos sobre el neurodesarrollo, la frecuencia cardiaca y la tasa de eclosión. Nuestros resultados sugieren que el penfluridol puede tener efectos severos secundarios, y sugieren continuar a detalle su estudio para comprobar su seguridad para uso humano.

**Palabras clave:** reposicionamiento de fármacos, estrés oxidativo, cáncer de mama triple negativo, pez cebra

Abstract of the thesis presented by **José Jorge Hernández Sánchez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

**Drug repositioning for triple negative breast cancer treatment in zebrafish (*Danio rerio*) xenograft models**

Abstract approved by:

---

PhD. Patricia Juárez Camacho  
**Thesis director**

Triple negative breast cancer (TNBC) is a highly aggressive breast cancer (BC) subtype, which also has a high frequency in young Latin-American women. To this day, there are no efficient therapies to treat TNBC, given their null expression of hormone receptor typically present in BC cells, which are used as biomarkers for target therapies. Recently, drugs capable to induce endoplasmic reticulum stress (ERS) had been proposed as an alternative for the development of cancer therapies because of the association of ERS and the increase of oxidative stress in cancer cells, which may cause cell death. Drug repurposing is a helpful strategy for therapy optimization in oncology. In 2017, through transcriptional signature in silico analysis, four previously known drugs were proposed for their repurposing for TNBC treatment, given their suggested capacity to increase ERS. In 2020, these drugs were tested in vitro, probing their properties as ERS inducers in TNBC cells with a putative capacity to induce cell death. In this study, we hypothesized these effects might be positively correlated with oxidative stress. To probe this, we quantified reactive oxygen species (ROS) in MDA-MB-231, 4T1 and 293T cells exposed to penfluridol and NNC 55-00396 at different concentrations. Our results confirm the pro-oxidative properties of this drugs and their In vitro cytotoxic effects, specifically in cell viability. We also started probes of these effects in animal models with zebrafish (*Danio rerio*). This was achieved initially by the mounting of a zebrafish housing system, capable for the maintenance of adult zebrafish in optimal conditions for reproduction. In zebrafish embryo we observed teratogenic, neurotoxic, cardiotoxic and development abnormalities after penfluridol and NNC 55-0396 exposition during early gestational stages. Thus, our results suggest both pharmacological compounds may cause several side effects when used as cancer therapies. Nevertheless, our findings have the potential for helping to find optimal concentrations for both pharma, in which their side effects are minimal and the anti-cancer potential remain.

**Keywords: drug repositioning, oxidative stress, triple negative breast cancer, zebrafish**

## **Dedicatoria**

A mi motor, mi motivo de ser y de estar, mi razón para amar los días y los actos; mi familia.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por permitirme dar un enorme paso en mi formación profesional y darme un hogar durante este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el sustento económico que se me otorgó a través del programa 002240 para becas nacionales.

A la Dra. Patricia Juárez por darme la oportunidad de crecer académicamente en su grupo de trabajo, y por ser siempre una fuente de apoyo. Por creer en mí y ser empática en todo momento. Mi admiración hacia usted es más aún que sólo en el ámbito profesional, sino que admiro la gran persona que es. Gracias por todo.

A los miembros de mi comité evaluador; el Dr. Ulises Bardullas, por ser un consejero de tiempo completo y por seguir enriqueciendo mi formación como desde el principio de esta. Al Dr. Pierrick Fournier, por ser el más grande ejemplo que tengo hasta hoy de un científico entregado y disponible a cooperar al crecimiento de sus pupilos. A la Dra. Carmen Paniagua Chávez, por siempre velar por el bien del proyecto y mostrar un interés genuino por el crecimiento del mismo. Al Dr. Fernando López Casillas por su enorme hospitalidad durante mi estancia académica en su laboratorio, y más aún, por siempre mostrar una perspectiva distinta sobre lo que acontecía en el proyecto; algo con lo que sin duda fue clave para concluir todo con éxito.

Al personal del Departamento de Innovación Biomédica y del posgrado en Ciencias de la Vida, por siempre tener las puertas abiertas cuando necesité de su apoyo.

A mi familia, amigos y seres queridos por siempre ser mi fuente de motivación e inspiración para seguir adelante.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	1
1.1.1 Cáncer de mama y cáncer de mama triple negativo.....	2
1.1.2 El reposicionamiento de fármacos y el estrés del retículo endoplásmico .....	3
1.1.3 El estrés oxidativo en el cáncer .....	4
1.1.4 El pez cebra como modelo animal para el estudio del cáncer .....	5
1.2 Justificación .....	6
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos .....	7
1.4.1 Objetivo general .....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>9</b>
2.1 Compuestos farmacológicos .....	9
2.2 Líneas celulares .....	9
2.3 Ensayos in vitro .....	9
2.3.1 Evaluación de viabilidad celular .....	9
2.3.2 Estrés oxidativo .....	10
2.4 Ensayos en modelos de pez cebra .....	11
2.4.1 Montaje del sistema y condiciones de crianza y reproducción .....	11



2.4.2	Pruebas de toxicidad de los fármacos en embriones y larvas de pez cebra .....	12
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>		<b>15</b>
3.1	Ensayos <i>in vitro</i> .....	15
3.1.1	Citotoxicidad.....	15
3.1.2	Inducción de estrés oxidativo por exposición a penfluridol y NNC 55-0396 .....	17
3.2	Toxicidad de los fármacos en etapas tempranas del desarrollo en el pez cebra.....	19
3.2.1	Penfluridol en peces Wild Type.....	19
3.2.2	Pruebas de toxicidad en peces de la línea Tg(eGFP:Fli1) .....	23
3.2.2.1	Índice de eclosión.....	23
3.2.2.2	Cardiotoxicidad .....	24
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>		<b>26</b>
4.1	Ensayos <i>in vitro</i> .....	26
4.1.1	Citotoxicidad de los fármacos en modelos celulares .....	26
4.1.2	Inducción de estrés oxidativo.....	28
4.2	Ensayos <i>in vivo</i> .....	30
4.2.1	Peces Wild Type .....	30
4.2.1.1	Sobrevivencia .....	31
4.2.1.2	Neurotoxicidad.....	31
4.2.1.3	Tasa de eclosión .....	32
4.2.1.4	Frecuencia cardíaca.....	32
4.2.1.5	Teratogénesis .....	33
4.2.2	Peces Tg (eGFP:Fli1) .....	34
4.2.2.1	Tasa de eclosión .....	34
4.2.2.2	Frecuencia cardíaca.....	34
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>		<b>36</b>
<b>Literatura citada .....</b>		<b>37</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>43</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Diseño cronológico de las pruebas toxicológicas.....	13
2. Efecto del penfluridol sobre la viabilidad celular.....	15
3. Efecto del NNC 55-0396 sobre la viabilidad celular .....	16
4. Efecto del penfluridol sobre el nivel de estrés oxidativo en células 4T1. ....	18
5. Efectos de la exposición a los fármacos sobre el estrés oxidativo.....	19
6. Supervivencia entre los peces de los distintos tratamientos con penfluridol. ....	20
7. Prueba de movimiento espontáneo de la cola. ....	21
8. El penfluridol retrasó la eclosión de peces Wild Type. ....	22
9. Frecuencia cardíaca de las larvas de pez cebra Wild Type expuestas a penfluridol.....	22
10. Malformaciones en larvas de pez cebra expuestos a penfluridol durante etapas tempranas del desarrollo. ....	23
11. Cambios en la tasa de eclosión en embriones de la línea Tg(eGFP:Fli1) por exposición a penfluridol y NNC 55-0396.....	24
12. Frecuencia cardíaca en peces de la línea Tg(eGFP:Fli1) expuestos a penfluridol y NNC 55-0396.. .....	25
13. Efecto del penfluridol sobre el nivel de estrés oxidativo en células MDA-MB-231.....	43

## Capítulo 1. Introducción

---

El cáncer es un grupo de patologías causadas por la desregulación de los mecanismos fisiológicos que controlan el crecimiento, la proliferación y la muerte en las células normales (Lodish et al., 2013). En 2020, el cáncer tuvo una incidencia global de más de 18 millones de nuevos casos y causó 10 millones de decesos, es decir, aproximadamente una de cada seis muertes en el mundo (WHO, 2022). Actualmente esta patología es la segunda causa de muerte a nivel global, y según diversos reportes, para el año 2040 el cáncer tendrá una incidencia de 29.5 millones y una mortalidad de 16.4 millones (Bray et al., 2014; WHO, 2022).

Las células cancerígenas tienen la capacidad de diseminarse fuera de su tejido de origen a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, para invadir otros tejidos y formar tumores secundarios. A este proceso se le conoce como metástasis, y es responsable de alrededor del 90% de las muertes por cáncer (Chaffer y Weinberg, 2011). Las terapias convencionales como cirugía, quimioterapia y radioterapia tienen una baja eficacia para el tratamiento de cáncer metastásico (Schroeder et al., 2011), por lo que existe urgencia por el desarrollo de terapias para la prevención y/o el tratamiento de la metástasis.

El proceso metastásico consta de eventos secuenciales interrelacionados conocidos como cascada metastásica, donde el primer evento es la formación de nuevos vasos sanguíneos, a lo que se le conoce como angiogénesis. El desarrollo de vasculatura en el tumor, además de garantizar la llegada de nutrientes para el crecimiento tumoral, provee a las células cancerígenas una vía de entrada a la circulación para iniciar su diseminación a otros órganos (Bielenberg y Zetter, 2015). Todos los procesos asociados al desarrollo del cáncer, como la angiogénesis, existen en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, en el cáncer estos procesos se dan de manera desregulada.

Muchas terapias anticancerígenas se basan en aprovechar estos procesos que se encuentran desregulados durante el cáncer. Por ejemplo, las células tumorales típicamente presentan una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS, por el acrónimo en inglés de reactive oxygen species), por lo que diversos agentes terapéuticos presentes en la quimioterapia inducen un aumento del estrés oxidativo en las células cancerosas. Esto potencialmente puede provocar que el aumento en el estrés oxidativo sea insostenible por la célula cancerígena, lo que conduce a la activación de la apoptosis a través de la vía mitocondrial (Schumacker, 2006). Sin embargo, la inducción sistémica de estrés oxidativo puede traer efectos adversos considerables; asimismo, cada inductor de estrés oxidativo lo inducirá en medidas

distintas. Por ello, cada fármaco propuesto como agente anticancerígeno con base a su capacidad para inducir estrés debe estudiarse a detalle, con énfasis en su perfil toxicológico para comprobar su seguridad para uso humano.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Cáncer de mama y cáncer de mama triple negativo**

El cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial en mujeres (Bray et al., 2018). En 2018 se presentaron alrededor de 2.1 millones de nuevos casos de CM y 626,679 muertes (Bray et al., 2018). En México, en 2014 el CM fue el cáncer con mayor incidencia con 28.75 nuevos casos por cada 100,000 mujeres de 20 años o más (S. de Salud, 2015). Debido a que estos números siguen en aumento, existe una urgencia por el desarrollo de tratamientos efectivos para tratar el CM.

Las células del CM tienen una alta capacidad invasiva, producto de alteraciones en la expresión de genes asociados a la metástasis (Medina et al., 2020). Ejemplo de ello es el decremento en la expresión de E-cadherina, que se asocia a la pérdida de adhesión célula-célula durante la transición epitelio-mesénquima (TEM) (Guo et al., 2020), un paso clave en el inicio de la metástasis. Asimismo, una sobreexpresión de la proteína Twist1 se ha asociado a una inhibición de la expresión de E-cadherina en el CM (Drasin et al., 2011). Se estima que del 70 al 80% de los casos de CM son curables en etapas tempranas, cuando aún no existe metástasis. Sin embargo, el CM metastásico se considera incurable bajo las terapias actuales.

El CM puede clasificarse en diferentes subtipos con base en las características moleculares de las células tumorales (Harbeck et al., 2019). El nivel de expresión de los receptores hormonales ER (receptor de estrógeno), PR (receptor de progesterona) y HER2 (factor de crecimiento epidérmico humano 2) es un medio ampliamente utilizado para diferenciar cada subtipo. Estos receptores suelen utilizarse como blanco para terapias dirigidas como la inmunoterapia. De este modo, cada subtipo puede diferenciarse por su abundancia de receptores hormonales y tratarse con base a ello. Sin embargo, en el subtipo conocido como cáncer de mama triple negativo (CMTN) los 3 receptores están ausentes, lo que imposibilita la aplicación de terapias dirigidas y dificulta en gran medida su detección y tratamiento.

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es uno de los subtipos de CM de mayor incidencia y mortalidad, que afecta en mayor medida a mujeres africanas, Afroamericanas y Latinoamericanas menores a 50 años (Harbeck et al., 2019; Jamdade et al., 2015). En México, del 15 al 23% de los diagnósticos de cáncer corresponden a CMTN (Hernández-Álvarez et al., 2017). Debido a la ausencia de marcadores moleculares para su detección, los pacientes con CMTN suelen mostrar etapas avanzadas desde el diagnóstico, lo que aumenta la probabilidad de metástasis y complica el tratamiento (Lara-Medina et al., 2011).

Por lo anterior, los tratamientos convencionales como quimioterapia, cirugía y radioterapia siguen siendo los más utilizados para el tratamiento del CMTN, aunque se sabe que estas terapias tienen severas limitaciones asociadas a su baja especificidad (Li et al., 2022). Esto conduce a una necesidad urgente por el desarrollo de tratamientos eficaces y de mayor especificidad contra este subtipo de CM.

### **1.1.2 El reposicionamiento de fármacos y el estrés del retículo endoplásmico**

El proceso tradicional de descubrimiento de nuevos fármacos (*de novo*) conlleva periodos largos de tiempo, costos elevados y una baja probabilidad de éxito (Pushpakom et al., 2018). Hasta hoy, menos del 10% de los fármacos nuevos llegan al mercado (Kobayashi et al., 2019), y el proceso de aprobación toma entre 13 y 17 años (Yella et al., 2018). Por ello, la industria farmacéutica tiene como prioridad el mejorar su productividad en investigación y desarrollo de fármacos (Li et al., 2016).

El reposicionamiento de fármacos (RF) es una estrategia farmacéutica que consiste en la identificación y el desarrollo de nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos previamente estudiados, ya sea que se encuentren aprobados, en estudios clínicos/preclínicos, desaprobados o discontinuados (Pushpakom et al., 2018; Yella et al., 2018; Ashburn y Thor, 2004). En esta estrategia pueden tomarse los datos de estudios previos realizados con el fármaco de interés, por lo que la necesidad de nuevos estudios de seguridad y eficacia se reduce, lo que aumenta la tasa de medicamentos aprobados (30%) y disminuye el tiempo de aprobación (6.5 años) (Beachy et al., 2014; Nosengo et al., 2016).

En oncología, se han logrado desarrollar terapias para distintos tipos de cáncer a partir del RF. Ejemplo de ello son la talidomida (auxiliar contra náuseas matutinas), la gemcitabina (antiviral) y el trióxido de arsénico (tratamiento contra la sífilis), que fuera de su uso original hoy se encuentran aprobados como medios de terapia para el mieloma múltiple, el cáncer de mama y la leucemia, respectivamente (Wurth et al., 2016; Yella et al., 2018). En 2017, a través de un análisis de firmas transcripcionales se identificaron 4

compuestos con probabilidad de tener efectos anticancerígenos: penfluridol, NVP-TAE684, NNC 55-0396 y NSC 632839. Su capacidad anticancerígena se hipotetizó luego de que los ensayos *in silico* revelaran que estos fármacos son capaces de promover la expresión de genes asociados al estrés del retículo endoplásmico (ERE) (Ávalos-Rodríguez, 2017).

El ERE se refiere a la acumulación de proteínas mal plegadas en dicho organelo, que conduce a la activación de una serie de vías de señalización conocidas como respuesta a proteínas desplegadas (RPD) para reestablecer la capacidad de plegamiento del retículo endoplásmico (RE) (Wang et al., 2014). Interesantemente, tanto el ERE como la RPD se han asociado al desarrollo de diversos tipos de cáncer (Clarke et al., 2014; Wang y Kauffman, 2016). Las células cancerígenas pueden activar la RPD como estrategia de supervivencia; sin embargo, cuando el ERE es severo e irreversible, la RPD induce a la muerte celular (Wang et al., 2014; Zhou et al., 2019). Por ello, los fármacos con capacidad para inducir ERE se han postulado como nuevos medios terapéuticos contra el cáncer; ejemplo de ello es lo visto en 2019, donde se evidenció que la ilamicina E promueve la apoptosis en células de CMTN *In vitro* a través de la vía mitocondrial, como resultado de un aumento en el ERE (Zhou et al., 2019).

Por esto, los fármacos señalados por Ávalos-Rodríguez (2017) como inductores de ERE fueron propuestos para su uso como agentes terapéuticos contra el CMTN. En 2020, estos fármacos fueron probados en ensayos *In vitro* con células de CMTN, lo que reveló que todos ellos reducen la viabilidad celular y la sobrevivencia de las células cancerígenas (Corral, 2020). Además, el penfluridol se mostró como un inductor de la apoptosis, y el fármaco NNC 55-0396 como inhibidor de la migración celular (Corral, 2020). Asimismo, se comprobó que los 4 fármacos inducen cambios en la expresión de genes clave para la RPD, lo que sugiere que su potencial anticancerígeno sí está asociado a su capacidad para inducir ERE. Aunque estos resultados son alentadores, el proceso de reposicionamiento de estos fármacos para su uso contra el CMTN requerirá de más estudios que den mayor conocimiento de los mecanismos a través de los cuales ejercen su efecto, esto para reconocer posibles efectos secundarios.

### **1.1.3 El estrés oxidativo en el cáncer**

El estrés oxidativo se refiere al desbalance entre la capacidad antioxidante de célula y la presencia de agentes oxidantes, que se traduce en una presencia elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tang et al., 2018). El aumento de ROS intracelulares está asociado al desarrollo de cáncer, debido a que las ROS inducen daños en el ADN que al acumularse pueden producir mutagénesis (Prasad et al., 2017). Asimismo,

las ROS promueven la expresión de factores pro angiogénicos como el factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), por lo que, en un tejido tumoral los altos niveles de estrés oxidante conducen a una angiogénesis descontrolada (Kim y Byzova, 2014), lo que representa un evento clave en el establecimiento del cáncer metastásico.

Paradójicamente, un nivel excesivo de ROS está asociado a supresión tumoral. Esto significa que las células cancerígenas pueden ser eliminadas por el mismo mecanismo que facilita su desarrollo cuando dicho mecanismo es inducido en la medida correcta (Gupta et al., 2007). La mayoría de los agentes utilizados en la quimioterapia y radioterapia eliminan a las células cancerígenas a través de una inducción de estrés oxidante (Gupta et al., 2007). El problema principal de estas terapias es la toxicidad sistémica que causan, producto de su baja especificidad (Padma, 2015). Dado que el estrés oxidante puede inducirse a través de distintas vías, es importante estudiar a fondo para saber cuál sería la estrategia más efectiva para explotar esta vía terapéutica con una mayor especificidad (Schumacker, 2006) para reducir sus efectos sistémicos.

Como se mencionó anteriormente, la inducción de ERE se ha postulado como una vía aprovechable para inducir la muerte de células cancerígenas. El ERE y el estrés oxidativo están asociados en un bucle de retroalimentación positiva. Esto debido a que el ERE involucra una desregulación entre la formación y el rompimiento de enlaces disulfuro; un proceso mediado por las ROS en el RE. A su vez, esta desregulación conduce a la acumulación de ROS tanto en el RE como en la mitocondria, lo que promueve la apoptosis a través de la vía intrínseca (Malhorta y Kaufman, 2007; Cao y Kauffman, 2014).

Por ello, podemos hipotetizar que los fármacos inductores de ERE podrían tener su efecto anti cancerígeno gracias a su potencial para promover estrés oxidante en una medida favorable en las células tumorales. Esto incluye a los fármacos en proceso de reposicionamiento propuestos por Ávalos Rodríguez (2017), a falta de estudios que evalúen cambios en los niveles de ROS en las células cancerígenas al tratarlas con dichos fármacos. Asimismo, será clave la validación de sus efectos en modelos *In vivo* para evaluar su eficacia contra el CMTN en un organismo funcional, buscando avanzar en su reposicionamiento.

#### **1.1.4 El pez cebra como modelo animal para el estudio del cáncer**

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo animal que provee numerosas y conocidas ventajas para estudios de diversas áreas biológicas, entre las que destacan su bajo requerimiento de inversión, de espacio y de tiempo de crianza. Este organismo comparte un 76-82% de los genes asociados a enfermedades en

humanos (Kozol et al., 2016), y tiene un alto grado de conservación de blancos terapéuticos comunes y en el metabolismo de drogas con respecto al humano (McRae y Peterson, 2015). No obstante, el uso del pez cebra en el estudio del cáncer conlleva dificultades considerables, entre las que resaltan la diferencia entre las temperaturas de incubación del pez (28°C) y de las células cancerígenas (37°C), y el rechazo hacia las células humanas por parte del sistema inmune adaptativo (SIA) del pez (Cabezas et al., 2020). A pesar de esto, diversos estudios han logrado utilizarlo con éxito bajo distintos protocolos (Cabezas et al., 2020).

Entre los protocolos más utilizados, existe una marcada tendencia por el uso de embriones y/o larvas de pez cebra; esto debido a que el pez carece de SIA hasta aproximadamente los 14 días post fertilización (dpf). Asimismo, el problema de la temperatura ha logrado mitigarse usando temperaturas intermedias - pero más cercanas a los 37°C- entre los 28 y los 37°C; sin embargo, dado que tanto el pez como las células cancerosas se encontrarán bajo estrés por no estar en sus temperaturas de incubación óptimas, los protocolos en este modelo no pueden ser prolongados. Esto, aunado al eventual rechazo del xenoinjerto por parte del SIA del pez, hace que los ensayos en este modelo se extiendan (en su mayoría) hasta no más de los 10 dpf (Cabezas et al., 2020).

Dadas estas limitantes, en las últimas décadas se han desarrollado líneas transgénicas de pez cebra para mejorar sus características como modelo animal para el estudio del cáncer. Ejemplo de ello son las líneas transgénicas con inmunosupresión inducida, donde se evita el rechazo de los xenoinjertos aún en peces adultos. Asimismo, la línea Tg(Fli1:eGFP) es una línea de peces genéticamente modificados donde las células endoteliales del tejido vascular expresan la proteína verde fluorescente (GFP) (Lawson y Weinstein, 2002), lo que facilita el monitoreo de la angiogénesis, la invasión y la metástasis en estos modelos (Cabezas et al., 2020).

## **1.2 Justificación**

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una patología de incidencia alta en la población latinoamericana y a nivel global, y los tratamientos actuales no han logrado reducir los diagnósticos ni la mortalidad. Debido a su alta capacidad metastásica y a su ausencia de blancos terapéuticos típicos del cáncer de mama, su tratamiento es sumamente complicado. Por ello, la búsqueda de nuevos medios para tratar el CMTN es un tema de urgencia en el sector salud.



Recientemente ha ganado interés el uso de fármacos inductores de estrés del retículo endoplásmico como terapias contra el cáncer. Se hipotetiza que estos fármacos podrían tener sus efectos anti cancerígenos debido a su potencial para inducir estrés oxidante en las células tumorales y provocar su muerte. El reposicionamiento de fármacos es un medio efectivo para desarrollar nuevas terapias a partir de fármacos conocidos. Al tratar con sustancias estudiadas, este método reduce el riesgo al fracaso, el tiempo de aprobación y los costos de desarrollo de un fármaco comparado con el método convencional.

Por su parte, el pez cebra (*Danio rerio*) ofrece múltiples ventajas en estudios farmacológicos, que abarcan la reducción de costos y del tiempo de estudio. El uso de este organismo en oncología se ha hecho posible mediante la estandarización de distintos modelos. En este proyecto se pretende estandarizar el uso de larvas y adultos de pez cebra, en busca de aprovechar sus ventajas para optimizar el proceso de reposicionamiento de fármacos previamente propuestos como candidatos terapéuticos contra el CMTN. Esto ayudará a establecer una plataforma que potencialmente servirá para el desarrollo rápido y económico de nuevas terapias contra el CMTN, y contra otros tipos de cáncer en el futuro.

### **1.3 Hipótesis**

Los fármacos NNC 55-0396 y penfluridol ejercen efectos anticancerígenos vía inducción de estrés oxidante sobre células de CMTN *in vitro* e *in vivo*.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar el potencial anticancerígeno de los fármacos NNC 55-0396 y penfluridol asociado a su capacidad para inducir estrés oxidativo en células de CMTN en cultivo celular y en modelos de pez cebra (*Danio rerio*).

### **1.4.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar efectos anticancerígenos del penfluridol y de NNC 55-0396 y su capacidad para inducir estrés oxidativo en células de CMTN In vitro
2. Medir el potencial pro-oxidante de los fármacos en larvas de pez cebra inoculados con xenoinjertos de CMTN, y su impacto sobre la supervivencia y proliferación tumoral.
3. Analizar la influencia de los cambios en los niveles de ROS sobre la angiogénesis en larvas de peces de la línea Tg(fli:eGFP) inoculadas con células de CMTN.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Compuestos farmacológicos

Los fármacos penfluridol y NNC 55-0396 fueron utilizados como agentes anticancerígenos, con base en los resultados de Ávalos-Rodríguez (2017) y Corral (2020). El NNC 55-0396 se adquirió de Cayman Chemical, mientras que el penfluridol se adquirió de la compañía Merk (Sigma-Aldrich). Los compuestos fueron anteriormente solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO), alicuotados y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; a partir de estas alícuotas se realizaron los ensayos *In vitro* e *In vivo*.

### 2.2 Líneas celulares

Para los ensayos realizados en este trabajo se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 (CMTN de humano), 4T1 (CMTN de ratón) y células 293T de riñón embrionario (células humanas no cancerígenas). Las células MDA-MB-231 y 293T fueron cultivadas en medio DMEM; por su parte, la línea 4T1, se cultivó en medio RPMI. Ambos medios fueron enriquecidos con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. Las tres líneas celulares se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  en una incubadora humidificada.

### 2.3 Ensayos in vitro

#### 2.3.1 Evaluación de viabilidad celular

Para evaluar los efectos de nuestros fármacos sobre la viabilidad celular se realizaron ensayos colorimétricos MTT. Este ensayo se basa en la reducción del compuesto MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán; un producto insoluble de color azulado con absorbancia máxima de  $\sim 570\text{nm}$  (Riss et al., 2016). Esto permite reconocer la viabilidad celular con base en la actividad metabólica de las células en un cultivo, calculada por su concentración de formazán. En nuestro caso, se utilizó la  $\text{IC}_{50}$  como el valor cuantitativo para determinar la toxicidad de los fármacos sobre

células vivas. La  $IC_{50}$  se refiere a la concentración en la que el fármaco es capaz de inhibir la viabilidad del 50% de las células en un cultivo; por ello, en el contexto de este estudio la  $IC_{50}$  es un indicador de la sensibilidad de las células tratadas hacia el fármaco en cuestión. El reactivo MTT se consiguió de Sigma Aldrich (No. Cat. M2128).

Los ensayos iniciaron con el sembrado de células en placas de 96 pozos (0.32 cm<sup>2</sup>) a densidades celulares de 6x10<sup>3</sup> (MDA-MB-231), 4x10<sup>3</sup> (4T1) y 10x10<sup>3</sup> (293T), que fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Al transcurrirse el tiempo de incubación se removió el medio de cultivo y se agregó medio fresco con fármaco a distintas concentraciones (0, 2.5, 5, 10 y 20  $\mu$ M) en muestras por cuadruplicado para dejar la placa nuevamente en incubación por 24 horas. Luego de esto, se añadieron 20  $\mu$ L de solución de MTT (5 mg/mL en PBS 1X) y se dejó incubar durante 5 horas, para posteriormente solubilizar el formazán mediante la adición de 100  $\mu$ L de buffer de lisis (0.01M HCl en SDS al 10%) y dejar incubar durante 20 horas. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 570nm a través de un espectofotómetro Epoch para microplacas.

### **2.3.2 Estrés oxidativo**

Los niveles de estrés oxidativo en los cultivos se midieron con el uso del reactivo CellROX<sup>®</sup> Deep Red de Thermo Fisher Scientific (No. de cat. C10422). Este reactivo evalúa la abundancia de ROS intracelular con el uso de sondas cuyo umbral de excitación/emisión es de 644/665 nm. Al oxidarse por el contacto con ROS, las sondas emiten fluorescencia de un color rojo intenso cuantificable a través de distintos métodos como la microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

Los ensayos iniciaron con el sembrado de las células MDA-MB-231, 4T1 y 293T en placas de 48 pozos (0.88 cm<sup>2</sup>), a densidades celulares de 16.5x10<sup>3</sup>, 11x10<sup>3</sup> y 27.5x10<sup>3</sup> células por pozo, respectivamente, para incubarse por 24 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente iniciaron los tratamientos farmacológicos al remover el medio de cultivo para agregar medio nuevo con fármaco a las concentraciones correspondientes (0, 5, 10, 15 y 20  $\mu$ M), donde cada tratamiento se realizó por triplicado. El tratamiento se mantuvo por 24 horas bajo las mismas condiciones de la incubación anterior. Terminada la incubación, se removió el medio con fármaco para agregar nuevo medio con CellRox disuelto a una concentración de 3  $\mu$ M para 4T1 y 293T, y 5  $\mu$ M para MDA-MB-231.

Las células con CellRox se dejaron incubar durante 30 minutos (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) para posteriormente remover el medio y enjuagar cada pozo con PBS 1X de 2 a 3 veces. Luego de esto las células fueron

observadas bajo un microscopio de fluorescencia LifeTechnologies® para capturar imágenes que constataran cualitativamente el nivel de emisión de luz roja en las muestras. Finalmente, las muestras en los pozos fueron removidas utilizando 80 uL de tripsina; para parar la acción de la tripsina se añadieron 250 uL de medio de cultivo. El contenido de cada pozo se homogenizó y se transfirió a tubos de 1.5 mL para centrifugarse a 800 x g durante 7 minutos (4°C) para precipitar las células y resuspenderlas en 600 uL de PBS 1X. Estas muestras fueron analizadas por citometría de flujo para cuantificar la fluorescencia roja emitida por las células; dichos datos se expresaron en histogramas (Figura 4.B) y gráficas de dispersión (Figura 4.C). Asimismo, la citometría también permitió calcular el número de células presentes en cada muestra (Figura 4.D).

## **2.4 Ensayos en modelos de pez cebra**

### **2.4.1 Montaje del sistema y condiciones de crianza y reproducción**

Para desarrollar nuestro sistema de crianza para peces cebra se tomó como base un estante diseñado para la crianza de lapas, que fue donado por las Dras. Fabiola Lafarga y Carmen Paniagua Chávez (CICESE). A este sistema, se le hicieron las modificaciones necesarias de plomería para convertirse en un sistema cerrado donde el agua de las peceras sale para pasar a través de un biofiltro con bacterias fijadoras de nitrógeno, que ayudarán a amortiguar los cambios bruscos de pH por acumulación de amonio, nitritos y nitratos en el agua. Una vez filtrada, el agua es reintroducida a las peceras por una bomba magnética con capacidad de bombeo de 10 L/min. Asimismo, al sistema fueron añadidas tuberías de oxigenación para surtir el agua de las peceras con O<sub>2</sub>.

Los parámetros fisicoquímicos del agua se midieron a diario para mantener condiciones óptimas de crianza, que incluyen una temperatura de 28°C, pH a 7.4, y oxigenación por encima de los 6 mg/L (Yan et al., 2020). Para nuestros estudios fueron utilizados dos tipos de peces cebra; wild type (WT) y Tg(fli1:eGFP) (abreviado como Fli1). Los peces WT fueron conseguidos de un proveedor local, mientras que los peces Fli1 fueron utilizados durante una estancia académica en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en el laboratorio del Dr. Fernando López Casillas.

La alimentación se realizó dos veces al día con hojuela Tetra®, dejando el alimento por no más de 10 minutos para su posterior retiro por sifoneo. Asimismo, se realizó una limpieza general del sistema cada

10 días para evitar acumulación de sarro en las peceras. El monitoreo de las condiciones del sistema fue riguroso, ya que la desestabilización de cualquier parámetro del agua puede impactar negativamente en la fertilidad de los peces (Nadiaska and Clark, 2012).

Las cruces se realizaron fuera del sistema de crianza, en peceras de vidrio con capacidad de 10L, adaptadas con canicas en el fondo de la pecera y ambientadas con plantas artificiales. Las canicas ayudan a que los huevos recién fertilizados caigan en una superficie inalcanzable para los peces para evitar su depredación, mientras que las plantas estimulan el comportamiento sexual de los peces al otorgar sitios de protección y reducir su estrés (Nasiadka and Clark, 2012). Los embriones obtenidos en cada reproducción fueron incubados a 28°C en cajas Petri (n=50-150) con medio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0.17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.33 mM y MgSO<sub>2</sub> en agua destilada estéril), y se conservaron hasta su uso.

#### **2.4.2 Pruebas de toxicidad de los fármacos en embriones y larvas de pez cebra**

Con el fin de encontrar concentraciones sin efectos secundarios observables para nuestros fármacos, se realizaron una serie de pruebas toxicológicas sobre parámetros fisiológicos clave en el pez cebra. Dichas pruebas se diseñaron a partir de los lineamientos establecidos por la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) en la prueba número 236 para la determinación de toxicidad aguda en embriones de pez (OECD, 2013).

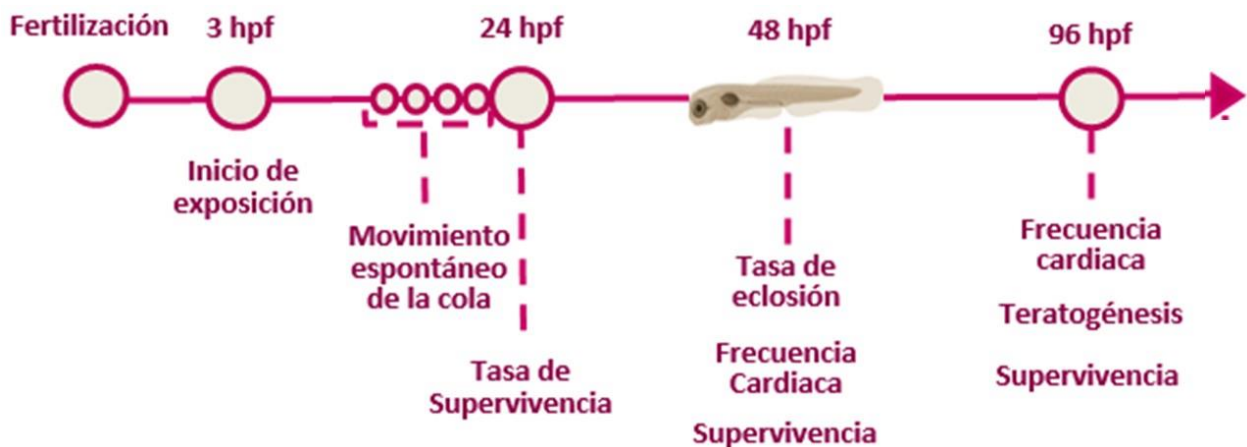
Los embriones de pez cebra (120 por tratamiento para peces WT, y 30 por tratamiento para peces Tg(fli1:eGFP)) fueron expuestos a los fármacos desde las 3 hpf hasta las 96 hpf. Cada tratamiento correspondió a una dosis distinta de fármaco disuelto en el medio E3 donde los embriones fueron incubados. Dichas concentraciones se situaron entre 1.25 y 20  $\mu$ M, y se incluyó un tratamiento donde el medio E3 sólo contenía el vehículo donde los fármacos fueron solubilizados (DMSO al 0.2%), a manera de control negativo. Para cada fármaco, se midió su influencia sobre la sobrevivencia de los embriones y sobre su tasa de eclosión en distintos estadios del desarrollo, así como su capacidad para inducir malformaciones y efectos cardiotoxicos y neurotóxicos.

Para medir los efectos cardiotoxicos, se cuantificó el número de latidos durante 20 segundos en los peces, para obtener y comparar las frecuencias cardiacas (latidos por minuto) promedio en cada tratamiento. Los latidos por minuto fueron registrados aproximadamente a las 100 hpf, es decir, 4 horas luego del fin de la exposición a los fármacos (96 hpf). Esto debido a que el ritmo cardiaco en el pez cebra alcanza su

estabilidad desde las 96 hpf; realizar el análisis en etapas anteriores del desarrollo podría mostrar alteraciones debido a un ritmo cardiaco inestable (Cornet et al., 2017).

Para determinar si existieron efectos tóxicos sobre el sistema nervioso se realizó la prueba de movimiento espontáneo de la cola, la cual se basa en cuantificar el número de coleteos por minuto realizados por cada embrión en diferentes puntos de su desarrollo. Los coleteos son observables a partir de las 17 hpf, con un pico de actividad a las 19 hpf y posterior descenso luego de las 26 hpf (Saint – Amant & Drapeau, 1998), y significan la primera evidencia de desarrollo y actividad neuronal en embriones de pez cebra. Por ello, la frecuencia de coleteos puede ser un buen indicador de alteraciones en la función y el desarrollo del sistema nervioso (Ogungbemi et al, 2020).

La tasa de eclosión fue medida cada 24 horas a partir del tiempo normal de eclosión en el pez cebra (48 hpf) y hasta las 96 hpf, con el fin de reconocer si los fármacos pueden provocar retrasos en el desarrollo embrionario. Para esto se realizó un conteo de los embriones eclosionados en cada grupo experimental con respecto a su total. Finalmente, la sobrevivencia y el registro de malformaciones (teratogénesis) fueron evaluados al finalizar la exposición a los fármacos; a las 96 hpf (Figura 1).



**Figura 1. Diseño cronológico de las pruebas toxicológicas.** Los peces utilizados para las pruebas de movimiento espontáneo no fueron incluidos en los ensayos posteriores, debido a la interrupción de su fotoperíodo, producto de las pruebas neurotoxicológicas.

En cuanto a la teratogénesis, las aberraciones fenotípicas cuantificadas fueron edema pericardiaco (EPC), edema del saco vitelino (ESV) y escoliosis. El EPC se refiere a la acumulación de fluidos en el pericardio, y es una alteración fenotípica asociada a aberraciones cardíacas con consecuentes alteraciones en el flujo sanguíneo (Hallare et al, 2005). El ESV es resultado de fallos en la regulación osmótica del pez,

comúnmente como consecuencia de disfunción renal (Sant & Timme-Laragy, 2018), lo que resulta en un flujo anormal de nutrientes en los embriones (Raldúa et al, 2008). La escoliosis es una malformación de la espina dorsal donde esta se presenta encorvada, y que comúnmente se asocia a aberraciones en la formación de músculo esquelético y del sistema nervioso central (Muñoz-Montecinos et al, 2022).

## **2.5 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de todos los ensayos fueron analizados estadísticamente y graficados en el software GraphPad Prism 5<sup>®</sup>. Dependiendo del tipo de prueba, se realizaron ANOVAs de una vía, de dos vías, o estimaciones de Kaplan-Meier (sobrevivencia) con la prueba post-hoc correspondiente para determinar si existieron diferencias significativas entre los datos vistos entre cada grupo experimental. Las pruebas correspondientes a cada ensayo realizado se especifican en los pies de figura.

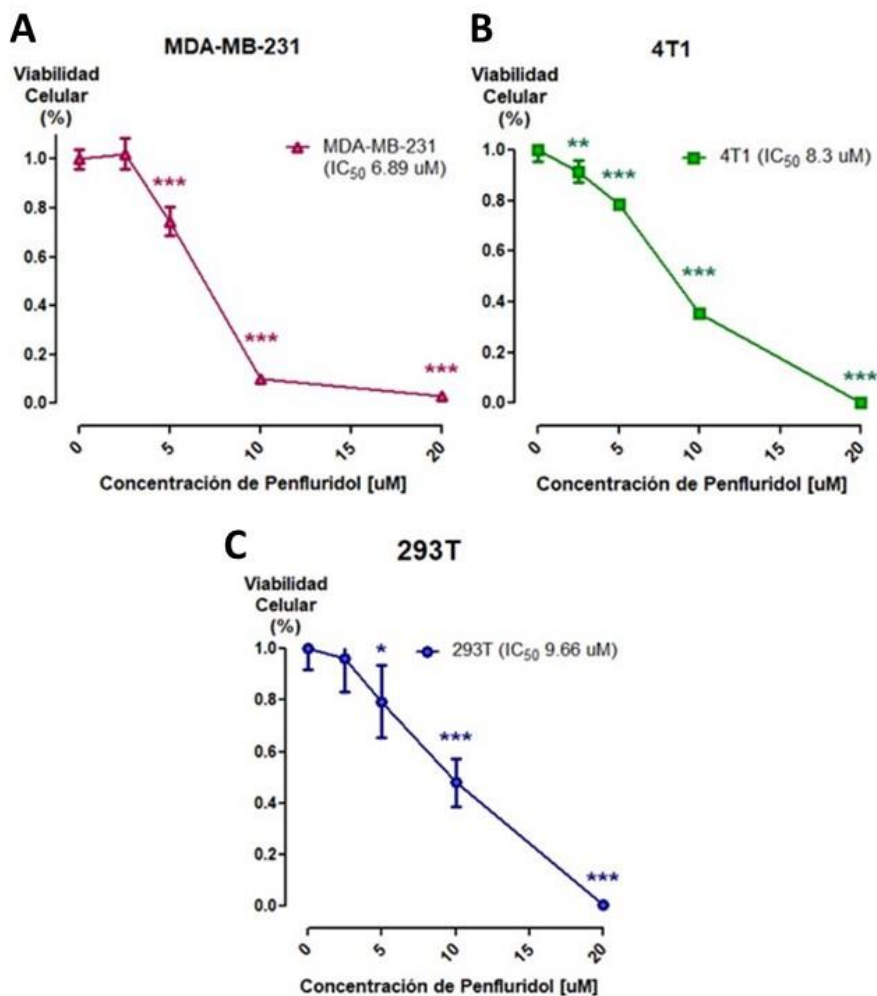


## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Ensayos *in vitro*

#### 3.1.1 Citotoxicidad

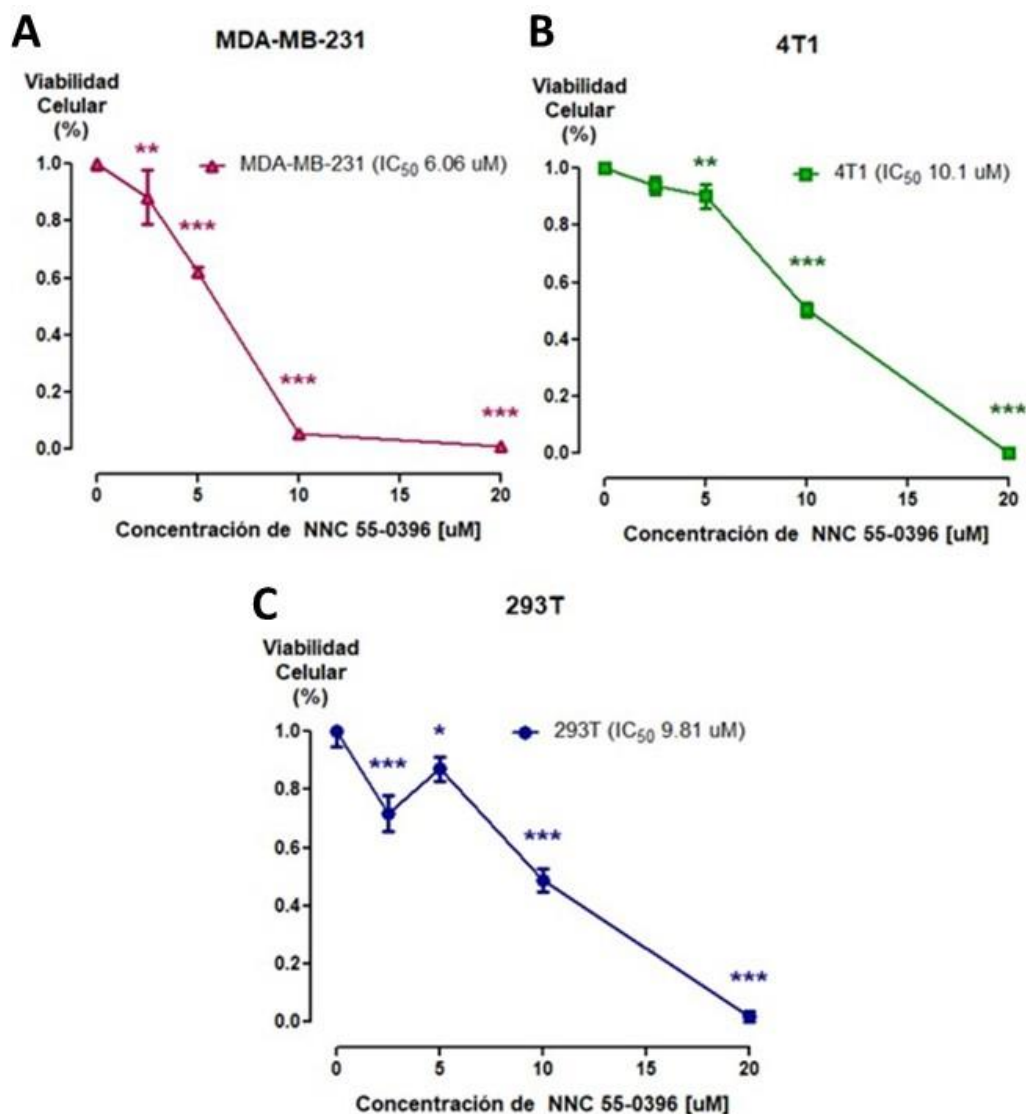
Para evaluar y corroborar el efecto de los fármacos en la proliferación de diversas células. Se realizaron ensayos MTT para medir la viabilidad de las células MDA-MB-231, 4T1 y 293T al exponerse a distintas concentraciones a penfluridol y NNC 55-0396.



**Figura 2. Efecto del penfluridol sobre la viabilidad celular.** Cambios en el nivel de viabilidad en células MDA-MB-231 (A), 4T1 (B) y 293T (C). Porcentajes obtenidos a partir de las absorbancias de las muestras obtenidas en los ensayos MTT, normalizadas con respecto a su grupo control. Las barras de error representan la desviación estándar. ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ .

Los resultados mostraron que ambos fármacos son supresores de la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración en las 3 líneas celulares, variando moderadamente en la  $IC_{50}$  alcanzada para cada línea celular.

Para el penfluridol, la  $IC_{50}$  se situó en 6.89, 8.3 y 9.66  $\mu M$  para las líneas MDA-MB-231, 4T1 y 293T, respectivamente. En el caso de las líneas MDA-MB-231 y 293T hubo un decremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en la viabilidad celular a partir de los 5  $\mu M$  de penfluridol, mientras que en la línea 4T1 dicho decremento estuvo presente desde la concentración más baja del fármaco (2.5  $\mu M$ ) (Figura 2).



**Figura 3. Efecto del NNC 55-0396 sobre la viabilidad celular.** Cambios en el nivel de viabilidad en células MDA-MB-231 (A), 4T1 (B) y 293T (C). Porcentaje de viabilidad obtenido a partir de las absorbancias de las muestras obtenidas en los ensayos MTT, normalizadas con respecto a su grupo control. ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Las barras de error representan la desviación estándar. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ .

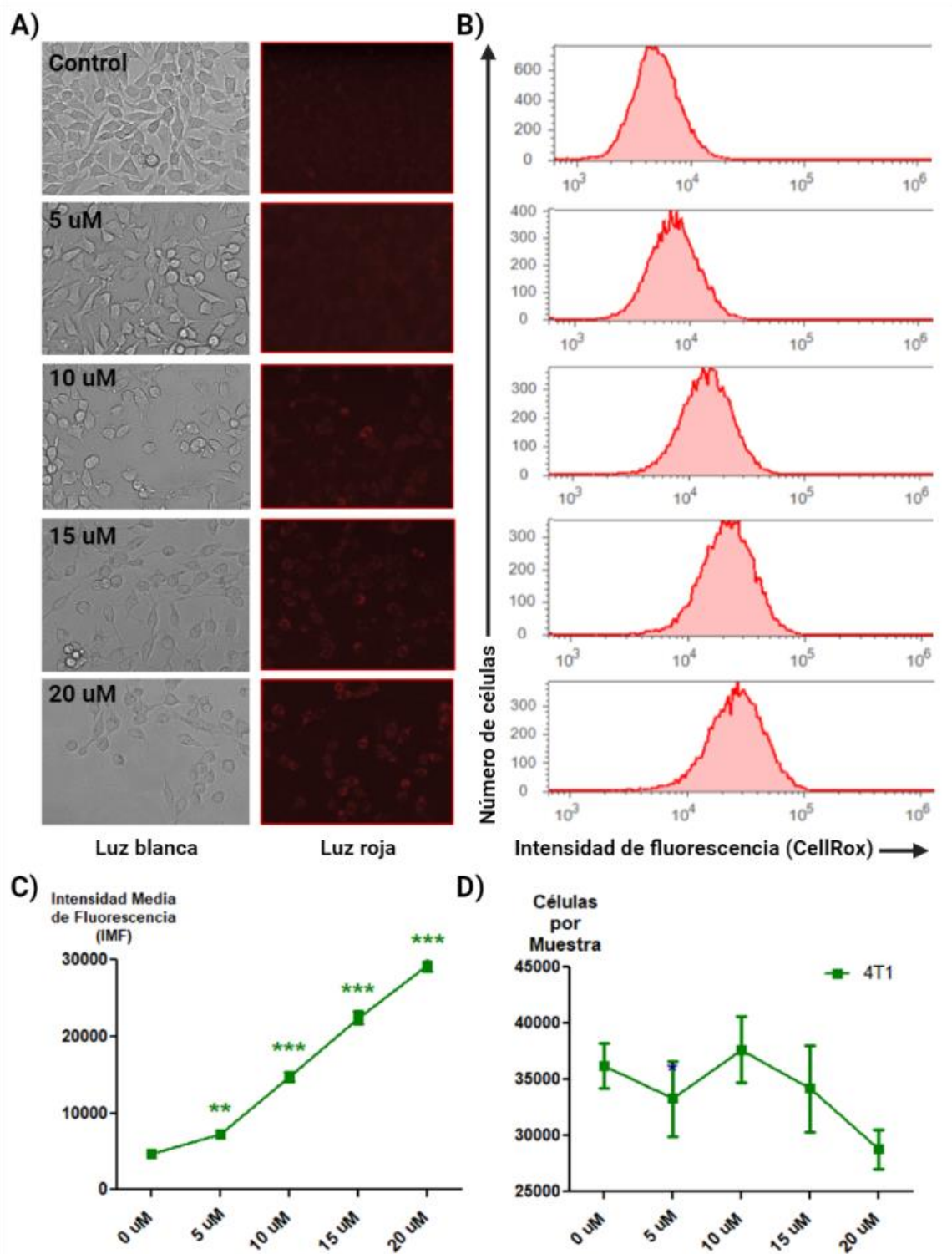
Por su parte, para el fármaco NNC 55-0396 las  $IC_{50}$  fueron de 6.06 (MDA-MB-231), 10.01 (4T1) y 9.81 (293T)  $\mu$ M. Las líneas MDA-MB-231 y 293T mostraron un decremento significativo en todas las concentraciones del fármaco al que fueron expuestas, mientras que en las células 4T1 esta disminución ocurrió a partir de los 5  $\mu$ M de NNC 55-0396 (Figura 3).

### **3.1.2 Inducción de estrés oxidativo por exposición a penfluridol y NNC 55-0396**

Para los ensayos con el reactivo CellRox Deep Red <sup>®</sup> las concentraciones farmacológicas utilizadas fueron elegidas con base en los resultados de los ensayos MTT. Se optó por probar concentraciones que en su mayoría estuvieran por encima de sus  $IC_{50}$  para cada fármaco/línea celular para asegurar que existiera un efecto citotóxico, que potencialmente estaría ligado a estrés oxidativo. Algunos resultados representativos de estos ensayos se muestran en la figura 4. El resto de las imágenes y diagramas se encuentran en la sección de anexos.

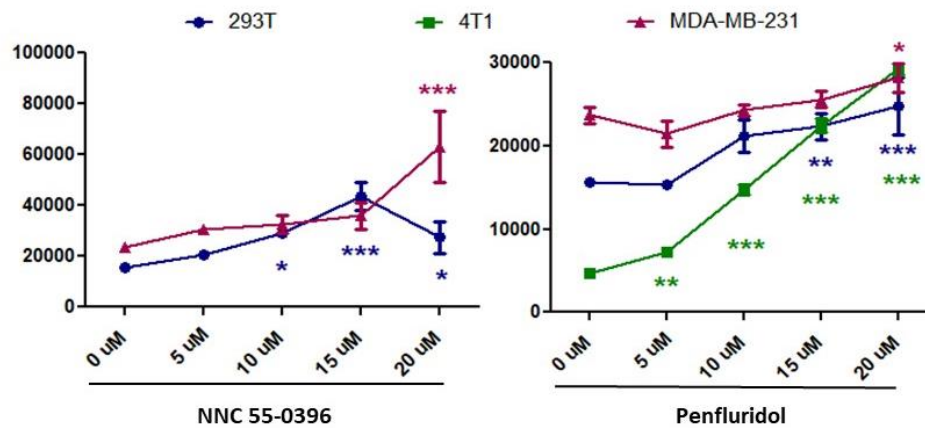
Los resultados dejaron ver la capacidad de ambos fármacos para incrementar el nivel de ROS en las tres líneas celulares analizadas. Ejemplo de ello es lo visto en células 4T1 expuestas a penfluridol, donde las células presentaron un incremento de su emisión de luz roja al verse bajo microscopía (Figura 4.A), mismo que se tradujo en un incremento de su intensidad media de fluorescencia (IMF) de manera dependiente de la concentración (Figura 4.B y C). Por su parte, en este caso la concentración de células por muestra no se vio afectada por la exposición al fármaco (Figura 4.D).

En el resto de los ensayos, la emisión de fluorescencia roja también mostró cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). En el caso de las células MDA-MB-231 hubo un aumento de la IMF al exponerse a ambos fármacos en la concentración más alta (20  $\mu$ M) (Figura 5). Por su parte, las células 293T mostraron un incremento de la IMF a partir de los 10  $\mu$ M para NNC 55-0396, y de los 15  $\mu$ M para el penfluridol. El ensayo de estrés oxidativo con NNC 55-0396 sobre células 4T1 no pudo realizarse por falta de disponibilidad de este fármaco.



**Figura 4. Efecto del penfluridol sobre el nivel de estrés oxidativo en células 4T1.** A) Imágenes obtenidas en microscopía de fluorescencia con luz blanca (izquierda) y roja (derecha) para los distintos tratamientos con penfluridol. B) Histogramas obtenidos en citometría de flujo para representar el nivel de fluorescencia roja de las células en las muestras analizadas. C) Efecto del penfluridol a las concentraciones probadas sobre el estrés oxidativo de las células 4T1. Cada punto representa el promedio de la intensidad de fluorescencia entre las muestras de un mismo tratamiento. D) Efecto del penfluridol sobre la concentración de células por muestra de células 4T1 bajo los distintos tratamientos farmacológicos. ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.001; \*\*\*, p < 0.0001.

### Estrés Oxidativo por Exposición a los Fármacos



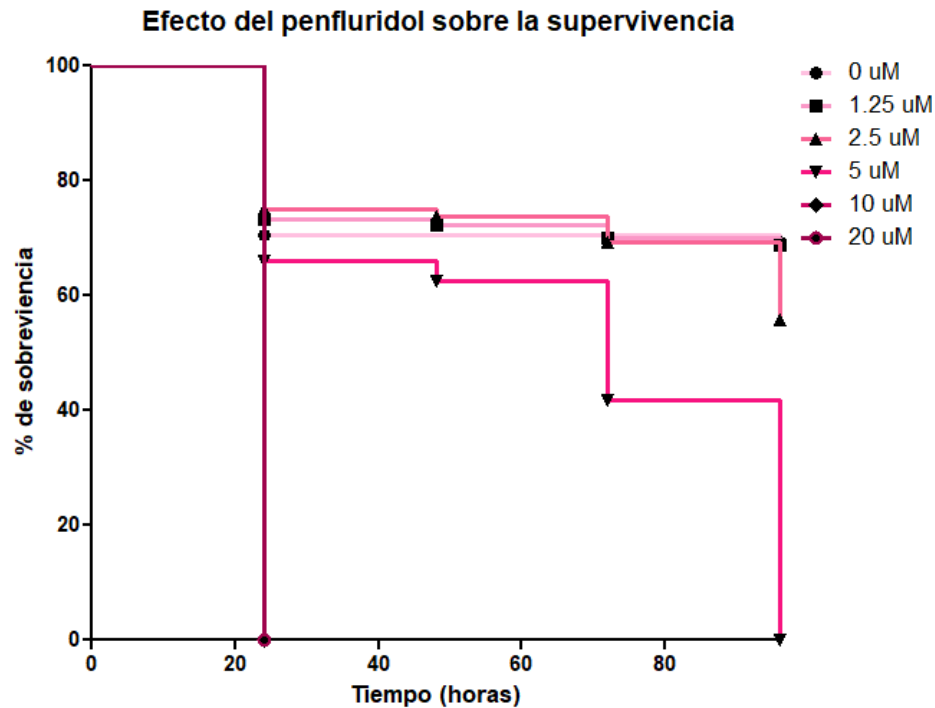
**Figura 5. Efectos de la exposición a los fármacos sobre el estrés oxidativo.** Tras los ensayos de CellRox para medir estrés oxidativo en las tres líneas celulares en presencia de distintas concentraciones de NNC 55-0396 (izquierda) y penfluridol (derecha). ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Las barras de error representan la desviación estándar. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ .

## 3.2 Toxicidad de los fármacos en etapas tempranas del desarrollo en el pez cebra

Para determinar la toxicidad de los fármacos, se realizó el set de pruebas descrito anteriormente en la sección de métodos (Figura 1). Estos ensayos toxicológicos en embriones/larvas de pez cebra estuvieron sujetos principalmente a la disponibilidad de los fármacos candidatos (penfluridol y NNC 55-0396) y la fertilidad de los peces reproductores. De este modo, en el estudio se pudieron incluir los ensayos con penfluridol en peces Wild Type (WT), mientras que en los peces Fli1 se probaron los efectos del penfluridol y del NNC 55-0396 sobre la tasa de eclosión y la frecuencia cardíaca de los embriones.

### 3.2.1 Penfluridol en peces Wild Type

Los ensayos con peces Wild Type (WT) dejaron ver que la exposición aguda al penfluridol desde etapas tempranas del desarrollo reduce la sobrevivencia de embriones WT. A las 24 hpf (horas post fertilización), todos los embriones expuestos a 10 y 20  $\mu\text{M}$  de penfluridol habían muerto. Por su parte, el grupo expuesto a 5  $\mu\text{M}$  tuvo un 100% de decesos a las 96 hpf, con una supervivencia media de 72 horas, mientras que las concentraciones de 2.5  $\mu\text{M}$  y menores no aumentaron la mortalidad con respecto al grupo control (Figura 9).



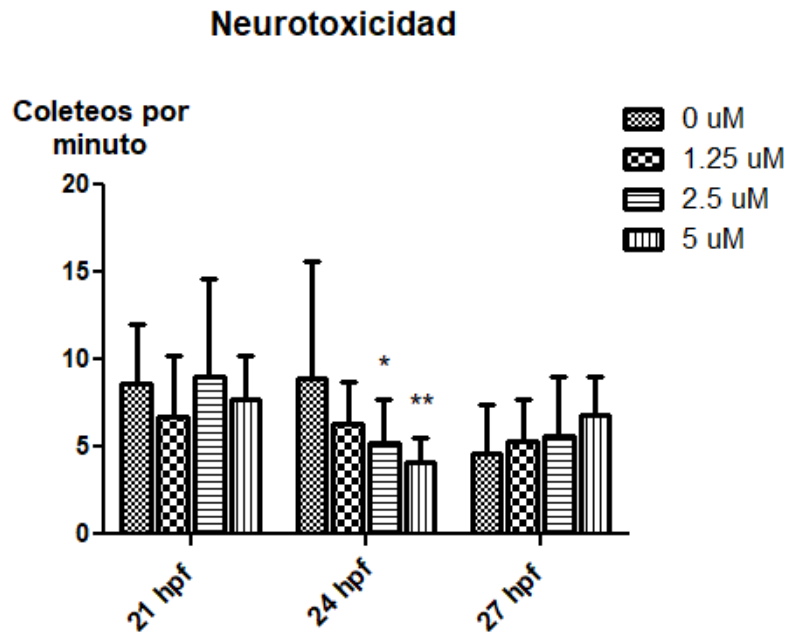
**Figura 6. Supervivencia entre los peces de los distintos tratamientos con penfluridol.** Los embriones tratados con 10 y 20  $\mu\text{M}$  de penfluridol no sobrevivieron a las 24 hpf, mientras que los expuestos a 5  $\mu\text{M}$  alcanzaron un 100% de mortalidad hasta las 96 hpf. Por su parte, en los grupos expuestos a 0, 1.25 y 2.5  $\mu\text{M}$  de penfluridol nunca se redujo la población a menos del 50%. Análisis de supervivencia con estimador de Kaplan-Meier, con prueba post-hoc de Mantel-Hox. Las curvas de supervivencia mostraron una diferencia significativa con  $p < 0.001$ .

Estos resultados sugieren que la exposición al penfluridol a concentraciones de 2.5  $\mu\text{M}$  o inferiores es segura en términos de mortalidad, por lo que se optó por realizar pruebas toxicológicas adicionales para profundizar sobre los posibles efectos secundarios en organismos funcionales expuestos a dichas concentraciones.

Asimismo, el ensayo del movimiento espontáneo de la cola reveló la presencia de anomalías en el neurodesarrollo de los peces tratados con penfluridol. Puntualmente, los embriones mostraron un decremento dosis-dependiente en el número de coleteos a las 24 hpf (Figura 7), lo cual indica una disminución de la actividad cerebral en esta etapa del desarrollo a causa de la exposición a penfluridol. A las 27 hpf se observó una tendencia (aunque no estadísticamente significativa) al aumento del número de coleteos conforme la concentración de penfluridol aumentó; contrario a lo visto a las 24 hpf.

El penfluridol retrasó el tiempo de eclosión en los embriones de pez cebra; al monitorear la tasa de eclosión entre los distintos tratamientos, se pudo observar un decremento significativo en el porcentaje de individuos eclosionados en el grupo expuesto a 5  $\mu\text{M}$  de penfluridol. Dicho decremento fue evidente

desde las 48 hpf y se sostuvo hasta las 96 hpf (Figura 8). En el caso de los peces expuestos a 10 y 20  $\mu\text{M}$  no hubo eclosión en ninguno de los tiempos de medición, lo cual sólo reafirma que estos individuos murieron desde el primer día de exposición, como se reportó en la Figura 6. Estos resultados podrían indicar que el penfluridol es capaz de retrasar el desarrollo embrionario.

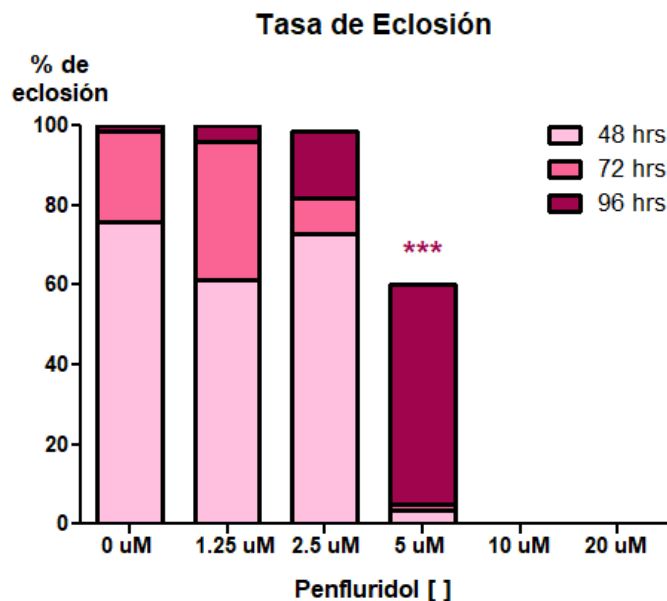


**Figura 7. Prueba de movimiento espontáneo de la cola.** El penfluridol causó un decremento significativo de coletes a las 24 hpf, cuando este fue administrado a 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ . Los embriones expuestos a 10 y 20  $\mu\text{M}$  de penfluridol no se incluyen debido a que no tuvieron movimiento, lo que sugiere que ya se encontraban muertos. ANOVA de dos vías con prueba post-hoc de Bonferroni. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.001$ .

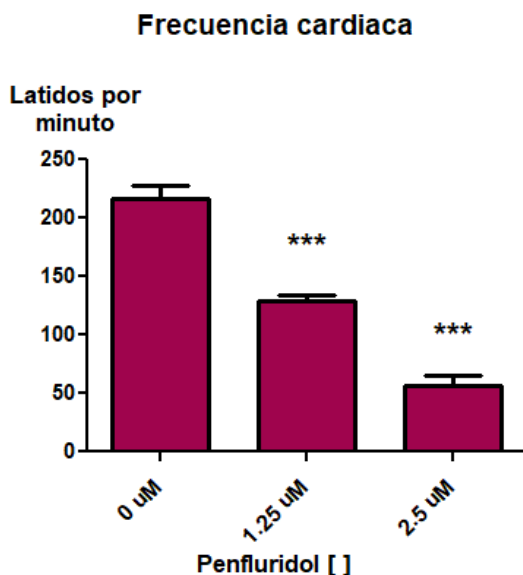
La frecuencia cardíaca también se vio influenciada por la exposición a penfluridol en dosis no letales. Los resultados sugieren que el penfluridol causa una reducción dosis-dependiente de la frecuencia cardíaca en las larvas Wild Type; al ser expuestos a 1.25  $\mu\text{M}$  los embriones redujeron alrededor de un 50% sus latidos por minuto con respecto al grupo control, mientras que los embriones del grupo 2.5  $\mu\text{M}$  los redujeron aproximadamente al 25% (Figura 9).

Por último, el penfluridol tuvo una marcada capacidad para inducir malformaciones en los peces cebra Wild Type. Desde la concentración más baja de penfluridol, la mayoría de los peces presentaron EPC y ESV, mientras que alrededor del 30% desarrollaron escoliosis. En el grupo expuesto a 2.5  $\mu\text{M}$  todos los peces mostraron EPC y ESV en conjunto, y a su vez la frecuencia de peces con escoliosis alcanzó el 90% (Figura

10). Como observación cualitativa, estas malformaciones produjeron una notoria dificultad en el nado de los ejemplares, por lo cual su sobrevivencia en las siguientes etapas de su desarrollo estaría comprometida.

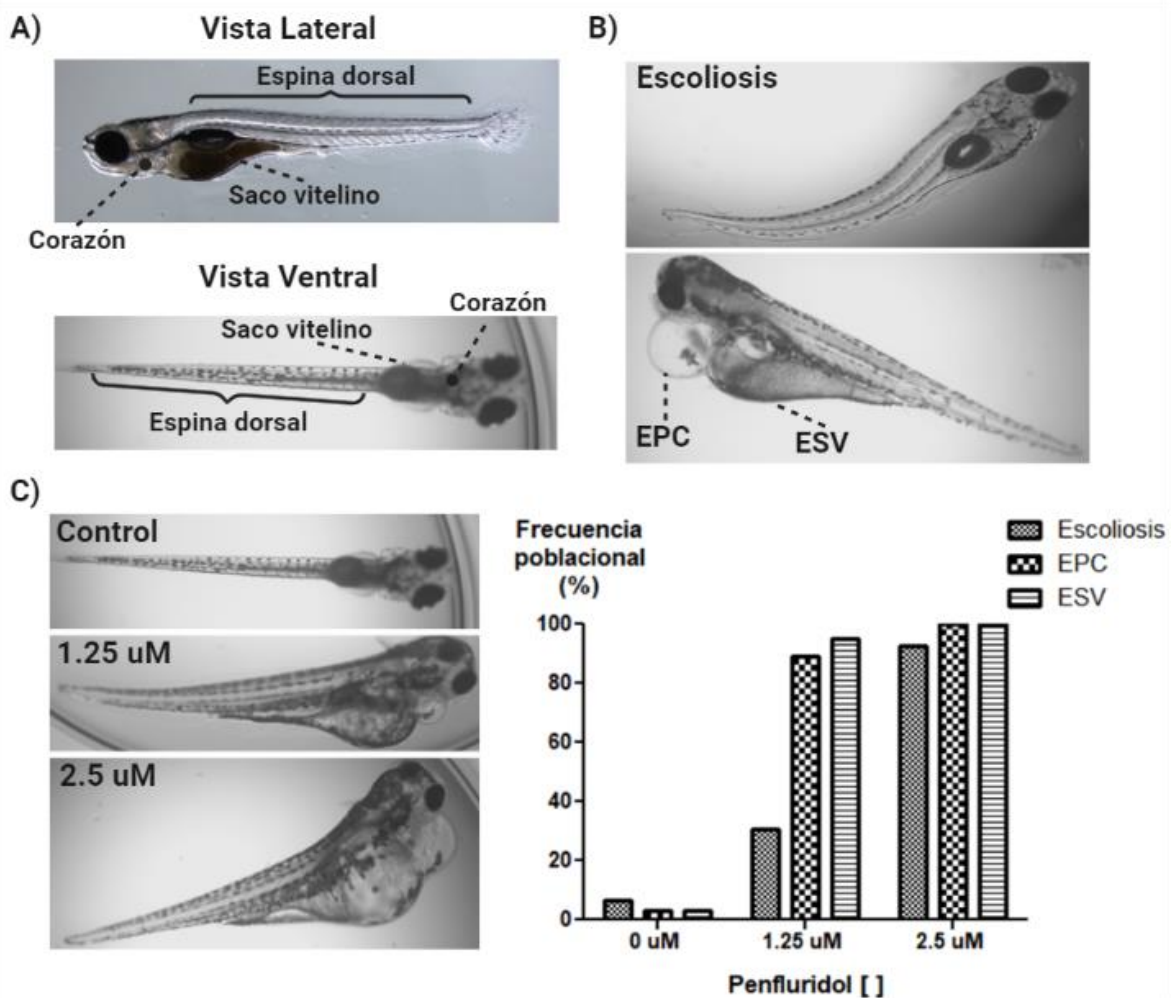


**Figura 8. El penfluridol retrasó la eclosión de peces Wild Type.** Las barras representan el total acumulativo de los peces eclosionados, que se cuantificaron cada 24 horas a desde las 48 hpf y hasta las 96 hpf. Los peces expuestos a 5 µM de penfluridol mostraron un decremento estadísticamente significativo del total de larvas eclosionadas con respecto al grupo control. Los tratamientos de 10 y 20 µM de penfluridol no tuvieron ningún pez eclosionado, lo que confirma la muerte de los peces durante su etapa embrionaria. ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. \*\*\*;  $p < 0.001$ .



**Figura 9. Frecuencia cardiaca de las larvas de pez cebra Wild Type expuestas a penfluridol.** Las barras representan el promedio de latidos por minuto entre las larvas de cada grupo experimental a las 100 hpf. ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. \*\*\*;  $p < 0.001$ .





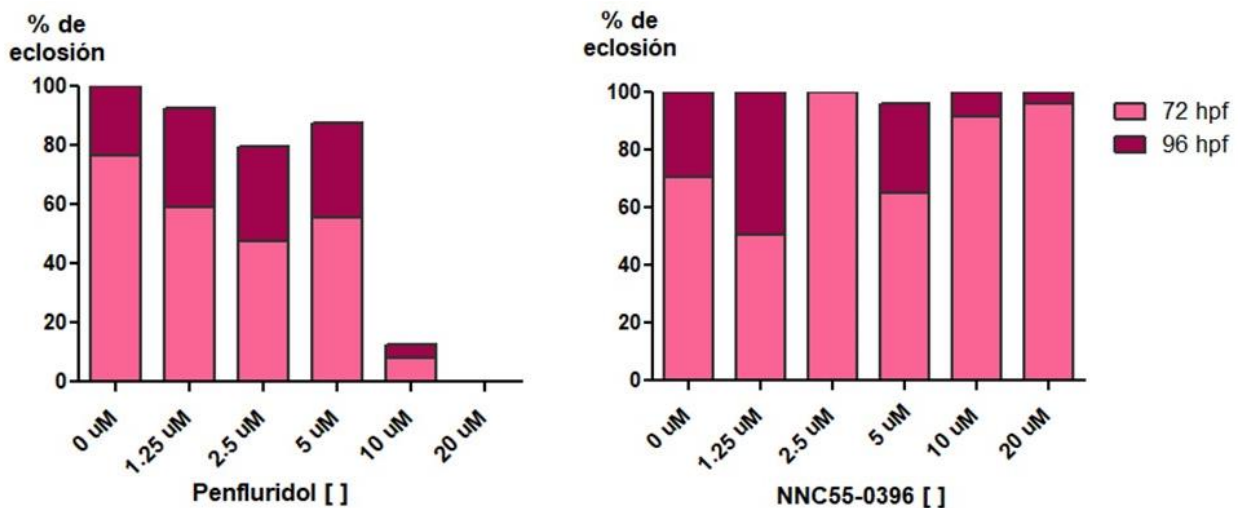
**Figura 10. Malformaciones en larvas de pez cebra expuestas a penfluridol durante etapas tempranas del desarrollo.** A) Fenotipo normal del pez cebra en etapa larvaria (120 hpf). B) Malformaciones cuantificadas en este estudio; arriba se muestra una larva con curvatura de la espina dorsal (escoliosis). Abajo se muestra una larva con edema en el pericardio (EPC) y edema en el saco vitelino (ESV). C) (Izquierda) Imágenes representativas del fenotipo dominante entre las larvas de cada grupo experimental y (derecha) frecuencia de cada malformación entre los diferentes grupos.

### 3.2.2 Pruebas de toxicidad en peces de la línea Tg(eGFP:Fli1)

#### 3.2.2.1 Índice de eclosión

Para reconocer el impacto del penfluridol sobre el desarrollo embrionario de los peces Fli1, se realizó un conteo de los embriones eclosionados de la misma manera que con los peces WT. Cabe destacar que los peces Fli1 mostraron un tiempo de eclosión anormal aún sin el fármaco, dado que los embriones no pasaban a la fase larvaria a las 48 hpf como normalmente. Esto sugiere que nuestros peces Fli1 tienen un

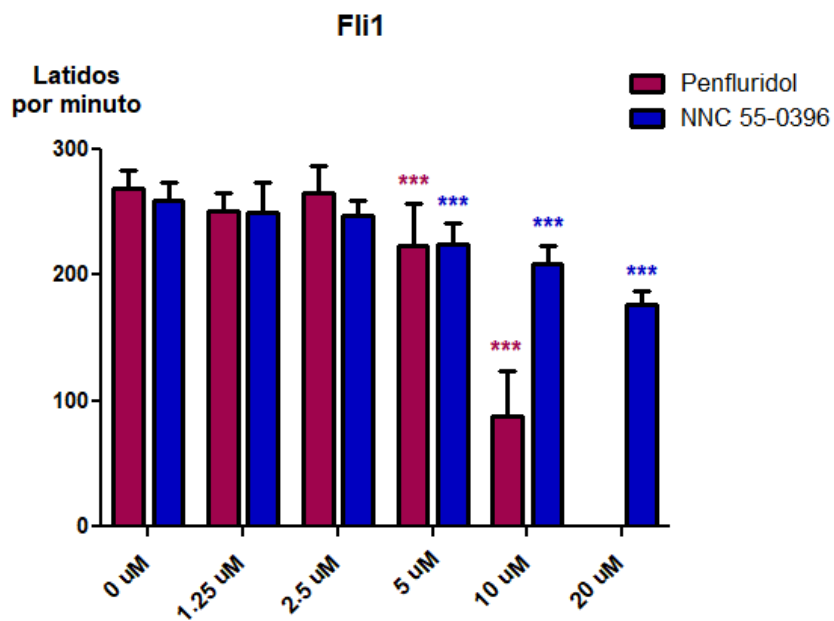
retraso en su desarrollo embrionario; a pesar de ello, el penfluridol produjo un marcado atraso en el tiempo de eclosión de los embriones expuestos; a las 72 hpf, el penfluridol mantuvo una reducción significativa del número de embriones eclosionados a partir de los 2.5  $\mu\text{M}$ , y dicha reducción se mantuvo a las 96 hpf en los tratamientos con las concentraciones más altas del fármaco (10 y 20  $\mu\text{M}$ ). Esto nos indica que los embriones necesitaron más tiempo para llegar a su fase larvaria conforme la concentración de penfluridol aumentó. En el caso del NNC 55-0396 no se produjeron efectos sobre la tasa de eclosión de los embriones Fli1, a ninguna de las concentraciones en las que el fármaco se administró (Figura 11).



**Figura 11. Cambios en la tasa de eclosión en embriones de la línea Tg(eGFP:Fli1) por exposición a penfluridol y NNC 55-0396.** En los peces expuestos a 20  $\mu\text{M}$  de penfluridol no hubo ningún eclosionado, mientras que en los tratados con 20  $\mu\text{M}$  el porcentaje de eclosión se redujo hasta alrededor del 10%. En los peces expuestos a concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$  la tasa de eclosión no mostró grandes cambios. Asimismo, los peces tratados con NNC 55-0396 no tuvieron una tasa aberrante de eclosión con respecto a su grupo control.

### 3.2.2.2 Cardiotoxicidad

A La frecuencia cardiaca de las larvas Fli1 se registró de la misma manera descrita para las larvas Wild Type. Luego del análisis se pudo ver que los fármacos indujeron bradicardia -una reducción significativa del ritmo cardiaco- al igual que lo visto en las larvas WT expuestas a penfluridol. Para ambos fármacos, dicha reducción se dio desde los 5  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, el efecto fue considerablemente mayor en el penfluridol, dado que los latidos por minuto se redujeron hasta el 32% en la dosis siguiente (10  $\mu\text{M}$ ) con respecto al grupo control, y en la dosis más alta (20  $\mu\text{M}$ ) los latidos se pararon en su totalidad, sugiriendo la muerte de los ejemplares. En el caso del NNC, los peces tratados con 10  $\mu\text{M}$  tuvieron una frecuencia cardiaca del 80% con respecto al control, mientras que los tratados con 20  $\mu\text{M}$  mostraron un 68% (Figura 12).



**Figura 12. Frecuencia cardiaca en peces de la línea Tg(eGFP:Fli1) expuestos a penfluridol y NNC 55-0396.** Ambos fármacos causaron un decremento dependiente de la concentración en el número de latidos por minuto. En el caso de los peces expuestos a 20  $\mu$ M de penfluridol, no se muestra la barra debido a que no hubo latidos. ANOVA de una vía con prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. \*\*\*;  $p < 0.001$ .

## Capítulo 4.      Discusión

---

El cáncer de mama es una de las patologías de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, siendo la primera causa de muerte en mujeres. Asimismo, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) amenaza mayormente a mujeres latinoamericanas y actualmente no existen terapias efectivas para tratarlo, por lo que representa un problema de salud de alta importancia para nuestra comunidad. En esta tesis se continuó con la caracterización de dos fármacos (penfluridol y NNC 55-0396) anteriormente propuestos (Ávalos-Rodríguez, 2017) y estudiados (Corral, 2020) para su uso en el tratamiento contra el CMTN.

Los ensayos realizados permitieron reconocer la capacidad de los fármacos para inducir estrés oxidativo en células cancerosas y sanas, así como su toxicidad sobre modelos *In vivo* (pez cebra) al exponerse durante etapas tempranas del desarrollo. Nuestros resultados permiten tener una idea más clara del potencial anticancerígeno de los fármacos, y del rango de concentraciones a las que su uso es seguro en organismos funcionales. Con ello, se asientan las bases para continuar el proceso de reposicionamiento de dichos fármacos, y en un futuro próximo implementar su uso como agentes terapéuticos contra el CMTN.

### 4.1 Ensayos *in vitro*

#### 4.1.1 Citotoxicidad de los fármacos en modelos celulares

Al estudiar el efecto de los fármacos estudiados en la proliferación de células cancerosas, los ensayos MTT revelaron que ambos fármacos pueden actuar como agentes citotóxicos. Sin embargo, dicho efecto estuvo presente tanto en las líneas de células cancerosas (MDA-MB-231 y 4T1) como en la línea no cancerosa (293T). Inicialmente, esto podría sugerir que la citotoxicidad inducida por los fármacos podría no ser específica para células cancerosas, sino que se da manera sistemática atacando también a las células sanas. Sin embargo, para ambos fármacos la  $IC_{50}$  fue menor en la línea MDA-MB-231 comparada con las líneas 4T1 y 293T, lo que sugiere que las células de CMTN de humano tienen particularmente una mayor sensibilidad a estos compuestos.

En cuanto a la citotoxicidad del penfluridol, nuestros resultados difieren con los obtenidos por Corral (2020), en donde la línea 4T1 fue la más sensible hacia el fármaco; sin embargo, las evidencias reportadas por Ranjan et al (2016) también señalan a la línea MDA-MB-231 como la más sensible al penfluridol comparada con la línea 4T1, igual que en el presente estudio. Asimismo, las investigaciones de Ranjan et al (2016) sugieren que el efecto citotóxico del penfluridol podría estar mediado por la inhibición de la señalización de la integrina  $\alpha\beta_4$ ; algo que sólo se observó en la línea MDA-MB-231 y no en 4T1 (Ranjan et al, 2016). Esto podría significar un mecanismo que subyace a la aparente especificidad del penfluridol hacia las células cancerosas de humano; sin embargo, diversos mecanismos podrían estar interactuando simultáneamente para mediar la citotoxicidad del fármaco, por lo que siguen necesitándose más pruebas.

Por su parte, los resultados vistos sobre la citotoxicidad del NNC 55-0396 también son distintos a lo reportado por Corral (2020), donde nuevamente la línea 4T1 mostró una sensibilidad mayor al fármaco. En el presente estudio, las células MDA-MB-231 mostraron una susceptibilidad mayor al fármaco comparadas con las células 4T1 y 293T, reflejado por sus respectivas  $IC_{50}$  (Figura 3). Por esto, la sensibilidad de cada línea celular hacia el NNC 55-0396 es un tema del que deberá profundizarse en el futuro próximo, ya que ayudaría a entender qué tan específico puede llegar a ser el fármaco al utilizarlo como auxiliar en el tratamiento del CMTN. Sin embargo, en cuanto a su actividad citotóxica en general, diversos estudios coinciden con nuestros resultados al reportar que el NNC 55-0396 produce una inhibición de la proliferación en líneas de cáncer de mama de humano (Sekar et al, 2022; Taylor et al, 2008).

En el estudio de Taylor et al (2008) se ha sugerido que el fármaco previene la proliferación de células MDA-MB-231, pero no necesariamente induce su muerte; a diferencia del mibefradil -análogo del NNC 55-0396-, que se asocia a la inducción de muerte celular (Bertolesi et al, 2002). Esta característica podría ser ventajosa para un tratamiento oncológico, dado que a través de este fármaco se podría detener la proliferación de las células cancerosas sin comprometer la viabilidad de las células sanas; sin embargo, aún se debe estudiar dicha posibilidad a profundidad. En cuanto al mecanismo que subyace a la citotoxicidad del NN 55-0396, se ha sugerido la capacidad del fármaco para inhibir la función de los canales de calcio tipo T (TTCC) puede alterar la homeostasis de calcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) (Huang et al, 2015), lo que comúnmente se asocia a la inducción de autofagia a través del estrés del retículo endoplásmico (Kania et al, 2015). Sin embargo, se sostiene que otros mecanismos podrían estar mediando simultáneamente los efectos del NNC 55-0396, por lo que se requiere de mayores estudios.

En el futuro próximo, será determinante el hacer pruebas de viabilidad con concentraciones cercanas a la  $IC_{50}$  de cada fármaco en las células MDA-MB-231; esto con el fin de reconocer si los fármacos a

concentraciones específicas, son capaces de inhibir la viabilidad de células de CMTN de humano sin afectar a otros tipos celulares. Esto daría una idea más clara del nivel de especificidad de nuestros fármacos.

#### **4.1.2 Inducción de estrés oxidativo**

En el estudio de Corral (2020), se reportó que tanto el penfluridol como el NNC 55-0396 pueden aumentar la expresión de genes asociados al estrés del retículo endoplásmico (ERE), lo que potencialmente sería una vía a través de la cual los fármacos inducen apoptosis. En este estudio, se planteó que la inducción de ERE por parte de los fármacos podría estar acompañada de un aumento de ROS en las células tratadas; esto debido a la relación que existe entre el ERE y el estrés oxidativo. Específicamente, la formación y rompimiento de enlaces disulfuro durante la síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico es un proceso mediado por ROS; sin embargo, durante el ERE este proceso es desregulado, lo que provoca una acumulación de ROS con consecuente apoptosis (Malhorta y Kaufman, 2007; Cao y Kauffman, 2014).

En el presente estudio, los ensayos con CellRox Deep Red Reagent<sup>®</sup> dejaron ver la capacidad de ambos fármacos (penfluridol y NNC 55-0396) para aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular en las líneas celulares probadas (Figura 5). Lo anterior sugiere que la inducción de estrés oxidativo podría ser uno de los mecanismos asociados a la citotoxicidad de los fármacos contra células cancerosas al igual que el aumento del ERE (Corral, 2020), en lo que podría ser un conjunto de eventos interrelacionados que conducen a la pérdida de la viabilidad de células cancerosas a través del aumento excesivo de los niveles de estrés intracelular.

Nuestros resultados son consistentes con reportes anteriores donde se señaló que el penfluridol produce un aumento de ROS en células MDA-MB-231, acompañado de una baja en el número de células por muestra, inducción de apoptosis e inhibición de la migración celular (Hedrick et al., 2016). Interesantemente, el mismo estudio encontró que dichas alteraciones se pueden mitigar al agregar un agente reductor como el glutatión a las células tratadas con penfluridol; esto soporta la hipótesis de que la toxicidad del penfluridol está mediada en gran medida por la inducción de estrés oxidativo.

En el caso del NNC 55-0396, un estudio reciente con células de glioblastoma señaló que su mecanismo de citotoxicidad está basado en la activación de la proteína IRE1 $\alpha$  (Visa et al., 2022). Esta proteína está involucrada en la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (RPD) como respuesta al ERE, y a su vez la sobreexpresión de IRE1 $\alpha$  está asociada a estrés oxidativo (Li et al, 2009). Por esto, se puede

hipotetizar que la citotoxicidad del NNC 55-0396 es consecuencia de un aumento del estrés oxidativo en las células cancerosas ligado a ERE. Apparently, this set of phenomena by exposure to NNC 55-0396 also occurs in breast cancer cells; Corral (2020) proved that NNC 55-0396 is capable of inducing ERE, while the present work reports that the drug can induce oxidative stress; both reports in MDA-MB-231 cells.

One aspect to highlight is that the three cell lines showed different basal levels of ROS intracellular, reflected by their average fluorescence intensity (IMF) emitted during the tests with CellRox. Specifically, in their respective control groups (without drug) the MDA-MB-231 cells showed the highest abundance of ROS, while the 4T1 line had the lowest IMF among the three cell lines. According to the previous, the most abrupt change in oxidative stress occurred in the 4T1 cells when treated with penfluridol, where from the lowest concentration (5  $\mu\text{M}$ ) there was a significant increase in ROS levels compared to the control group. On the contrary, in the MDA-MB-231 line only an increase in oxidative stress was observed when penfluridol was administered at 20  $\mu\text{M}$ . According to what was seen in the cell viability assays, among the three cell lines MDA-MB-231 showed the highest sensitivity to penfluridol (figures 2 and 3); when contrasting this with what was obtained in the CellRox tests, it can be inferred that this sensitivity is a product of its high basal level of ROS. In other words, the elevated oxidative stress present in the phenotype of the MDA-MB-231 cells would make them more susceptible to pro-oxidative therapies.

Similarly, when treating the cells with NNC 55-0396 the trend just described was repeated by showing that the MDA-MB-231 cells had a higher basal IMF compared to the 293T, as well as a lower  $\text{IC}_{50}$ , which suggests that a smaller amount of drug is required for the MDA-MB-231 cells to exceed the stress threshold that promotes the loss of cell viability. Additionally, both cell lines showed a greater increase in ROS when treated with NNC 55-0396 compared to what occurred with penfluridol. As can be seen in figure 5, if we compare the changes in IMF observed in the same cell line, it can be noted that in the case of NNC 55-0396 the increase in fluorescence occurred at lower concentrations compared to penfluridol. An example of this is what was seen in the 29T cells, where 10  $\mu\text{M}$  of NNC 55-0396 were sufficient to cause a significant increase in IMF. While, with penfluridol, the increase in IMF was observed starting from 15  $\mu\text{M}$ . This could suggest that NNC 55-0396 has a greater capacity to induce oxidative stress compared to penfluridol. However, in the near future there will be more tests to confirm this.

## 4.2 Ensayos *in vivo*

La exposición a los fármacos se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OECD para la evaluación de toxicidad aguda de fármacos durante etapas tempranas del desarrollo (OECD, 2013). Debido a que anteriormente no se había experimentado con estos fármacos en embriones de pez cebra, las concentraciones a utilizar se definieron con base a reportes previos donde se evaluó la toxicidad de los análogos farmacológicos de nuestros compuestos. Estos estudios se realizaron con haloperidol (Yen-Chang et al., 2019) y con mibefradil (Kim et al., 2015); los análogos del penfluridol y del NNC 55-0396, respectivamente.

Es importante señalar que los efectos vistos pueden variar si se cambian los parámetros de exposición, tales como la etapa inicial del tratamiento y su duración. Por ejemplo, para el tratamiento de distintos tipos de cáncer en larvas de pez cebra, las exposiciones farmacológicas generalmente se realizan a partir de las 48 hpf, con una duración promedio de cinco días (Cabezas et al, 2020). En este caso, el inicio del tratamiento se da en etapas avanzadas del desarrollo embrionario, donde los peces llegan a su estado larvario; por ello, el fármaco debería tener un impacto menor al no interferir con la diferenciación ontogénica. En el caso de los lineamientos de la OECD, la exposición se inicia a las 3 hpf; antes del inicio de la etapa de gastrulación, en donde da inicio la diferenciación celular para la formación de órganos. Con ello se busca ver el mayor potencial toxicológico que un fármaco es capaz de ejercer; a partir de aquí se determina un rango de concentraciones seguras para su posterior uso en pruebas adicionales.

### 4.2.1 Peces Wild Type

Los ensayos toxicológicos con peces Wild Type (WT) se realizaron de la manera descrita anteriormente (Figura 1). Para este tipo de peces sólo se pudo experimentar con penfluridol debido a la falta de disponibilidad del fármaco restante (NNC 55-0396) al momento de los ensayos. Aun así, los resultados permiten ver características importantes del perfil toxicológico del penfluridol en modelos *In vivo*. La influencia del penfluridol sobre los parámetros fisiológicos evaluados se describe a continuación.



#### 4.2.1.1 Sobrevivencia

El penfluridol redujo significativamente la sobrevivencia de los embriones expuestos a partir de los 5  $\mu\text{M}$  (Figura 6). De manera notoria, este compuesto alcanzó una letalidad del 100% a las 24 hpf a partir de los 10  $\mu\text{M}$ . Asimismo, todos los embriones del grupo se encontraron muertos al finalizar la exposición farmacológica (96 hpf), con una sobrevivencia media de 72 hpf. Por su parte, de los embriones expuestos a 5  $\mu\text{M}$  alrededor del 60% sobrevivieron hasta las 96 hpf. Los embriones tratados con concentraciones menores a la anterior (2.5 y 1.25  $\mu\text{M}$ ) tuvieron un grado de sobrevivencia muy similar al del grupo control, por lo que se reconocen como concentraciones no letales a partir de las cuales se deberá profundizar en los ensayos futuros para evaluar las propiedades anticancerígenas *in vivo* del penfluridol.

#### 4.2.1.2 Neurotoxicidad

Las pruebas de movimiento espontáneo de la cola revelaron que el penfluridol en dosis no letales ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ) puede causar anomalías en el neurodesarrollo de los peces cebra Wild Type (Figura 7). Los resultados de la prueba sugieren que se produjo una baja en su nivel de actividad cerebral en los embriones a las 24 hpf. Por otro lado, aunque a las 27 hpf la actividad cerebral típicamente decrece (Saint-Amant & Dupreau, 1998) esto sólo se vio en los peces del grupo control, mientras que en los peces tratados con penfluridol se mostró una tendencia al aumento dosis-dependiente del número de coleteos (aunque dicho aumento no fue estadísticamente significativo). Esto podría sugerir que el neurodesarrollo tuvo un retraso considerable por efecto del penfluridol.

El penfluridol es reconocido por su capacidad como auxiliar en el tratamiento de enfermedades psicóticas como la esquizofrenia, gracias a su capacidad para bloquear receptores D2 de dopamina (Kline et al, 2018). A su vez, la desregulación en la comunicación sináptica dopamina-dependiente durante etapas tempranas del desarrollo embrionario se ha asociado al desarrollo de trastornos psiquiátricos como producto de déficits en el neurodesarrollo, mismos que pueden perdurar hasta la adultez (Money y Stanwood, 2013). Por ello, las alteraciones vistas en la actividad cerebral de nuestros embriones coinciden totalmente con el mecanismo de acción del penfluridol. Importantly, los embriones expuestos a 1.25  $\mu\text{M}$  de penfluridol no mostraron diferencias significativas en su nivel de actividad cerebral con respecto al control, en ninguno de los tiempos de prueba. Por ello, se puede inferir que esta concentración -además de ser no letal- no interfiere con el neurodesarrollo y es candidata a ser el punto de partida para ensayos futuros con penfluridol en el pez cebra.

#### 4.2.1.3 Tasa de eclosión

El penfluridol tuvo efectos notorios sobre la eclosión de los embriones WT (Figura 8). Normalmente, un embrión alcanza la fase larvaria a las 48 hpf, donde se da el rompimiento del corión y comienza el nado libre. Sin embargo, entre los embriones expuestos a 5  $\mu\text{M}$  de penfluridol menos del 5% eclosionó a tiempo. Además, dicho porcentaje de eclosión se mantuvo incluso a las 72 hpf. Finalmente, a las 96 hpf sólo cerca del 60% de los embriones de este grupo se encontraron fuera del corión. Sin embargo, de acuerdo a lo visto en las pruebas de mortalidad, a las 96 hpf el total de los embriones expuestos a 5  $\mu\text{M}$  se encontraban muertos, por lo que su falta de corión en este punto probablemente sólo fue producto de una descomposición del mismo, y no de su rompimiento por parte de la larva viva. En el caso de los embriones del grupo 2.5  $\mu\text{M}$ , a las 72 hpf el porcentaje de embriones eclosionados se encontró alrededor del 80%; esto sugiere que hubo un retraso en el desarrollo embrionario, que condujo a un retardo en la llegada a la fase larvaria. Por su parte, los embriones del grupo 1.25  $\mu\text{M}$  de penfluridol no presentaron cambios significativos en el tiempo de eclosión. Estos resultados sugieren, por primera vez, que la exposición a concentraciones no letales de penfluridol durante etapas tempranas del desarrollo puede provocar un retraso en el desarrollo embrionario, con un consecuente retardo en la eclosión de los embriones.

#### 4.2.1.4 Frecuencia cardiaca

El ritmo cardiaco fue otro de los parámetros fisiológicos afectados por influencia al penfluridol. Puntualmente, el penfluridol produjo una reducción en el número de latidos por minuto, de manera dependiente de la concentración (Figura 9). Se sabe que parte del mecanismo de acción del penfluridol se basa en el bloqueo de canales de calcio tipo T (Kline et al, 2018); este tipo de canales están presentes en las células del nódulo sinusal (marcapasos) del corazón, por lo que su bloqueo podría estar asociado al desarrollo de arritmias (Santi et al, 2002). Anteriormente se ha demostrado que el penfluridol puede bloquear estos canales en células cardiacas (Enyeart et al, 1990). Consistentemente, nuestros resultados confirman la capacidad del penfluridol para inducir bradicardia, presuntamente a través del bloqueo de canales de calcio tipo T en los cardiomiocitos. En un futuro próximo será interesante evaluar si la disfunción en el músculo cardiaco persiste en etapas avanzadas del ciclo de vida del pez.

#### 4.2.1.5 Teratogénesis

En el año 2005, Diav-Citrin et al realizaron un estudio en humanos, donde se reportó que tanto el haloperidol como su análogo -el penfluridol- no promueven malformaciones en neonatos cuyas madres tomaron los antipsicóticos durante un periodo determinado del primer trimestre de embarazo (Diav-Citrin et al, 2005). Sin embargo, en años posteriores a dicho estudio se probó que existe una asociación entre la exposición fetal a antipsicóticos y el desarrollo de malformaciones congénitas (Lin et al, 2010). Asimismo, en 2012 otro estudio intentó, sin éxito, probar la asociación entre la ingesta de antipsicóticos durante el embarazo y la teratogénesis en los fetos expuestos (Bodén et al, 2012). De este modo, no parece haber congruencia entre los hallazgos hechos por los distintos autores, por lo que no hay una conclusión sobre si el penfluridol puede actuar como un agente teratogénico cuando se administra durante la gestación.

En nuestro estudio, la exposición al penfluridol indujo el desarrollo de malformaciones en las larvas WT (Figura 10). Estos resultados evidencian que concentraciones no letales de penfluridol (1.25 y 2.5  $\mu\text{M}$ ) son capaces de inducir el desarrollo de escoliosis, edema pericardiaco (EPC) y edema del saco vitelino (ESV) al ser administrado en embriones durante etapas tempranas del desarrollo. Asimismo, el índice de aparición de estas malformaciones parece aumentar de manera proporcional a la concentración de penfluridol. La aparición de escoliosis por exposición al fármaco sugiere que el penfluridol interfiere con el correcto desarrollo del sistema nervioso central y la formación de músculo esquelético; estas interferencias podrían deberse a una deficiencia de calcio intracelular, producto del bloqueo de los canales de calcio tipo T por parte del penfluridol. La formación de EPC podría indicar aberraciones fenotípicas en el músculo cardiaco con consecuente acumulación de fluidos en el pericardio, producto de un mal funcionamiento del sistema circulatorio. Por último, la presencia de ESV se asocia a fallos en la regulación osmótica por disfunción renal en el pez (Sant & Timme-Laragy, 2018).

En conjunto, estos resultados indican que la exposición aguda a dosis no letales de penfluridol durante etapas tempranas de la gestación puede irrumpir en el desarrollo de órganos clave y con ello conducir a aberraciones fenotípicas como producto de la desregulación de procesos fisiológicos vitales. Por ello, se debe dar continuidad a los estudios toxicológicos para encontrar concentraciones sin riesgo de inducción de malformaciones; estas concentraciones serían las que potencialmente puedan usarse para tratamientos oncológicos.

## 4.2.2 Peces Tg (eGFP:Fli1)

### 4.2.2.1 Tasa de eclosión

En el caso de los peces de la línea Fli1, se pudo realizar la evaluación de los cambios en la tasa de eclosión con ambos fármacos. Cabe resaltar que los embriones Fli1 mostraron un retraso en su tiempo usual de eclosión; los embriones incubados en condiciones normales no empezaron a eclosionar sino hasta las 72 hpf, lo cual sugiere un ritmo anormal en el desarrollo embrionario de nuestros ejemplares de esta línea transgénica.

Aun así, los resultados permitieron ver que en estos embriones el penfluridol también ejerce un efecto retardante en el desarrollo embrionario, traducido en un retraso en el tiempo de eclosión (Figura 11). Interesantemente, dicho retraso fue agravándose mientras la concentración de penfluridol era mayor. En el caso del grupo expuesto a 10  $\mu\text{M}$ , menos del 20% había alcanzado la fase larvaria con éxito incluso después de las 96 hpf; asimismo, el grupo de 20  $\mu\text{M}$  no hubo ningún individuo eclosionado al finalizar la exposición farmacológica, lo cual sugiere la muerte de los ejemplares y coincide con lo visto en las larvas Wild Type.

Por su parte, el NNC 55-0396 parece no influir en el tiempo de eclosión de los embriones; entre los distintos grupos experimentales no hubo variaciones significativas en cuanto al porcentaje de embriones eclosionados. Esto nos sugiere que el NNC 55-0396 en las concentraciones probadas podría ser un fármaco seguro para su uso durante la gestación; sin embargo, aún se debe profundizar con pruebas toxicológicas que permitan terminar de conocer el perfil de este compuesto y comprobar su seguridad.

### 4.2.2.2 Frecuencia cardiaca

Las pruebas de frecuencia cardiaca revelaron que ambos fármacos son inductores de bradicardia en larvas Fli1 (Figura 12). En cuanto al penfluridol, estos resultados son consistentes con lo visto en las larvas WT (Figura 9) y confirman el efecto cardiotóxico de este compuesto al ser administrado durante etapas tempranas del desarrollo. Dicho efecto se hizo presente a partir de los 5  $\mu\text{M}$ , y fue agravándose de manera repentina hasta reducir a alrededor del 30% los latidos en el grupo de 10  $\mu\text{M}$ , y a 0 en el grupo de 20  $\mu\text{M}$ .

Por su parte, el NNC 55-0396 mostró una influencia más sutil sobre la frecuencia cardíaca de las larvas. La reducción de latidos por minuto empezó a ser significativa a partir de los 5  $\mu\text{M}$ , y continuó agravándose conforme la concentración creció; sin embargo, con este fármaco dicha reducción fue mucho menor con respecto a la vista en las larvas expuestas a penfluridol. Con NNC 55-0396 en la concentración más alta probada (20  $\mu\text{M}$ ), la frecuencia cardíaca se mantuvo en cerca del 70% con respecto al grupo control, sugiriendo que este compuesto podría ser un fármaco de menor agresividad hacia los cardiomiocitos si lo comparamos con el penfluridol. De manera similar al penfluridol, el NNC 55-0396 basa su mecanismo de acción en el bloqueo altamente específico de canales de calcio tipo T (Huang et al, 2015); como se mencionó anteriormente, estos canales están involucrados en la regulación del ritmo cardíaco al estar presentes en las células del marcapasos (Santi et al, 2002), por lo que se sostiene que las alteraciones en la frecuencia cardíaca serán un marcador típico de la exposición a NNC 55-0396.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten ampliar el conocimiento que se tiene sobre el penfluridol y el NNC 55-0396, esclareciendo su perfil farmacológico y permitiendo la continuación de su proceso de reposicionamiento para un futuro uso como auxiliar del tratamiento del CMTN. Las pruebas realizadas permiten inferir que los fármacos tienen un efecto citotóxico mayor en células de CMTN de humano, con respecto a células sanas (293T) y de CMTN de ratón (4T1). Dicha afinidad por las células de CMTN humano podría deberse a que su efecto citotóxico está mediado por la inducción de estrés oxidativo asociado a ERE, y debido a que las células MDA-MB-231 fenotípicamente muestran niveles altos de ROS intracelular, resultan más susceptibles ante un fármaco con un efecto pro-oxidativo.

A su vez, ambos fármacos demostraron tener implicaciones en parámetros fisiológicos clave. Los resultados sirvieron para definir concentraciones no letales (principalmente del penfluridol); a partir de ellas se deberá profundizar para reconocer concentraciones que no causen efectos deletéreos sobre la fisiología del pez. Asimismo, estudios a futuro incluyen evaluar el efecto de los fármacos a concentraciones seguras, durante etapas tardías del desarrollo; la fase larvaria y la fase adulta. Esto ayudará a determinar si los fármacos tienen efectos deletéreos en adultos y determinar su bioseguridad para utilizarse como tratamiento anticancerígeno en organismos desarrollados.

## Literatura citada

---

- Ashburn, T. T., Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 673–683. doi:10.1038/nrd1468
- Avalos-Rodríguez, G. (2017). Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de cáncer de mama mediante un análisis integral de firmas transcripcionales. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Ecología, A. C. 92 pp.
- Beachy, S. H., Johnson, S. G., Olson, S., Berger, A. C. (2014). Drug Repurposing and Repositioning: Work Shop Summary. Institute of Medicine of the National Academies, Washington, D. C. doi:10.17226/18731
- Bertolesi, G. E., Shi, C., Elbaum, L., Jollimore, C., Rozenberg, G., Barnes, S., Kelly, M. E. M. (2002). The Ca<sup>2+</sup> Channel Antagonists Mibefradil and Pimozide Inhibit Cell Growth via Different Cytotoxic Mechanisms. *Molecular Pharmacology*, 62(2), 210–219. doi:10.1124/mol.62.2.210
- Bielenberg, D. R., Zetter, B. R. (2015). The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J*, 21(4), 267–273. doi: 10.1097/PPO.000000000000138.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Bodén, R., Lundgren, M., Brandt, L., Reutfors, J., Kieler, H. (2012). Antipsychotics During Pregnancy: Relation to Fetal and Maternal Metabolic Effects. *Archives of General Psychiatry*, 69(7), 715–721. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.1870
- Cabezas-Sáinz, P., Pensado-López, A., Sáinz, B., J., Sánchez, L. (2020). Modeling Cancer Using Zebrafish Xenografts: Drawbacks for Mimicking the Human Microenvironment. *Cells*, 9, 1978. doi.org/10.3390/cells9091978
- Cao, S. S., Kaufman, R. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & redox signaling*, 21(3), 396–413. doi.org/10.1089/ars.2014.5851
- Chaffer, C. L., Weinberg, R. A. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331(6024), 1559–1564. doi:10.1126/science.1203543
- Cornet, C., Calzolari, S., Miñana-Prieto, R., Dyballa, S., Van Doornmalen, E., Rutjes, H., Savy, T., D'Amico, D., Terriente, J. (2017). ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(4), 864. doi: 10.3390/ijms18040864
- Clarke, H. J., Chambers, J. E., Liniker, E., Marciniak, S.J. (2014). Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*, 25(5), 563–573. doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.015.
- Diav-Citrin, O., Shechtman, S., Ornoy, S., Arnon, J., Schaefer, C., Garbis, H., Clementi, M., Ornoy, A. (2005). Safety of haloperidol and penfluridol in pregnancy: a multicenter, prospective, controlled study. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 66(3), 317–22. doi: 10.4088/jcp.v66n0307.

- Drasin, D. J., Robin, T. P. Ford, H. L. (2011). Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Research*. 13, 226. doi.org/10.1186/bcr3037
- Enyeart, J. J., Dirksen, R. T., Sharma, V. K., Williford, D. J., Sheu, S. S. (1990). Antipsychotic pimozide is a potent Ca<sup>2+</sup> channel blocker in heart. *Molecular Pharmacology*. 37(5), 752–757. Consultado el 18 de febrero de 2022 en [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2160063/#:~:text=The%20diphenylbutylpiperidine%20\(DPBP\)%20antipsychotic%20pimozide,in%20a%20voltage%2Ddependent%20manner.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2160063/#:~:text=The%20diphenylbutylpiperidine%20(DPBP)%20antipsychotic%20pimozide,in%20a%20voltage%2Ddependent%20manner.)
- Guo, Y., Dai, S., Wei, W. (2018). The role of epithelium-mesenchymal conversion in endometrial cancer patients with chemotherapy drug resistance. *Cancer Cell Research*, 17, 408-411. Consultado el 3 de enero de 2022 en <http://www.cancerellresearch.org/PDF/20181701.pdf>.
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Chaudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., Gupta, P. K., Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 15(11), 4405–4409. doi:10.7314/apjcp.2014.15.11.4405
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Kohler, H.R., Triebskorn, R. (2005). Combined temperature and cadmium effects on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*, 30, 7-17. doi: 10.1016/j.jtherbio.2004.06.002
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2
- Hedrick, E., Li, X., Safe, S. (2016). Penfluridol Represses Integrin Expression in Breast Cancer through Induction of Reactive Oxygen Species and Downregulation of Sp Transcription Factors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(1), 205–216. doi:10.1158/1535-7163.mct-16-0451
- Hernández-Álvarez, C., Romo-Aguirre, C., Ortiz-de Iturbide, C. (2017). Cáncer de mama triple negativo: frecuencia y características en el Hospital Ángeles Pedregal. *Acta médica Grupo Ángeles*, 15(4), 269-274. Consultado el 02 de febrero de 2022 en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-72032017000400269&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-72032017000400269&lng=es&tlng=es).
- Huang, W., Lu, C., Wu, Y., Ouyang, S., Chen, Y. (2015). T-type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(54). doi:10.1186/s13046-015-0171-4
- Jamdade, V. S., Sethi, N., Mundhe, N. A., Kumar, P., Lahkar, M., Sinha, N. (2015). Therapeutic targets of triple-negative breast cancer: a review. *British Journal of Pharmacology*, 172(17), 4228–4237. doi:10.1111/bph.13211
- Jung, D. W., Oh, E. U., Park, S. H., Chang, Y. T., Kim, C. H., Choi, S. Y., Williams, D. R. (2012). A novel zebrafish human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening. *Molecular BioSystems*, 8(7), 1930. doi:10.1039/c2mb05501e



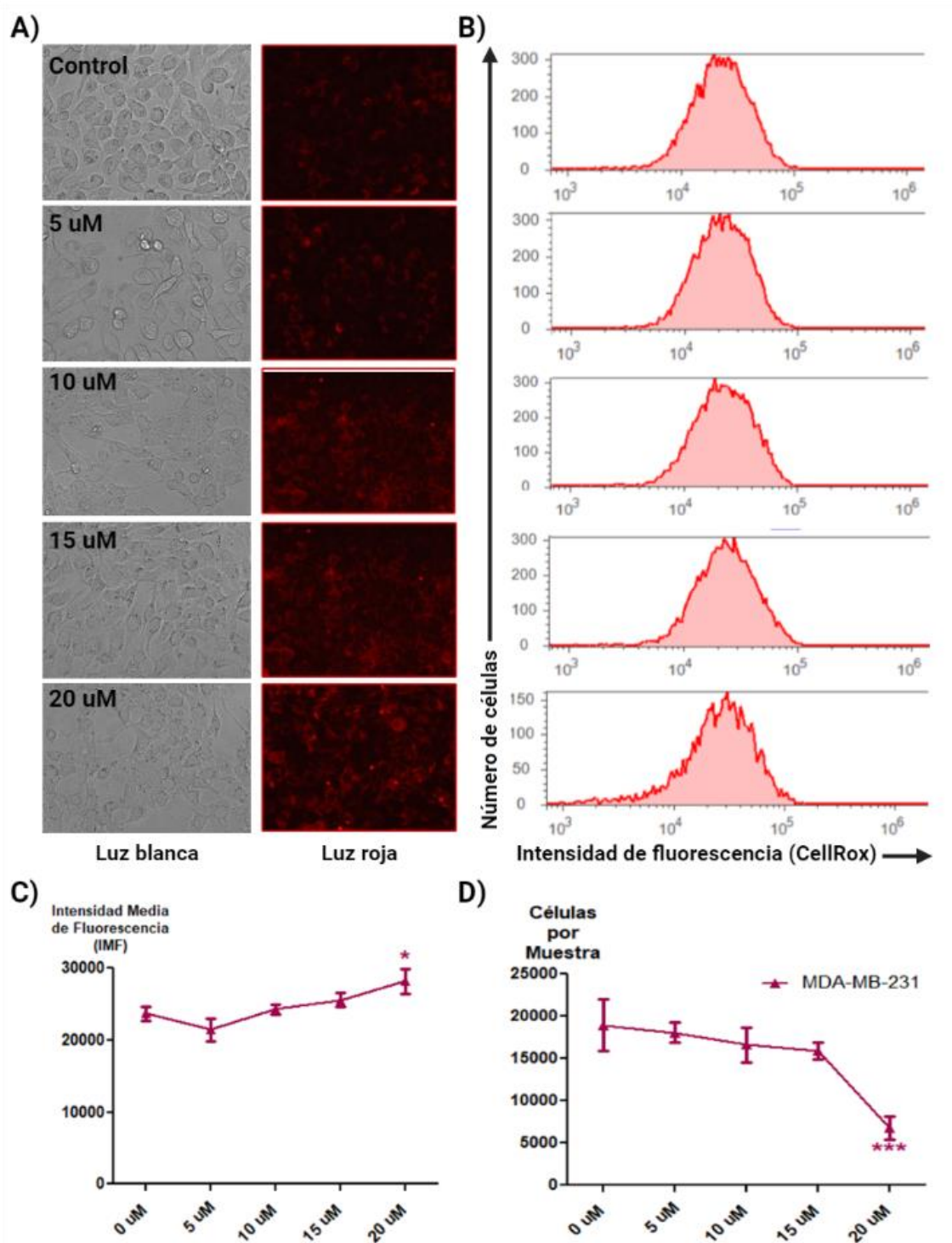
- Kania, E., Pająk, B., Orzechowski, A. (2015). Calcium Homeostasis and ER Stress in Control of Autophagy in Cancer Cells. *BioMed Research International*, 1–12. doi:10.1155/2015/352794
- Kim, K. H., Kim, D., Park, J. Y. et al. (2015). NNC 55-0396, a T-type Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor, inhibits angiogenesis via suppression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signal transduction. *Journal of Molecular Medicine*, 93, 499–509. doi.org/10.1007/s00109-014-1235-1
- Kim, Y. W., Byzova, T. V., (2014). Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*, 123(5), 625–631. doi: 10.1182/blood-2013-09-512749
- Kline, C. L. B., Ralff, M. D., Lulla, A. R., Wagner, J. M., Abbosh, P. H., Dicker, D. T., Allen, J. E., El-Deiry, W. S. (2018). Role of Dopamine Receptors in the Anticancer Activity of ONC201. *Neoplasia*, 20(1), 80–91. doi:10.1016/j.neo.2017.10.002
- Kobayashi, Y., Banno, K., Kunitomi, H., Tominaga, E., Aoki, D. (2019). Current state and outlook for drug repositioning anticipated in the field of ovarian cancer. *Journal of Gynecologic Oncology*, 30(1). doi:10.3802/jgo.2019.30.e10
- Kozol, R. A., Abrams, A. J., James, D. M., Buglo, E., Yan, Q., Dallman, J. E. (2016). Function over form: modeling groups of inherited neurological conditions in zebrafish. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 55. doi: 10.3389/fnmol.2016.00055
- Lara-Medina, F., Pérez-Sánchez, V., Saavedra-Pérez, D., Blake-Cerda, M., Arce, C., Motola-Kuba, D., Villarreal-Garza, C., González-Angulo, A. M., Bargalló, E., Aguilar, J. L., Mohar, A., & Arrieta, Ó. (2011). Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer*, 117(16), 3658–3669. doi:10.1002/cncr.25961
- Lawson, N. D., Weinstein, B. M. (2002). In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Developmental Biology*, 248, 307–318. doi.org/10.1006/dbio.2002.0711
- Lee, L. M., Seftor, E. A., Bonde, G., Cornell, R. A., Hendrix, M. J. (2005). The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 233(4), 1560–1570. doi:10.1002/dvdy.20471
- Li, J., Zheng, S., Chen, B., Butte, A. J., Swamidass, S. J., Lu, Z. (2016). A survey of current trends in computational drug repositioning. *Briefings in Bioinformatics*, 17(1), 2–12. doi:10.1093/bib/bbv020
- Li, G., Mongillo, M., Chin, K. T., Harding, H., Ron, D., Marks, A. R., Tabas, I. (2009). Role of ERO1- $\alpha$ -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of cell biology*, 186(6), 783–792. doi.org/10.1083/jcb.200904060
- Li, Y., Zhang, H., Merkher, Y. et al. (2022). Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 15, 121. doi.org/10.1186/s13045-022-01341-0
- Lin, H. C., Chen, I. J., Chen, Y. H., Lee, H. C., Wu, F. J. (2010). Maternal schizophrenia and pregnancy outcome: Does the use of antipsychotics make a difference? *Schizophrenia Research.*, 116, 55–60. doi: 10.1016/j.schres.2009.10.011

- Lodish H. F. (2013). *Molecular cell biology* (7.<sup>a</sup> ed.). W.H. Freeman Macmillan Learning, New York.
- MacRae, C. A., Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(10), 721–731. doi:10.1038/nrd4627
- Malhotra, J. D., Kaufman R. J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*, 9, 2277–2293. doi:10.1089/ars.2007.1782
- Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Hernández-Hernández, J. M., Rotello, V. M., Ramirez, J. T. (2020). Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 2078. doi:10.3390/ijerph17062078
- Money, K. M., Stanwood, G. D. (2013). Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 7, 260. doi: 10.3389/fncel.2013.00260
- Mundy, G. R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 584–593. doi:10.1038/nrc867
- Muñoz-Montecinos, C., Romero, A., Sepúlveda, V., Vira, M. A., Fehrmann-Cartes, K., Marcellini, S., Aguilera, F., Caprile, T., Fuentes, R., (2022). Turning the Curve Into Straight: Phenogenetics of the Spine Morphology and Coordinate Maintenance in the Zebrafish. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 801652. doi: 10.3389/fcell.2021.801652.
- Nicoli, S., Presta, M. (2007). The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nature protocols*, 2(11), 2918–2923. doi:10.1038/nprot.2007.412
- Nosengo, N. (2016). Can you teach old drugs new tricks? *Nature*, 534(7607), 314–316. doi:10.1038/534314a
- Ogungbemi, A. O., Teixido, E., Massei, R., Scholz, S., Küster, E. (2020). Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME®. *Neurotoxicology and Teratology*, 106918. doi:10.1016/j.ntt.2020.106918
- OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, doi.org/10.1787/9789264203709-en.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., Mcnamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., Pirmohamed, M. (2018). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Publishing Group*, 18(1), 41–58. doi:10.1038/nrd.2018.168
- Raldúa, D., André, M., Babin, P. J. (2008). Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicology and applied pharmacology*, 228(3), 301–314. doi:10.1016/j.taap.2007.11.016
- Ranjan, A., Gupta, P., Srivastava, S. K. (2016). Penfluridol: An Antipsychotic Agent Suppresses Metastatic Tumor Growth in Triple-Negative Breast Cancer by Inhibiting Integrin Signaling Axis. *Cancer Research*, 76(4), 877–890. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1233

- Sant, K. E., Timme-Laragy, A. R. (2018). Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. *Current Environmental Health Reports*, 5(1), 125–133. doi:10.1007/s40572-018-0183-2
- Santi, C. M., Cayabyab, F. S., Sutton, K. G., McRory, J. E., Mezeyova, J., Hamming, K. S., Parker, D., Stea, A., Snutch, T. P. (2002). Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *Journal of Neuroscience*, 22(2), 396-403. doi: 10.1523/jneurosci.22-02-00396.2002.
- Schroeder, A., Heller, D. A., Winslow, M. M., Dahlman, J. E., Pratt, G. W., Langer, R., Jacks, T., Anderson, D. G. (2011). Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 39-50. doi: 10.1038/nrc3180.
- Schumacker, P. T. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell*, 10(3), 175-176. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.015
- Secretaria de Salud. Cancer de la Mujer. Consultado el 24 de abril del 2021, de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/248801/CancerdeLaMujer.pdf>
- Sekar, S., Subbamanda, Y., Pullaguri, N., Sharma, A., Sahu, C., Kumar, R., Bhargava, A. (2022). Isoform-specific expression of T-type voltage-gated calcium channels and estrogen receptors in breast cancer reveals specific isoforms that may be potential targets. *Current Research in Biotechnology*, 4, 459-467. doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.09.009
- Tang, J. Y., Farooqi, A. A., Ou-Yang, F., Hou, M.-F., Huang, H. W., Wang, H.-R., Chang, H. W. (2018). Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects - involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration. *Seminars in Cancer Biology*, 58, 109–117. doi:10.1016/j.semcancer.2018.08.010
- Taylor, J. T., Huang, L., Pottle, J. E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B. M., Agrawal, K. C., Hansen, J. B., Li, M. (2008). Selective blockade of T-type Ca<sup>2+</sup> channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer letters*, 267(1), 116–124. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.032
- Visa, A., Alza, L., Cantí, C., Herreros, J. (2022). Tetralol derivative NNC-55-0396 induces glioblastoma cell death by activating IRE1 $\alpha$ , JNK1 and calcium signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112881, doi:10.1016/j.biopha.2022.112881.
- Wang, W. A., Groenendyk, J., Michalak, M. (2014). Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(10), 2143-2149. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.012
- Würth, R., Thellung, S., Bajetto, A., Mazzanti, M., Florio, T., Barbieri, F. (2016). Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: Novel molecular targets for known compounds. *Drug Discovery Today*, 21(1), 190–199. doi:10.1016/j.drudis.2015.09.017
- Yella, J. K., Yaddanapudi, S., Wang, Y., Jegga, A. G. (2018). Changing Trends in Computational Drug Repositioning. *Pharmaceuticals*, 11(2), 57. doi:10.3390/ph11020057}
- Lin, Y. C., Huang, C., Huang, H. C., Liao, M. T., Lai, Y. H. (2019). Metabolomics profiling of haloperidol and validation of thromboxane-related signaling in the early development of zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(3), 608–615. doi:10.1016/j.bbrc.2019.04.003

Zhou, W., Fang, H., Wu, Q., Wang, X., Liu, R., Li, F., Xiao, J., Yuan, L., Zhou, Z., Ma, J., Wang, L., Zhao, W., You, H., Ju, J., Feng, J., Chen, C. (2019). Ilamycin E, a natural product of marine actinomycete, inhibits triple-negative breast cancer partially through ER stress-CHOP-Bcl-2. *International Journal of Biological Sciences*, 15(8), 1723–1732. doi:10.7150/ijbs.35284.

## Anexos



**Figura 13. Efecto del penfluridol sobre el nivel de estrés oxidativo en células MDA-MB-231.** A) Imágenes representativas tomadas bajo el microscopio de fluorescencia. B) Histogramas obtenidos por citometría de flujo, que expresan la fluorescencia emitida por las células en las muestras analizadas. C) Gráfica de dispersión con los datos presentados en los histogramas. Cada punto representa el promedio de la intensidad de fluorescencia entre las muestras de un mismo tratamiento. D) Conteo de las células presentes por muestra en los distintos tratamientos. Las barras de error representan la desviación estándar. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ .