

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ingeniería



Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias:

Análisis de los procesos de viabilidad y migración celular asociados a la exposición de mefloquina y paroxetina, en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

Sustentante:

Andrey Salazar Mendoza

Directora de tesis:

Dra. Angélica López Izquierdo

Mexicali, Baja California, 12 de diciembre de 2025

*A mi esposa, Alexia, por su amor y su comprensión sin medida, por ser mi
inspiración constante.*

A mi madre, Lidia, por su apoyo incondicional y por ser ejemplo de fortaleza.

*A mis hermanos, Orlando y Yoselin, por siempre alentarme a dar mi mayor
esfuerzo.*

Agradecimientos

A la Dra. Angélica López Izquierdo, por transmitir su conocimiento y guiarme en cada paso del proyecto, así como por sus consejos que trascienden lo académico.

Al comité revisor de esta tesis, Dra. Aseneth Herrera Martínez, Dra. Tania Ferrer Villada y Dr. Octavio Galindo Hernández, por sus enseñanzas y por su valiosa contribución en la mejora de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California, por proporcionar los medios y herramientas para la realización de este proyecto.

A mis colegas, Fernando y Maximiliano, por su compañerismo y colaboración en cada experimento.

A mi familia y amigos, por estar siempre pendientes de mi trabajo y animarme a lograrlo.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado para llevar a cabo esta investigación.

Este proyecto contó con el recurso financiero de la Convocatoria Especial de Necesidades Regionales 2022 y la Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación 2024-2025.

Índice

1. Índice de figuras.....	1
2. Abreviaturas.....	5
3. Resumen.....	6
4. Antecedentes.....	7
4.1. Cáncer.....	7
4.2. Cáncer de mama.....	8
4.3. Cáncer de mama triple negativo.....	10
4.4. Migración celular y metástasis.....	12
4.5. Ensayos de migración <i>in vitro</i>	16
4.6. Línea celular MDA-MB-231.....	17
4.7. Canales iónicos y su papel en el cáncer.....	18
4.8. Combinaciones terapéuticas en el cáncer.....	28
4.9. Paroxetina como posible auxiliar en el tratamiento de cáncer.....	29
4.10. Mefloquina y su potencial para combatir el cáncer.....	30
5. Planteamiento del problema.....	32
6. Justificación.....	34
7. Hipótesis.....	36
8. Objetivos.....	36
8.1. Objetivo general.....	36
8.2. Objetivos específicos.....	36
9. Materiales y métodos.....	37
9.1. Cultivo de la línea celular.....	37
9.2. Preparación de soluciones de fármacos.....	38
9.3. Ensayo de viabilidad celular (MTT).....	38

9.4.	Análisis de combinación de fármacos	39
9.5.	Ensayo de migración celular (cierre de herida).....	40
9.6.	Ensayo de migración celular (Transwell)	41
9.7.	Análisis estadístico	42
10.	Resultados.....	43
10.1.	Ensayo de viabilidad celular (MTT)	43
10.2.	Ensayo de viabilidad celular en combinación de fármacos	47
10.3.	Ensayo de migración celular (cierre de herida)	51
10.4.	Ensayo de migración celular (Transwell).....	64
11.	Discusión	68
12.	Conclusiones	79
13.	Perspectivas	80
14.	Referencias bibliográficas	81
15.	Anexos	90
15.1.	Anexo A: ensayos de viabilidad celular en HUVEC.....	90

1. Índice de figuras

Figura 1. Subtipos moleculares principales del cáncer de mama.....	10
Figura 2. Proceso de metástasis de cáncer de mama al cerebro.....	13
Figura 3. Cambios en las propiedades celulares durante la transición epitelial-mesenquimal.....	15
Figura 4. Migración celular en cultivo <i>in vitro</i>	17
Figura 5. Estados en los que se pueden encontrar los canales de sodio dependientes de voltaje.....	22
Figura 6. Efecto de mefloquina sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 evaluada con el ensayo de MTT.	44
Figura 7. Curva concentración-efecto de mefloquina sobre la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231, donde se muestra una $IC_{50} = 15.48 \mu M$	45
Figura 8. Efecto de paroxetina sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 evaluada con el ensayo de MTT.	46
Figura 9. Curva concentración-efecto de paroxetina sobre la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231, donde se muestra una $IC_{50} = 34.07 \mu M$	47
Figura 10. Efecto de la aplicación combinada de paroxetina y mefloquina sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 evaluada con el ensayo de MTT. ...	48
Figura 11. Mapa de calor del porcentaje de inhibición en la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231 al realizar combinaciones de diferentes concentraciones de mefloquina y paroxetina.	49
Figura 12. Mapa en 2D del análisis de sinergia entre las diferentes concentraciones de mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231. ...	50

Figura 13. Mapa en 3D del análisis de sinergia entre las diferentes concentraciones de mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231. ...	51
Figura 14. Representación de ensayo de herida en condiciones control positivo.	52
Figura 15. Representación de ensayo de herida en condiciones control negativo.	52
Figura 16. Representación de ensayo de herida con una concentración de 1 μM de MQ..	53
Figura 17. Representación de ensayo de herida con una concentración de 3 μM de MQ..	53
Figura 18. Representación de ensayo de herida con una concentración de 5 μM de MQ.	54
Figura 19. Representación de ensayo de herida con una concentración de 7 μM de MQ.	54
Figura 20. Representación de ensayo de herida con una concentración de 10 μM de MQ.	55
Figura 21. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 horas de transcurrido el ensayo.	56
Figura 22. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231 después de 48 horas de transcurrido el ensayo.	57
Figura 23. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 y 48 horas de transcurrido el ensayo.	58
Figura 24. Representación de ensayo de herida con una concentración de 1 μM de PX.	59
Figura 25. Representación de ensayo de herida con una concentración de 5 μM de PX.	59

Figura 26. Representación de ensayo de herida con una concentración de 10 μ M de PX.	60
Figura 27. Representación de ensayo de herida con una concentración de 15 μ M de PX.	60
Figura 28. Representación de ensayo de herida con una concentración de 20 μ M de PX.	61
Figura 29. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de paroxetina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 horas de ensayo.....	62
Figura 30. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de paroxetina en la línea celular MDA-MB-231 después de 48 horas de ensayo.....	63
Figura 31. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de paroxetina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 y 48 horas de transcurrido el ensayo.	64
Figura 32. Representación de las células MDA-MB-231 que realizaron migración durante el ensayo Transwell.....	65
Figura 33. Porcentaje de migración celular de la línea celular MDA-MB-231 a las 48 horas de ensayo en Transwell.	66
Figura 34. Modelo hipotético en el que la actividad aberrante de canales iónicos dependientes de voltaje (sodio y potasio) promueve la supervivencia, proliferación, migración e invasión en las células de cáncer de mama triple negativo, mediante las vías de señalización de PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK.	76
Figura 35. Modelo hipotético en el que mefloquina y paroxetina inhiben la actividad aberrante de canales iónicos dependientes de voltaje (sodio y potasio), lo que disminuye la supervivencia, proliferación, migración e invasión en las células de cáncer de mama triple negativo, al afectar las vías de señalización de PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK.	77

Figura A1. Efecto de mefloquina sobre la viabilidad celular en línea HUVEC evaluada con el ensayo de MTT..... 90

Figura A2. Efecto de paroxetina sobre la viabilidad celular en línea HUVEC evaluada con el ensayo de MTT..... 91

2. Abreviaturas

- ◆ DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.
- ◆ DMSO: dimetilsulfóxido.
- ◆ EMT: transición epitelial-mesenquimal.
- ◆ ER: receptores de estrógeno.
- ◆ HER2: factor de crecimiento epidérmico humano 2.
- ◆ HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana.
- ◆ IC₅₀: concentración inhibitoria media.
- ◆ MET: transición mesenquimal-epitelial.
- ◆ MMPs: metaloproteinasas de la matriz extracelular.
- ◆ MQ: mefloquina.
- ◆ mTOR: blanco de la rapamicina en mamíferos.
- ◆ MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.
- ◆ OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ◆ PBS: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco.
- ◆ PI3K: fosfatidilinositol-3-cinasa.
- ◆ PR: receptores de progesterona.
- ◆ PX: paroxetina.
- ◆ SFB: suero fetal bovino.
- ◆ TTX: tetrodotoxina.
- ◆ VGSCs: canales de sodio dependientes de voltaje.
- ◆ ZIP: potencia de interacción cero.

3. Resumen

Dentro de los diferentes subtipos de cáncer de mama que afectan a la población se encuentra el cáncer de mama triple negativo, considerado el más agresivo por su alto potencial metastásico. Además, actualmente no existen diagnósticos ni tratamientos estandarizados para este cáncer debido a la falta de un blanco molecular apropiado.

Se ha reportado que los canales iónicos dependientes de voltaje se encuentran expresados de manera aberrante en tejidos tumorales y células cancerígenas, modulando distintos procesos celulares clave para promover la progresión del cáncer, como la proliferación y migración celular, indicando que la sobreexpresión de estas proteínas de transporte podría servir con propósitos de diagnóstico y terapéuticos.

La presente tesis se realizó con el objetivo principal de analizar el efecto de distintos fármacos sobre la viabilidad y migración celular en la línea MDA-MB-231 asociada al cáncer de mama triple negativo. Específicamente se estudió la acción de paroxetina (un antidepresivo) y mefloquina (un antimalárico), con la hipótesis de que ambos inhiben significativamente la viabilidad y migración celular de la línea MDA-MB-231. Además de reportarse que ambos fármacos cuentan con efectos potencialmente anticancerígenos, se ha descrito que paroxetina es capaz de inhibir la corriente de canales de sodio, mientras que mefloquina inhibe la corriente de canales de potasio.

Para evaluar lo anterior, se utilizó el ensayo de viabilidad celular con MTT y los ensayos de migración de cierre de herida y Transwell. Se obtuvo una inhibición dependiente de la concentración en la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 por parte de mefloquina y paroxetina cuando se aplicaron de manera independiente y durante la aplicación combinada de ambos fármacos. Asimismo, mefloquina y paroxetina inhibieron la migración celular de la línea MDA-MB-231 de manera dependiente de concentración. De esta manera, se concluye que ambos fármacos tienen el potencial de combatir la migración del cáncer de mama triple negativo, además de reducir la viabilidad celular, proponiéndose como compuestos de interés para futuras investigaciones en la búsqueda de desarrollar terapias específicas para este subtipo altamente agresivo, con el propósito de contribuir a la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

4. Antecedentes

4.1. Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declara que cáncer, es un término amplio utilizado para aludir a un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos. Otros términos comunes para designar el cáncer son neoplasia y tumor maligno.

El cáncer ocurre debido a una serie de eventos moleculares que suceden en múltiples pasos, y por múltiples factores que involucran interacciones entre los genes y el ambiente de un organismo a través de un proceso llamado carcinogénesis, también conocido como oncogénesis. Este proceso incluye mutaciones y/o epimutaciones, que llevan a una proliferación celular descontrolada y una desregulación homeostática. Las modificaciones que causan el cáncer modulan paso a paso el metabolismo y comportamiento de las células (Diori Karidio & Sanlier, 2021).

La carcinogénesis puede ocurrir en cualquier célula, tejido u órgano, ocasionando variaciones patológicas que resultan en un vasto número de tipos de cáncer. Existen seis mecanismos principales que permiten la progresión de las células de cáncer, y sirven como señales de identidad para las mismas: evasión de la apoptosis, capacidad ilimitada de dividirse, angiogénesis mejorada, resistencia a señales anti crecimiento e inducción de sus propias señales de crecimiento celular, así como la capacidad de hacer metástasis (Łukasiewicz et al., 2021).

Los agentes causantes del cáncer pueden ser varios, incluyendo mutaciones genéticas (mutaciones somáticas, mutaciones heredadas, errores inevitables en la replicación de ADN), epimutaciones (hipometilación de un oncogen, silenciamiento de un gen supresor de tumor a través de hipermetilación), infecciones virales (hepatitis B/C, virus de papiloma humano), entre otros. Además, factores de riesgo exógenos y/o del estilo de vida también podrían favorecer un comienzo temprano de algunos tipos de cáncer (Diori Karidio & Sanlier, 2021).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (2022), el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo; en 2020 ocasionó 10 millones de defunciones, es decir, una de cada seis muertes se debió al cáncer. Los tipos de cáncer más comunes son: de mama (2.26 millones de casos), de pulmón (2.21 millones de casos), colorrectal (1.93 millones de casos), de próstata (1.41 millones de casos), de piel (1.20 millones de casos) y gástrico (1.09 millones de casos).

Los tipos de cáncer que causaron un mayor número de fallecimientos en 2020 según la OMS fueron los siguientes: de pulmón (1.8 millones de defunciones), colorrectal (916,000 defunciones), hepático (830,000 defunciones), gástrico (769,000 defunciones) y de mama (685,000 defunciones) (Organización Mundial de la Salud, 2022).

4.2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una condición patológica que ocurre en el tejido mamario. En la mayoría de los casos, la aparición ocurre desde los conductos de leche, mientras que en otra minoría de los casos ocurre desde los lobulillos. El cáncer de la región ductal se conoce como carcinoma ductal, mientras que aquellos que involucran los lobulillos mamarios se llaman carcinomas lobulillares (Almansour, 2022). El término carcinoma hace referencia a que el cáncer comienza en las células epiteliales, como ocurre en la mayoría de los casos de cáncer de mama. Una menor cantidad de este tipo de cáncer se desarrolla en otros tejidos de la mama, y se denominan sarcomas (Costa et al., 2020).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, es decir, no tiene una causa única; se han identificado una serie de factores que contribuyen en su aparición y desarrollo, como los que se muestran en la Tabla 1. Por ejemplo, entre las mujeres se observa que, conforme se incrementa su edad, hay mayor presencia de tumor maligno de mama; otros factores que pueden influir son el inicio temprano de la menstruación (antes de los 12 años) e inicio tardío de la menopausia (después de los 55 años); antecedentes de cáncer de seno o de ovario; la obesidad y el sobrepeso; el tabaquismo y la ingesta de alcohol; algunas terapias de reemplazo hormonal y ciertos anticonceptivos orales; así como mutaciones genéticas heredadas en los genes BRCA1 y BRCA2 (INEGI, 2021).

Tabla 1. Principales factores de riesgo de padecer cáncer de mama, incluyendo el subtipo triple negativo, de acuerdo a lo reportado por Łukasiewicz et al., 2021.

Factor	Riesgo
Sexo	Ser de sexo femenino constituye uno de los mayores riesgos principalmente por la estimulación potenciada de hormonas como estrógeno.
Edad	El riesgo aumenta con la edad. Sin embargo, el subtipo triple negativo es diagnosticado más comúnmente en grupos menores a 40 años.
Mutaciones genéticas	Existen dos genes principales cuyas mutaciones se asocian fuertemente a la carcinogénesis mamaria, BRCA1 y BRCA2.
Raza/etnia	Generalmente, la incidencia de cáncer de mama es mayor en mujeres blancas no hispánicas, pero las tasas de supervivencia son menores en mujeres hispánicas y mujeres de color.
Historial genético	El riesgo aumenta significativamente conforme aumenta el número de familiares de primer grado que han sido afectados por cáncer.
Medicamentos	Algunos estudios indican que el consumo de ciertos medicamentos como el dietilestilbestrol y las terapias de reemplazo hormonal aumentan el riesgo.
Índice de masa corporal	La obesidad se asocia con una mayor probabilidad de padecer el cáncer y una mayor tasa de mortalidad.
Actividad física	Una actividad física regular es considerada como un factor de protección contra la incidencia de cáncer de mama.
Consumo de alcohol	Un consumo excesivo de alcohol incrementa el riesgo de tumores malignos.
Consumo de tabaco	El consumo de tabaco activo y pasivo promueve la carcinogénesis mamaria.
Dieta	La comida ultra-procesada está clasificada como carcinógeno de grupo 1. El consumo excesivo de grasas saturadas también representa un riesgo.
Exposición a químicos	La exposición crónica a distintos químicos puede promover la carcinogénesis al afectar el microambiente tumoral.

4.3. Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama puede clasificarse en diferentes subtipos moleculares. La división se basa en la expresión de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Categorizándolo en cuatro subtipos principales (Fig. 1) con características diferentes: positivos a receptores de hormonas, que pueden ser luminal A (ER+, PR+, HER2-) o luminal B (ER+, PR+, HER2+/-), enriquecido de HER2 (ER-, PR-, HER2+) y triple negativo (ER-, PR-, HER2-), este último se caracteriza por no contener ninguno de los receptores antes mencionados (Lu et al., 2023).

Se estima que, de todos los casos de cáncer de mama, del 15% al 20% pertenecen al cáncer de mama triple negativo. Este es más común en mujeres premenopáusicas de una edad menor a 40 años y de etnia particular (mujeres afro americanas e hispánicas tienen menor tasa de supervivencia respecto a las caucásicas) (Lastraioli, 2020).

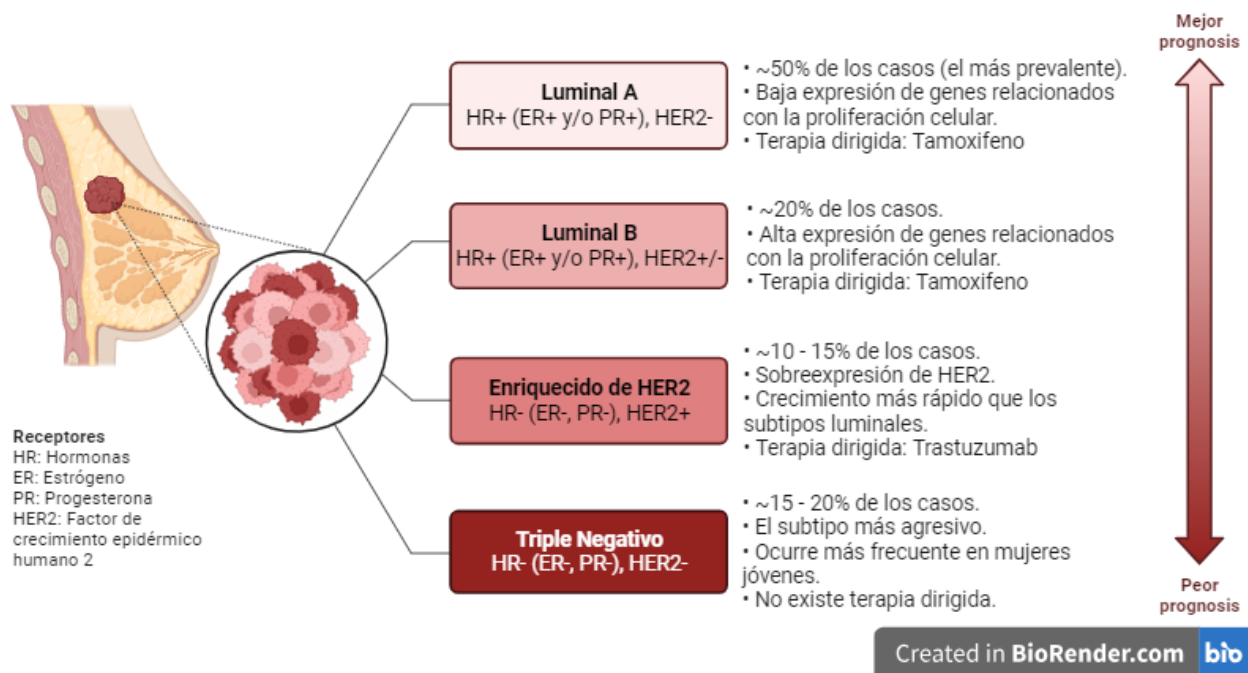


Figura 1. Subtipos moleculares principales del cáncer de mama, conforme a la información presentada por Łukasiewicz et al., 2021.

El subtipo triple negativo es altamente agresivo, con un comienzo a edades más tempranas, menor tasa de detección, mayor potencial metastásico, y un resultado clínico más pobre que aquellos cánceres de mama positivos a receptores de hormonas y HER2 (Won & Spruck, 2020). Este subtipo también representa la mayor dificultad de tratamiento debido a la ausencia de marcadores aptos como receptores de hormonas u otras moléculas, que puedan ser atacadas de manera específica con medicamentos especializados (Lastraioli, 2020).

A pesar de los desafíos que esta conlleva, la cirugía se mantiene como el método tradicional de tratamiento para el cáncer de mama triple negativo; mientras que la quimioterapia es la opción terapéutica primaria. Se ha reportado que pacientes con triple negativo en etapas tempranas o localmente avanzadas responden mejor a la quimioterapia en comparación a los pacientes con otro tipo de cáncer de mama. Asimismo, se ha planteado la quimioterapia auxiliar con agentes citotóxicos de manera postoperatoria para erradicar lesiones cancerosas microscópicas. Sin embargo, es altamente probable que se presente metástasis dentro de pocos meses después de completar la quimioterapia auxiliar (Lu et al., 2023).

Indicadores de prognosis como tamaño de tumor y metástasis del ganglio linfático, son insuficientes para tratamiento personalizado de pacientes con cáncer de mama en etapa temprana (Liu et al., 2022). Un panel más completo y accesible de biomarcadores puede mejorar decisiones en el tratamiento de cáncer de mama triple negativo. Proponer nuevos biomarcadores para predecir la supervivencia y respuesta a quimioterapia en pacientes, podría permitir realizar ajustes personalizados a un régimen estándar de tratamiento, como la escalación de dosis o la incorporación de nuevos agentes antitumorales (da Silva et al., 2020).

Por lo tanto, es esencial identificar biomarcadores moleculares, verificar su utilidad como blancos en el tratamiento personalizado y como indicadores de eficacia clínica (Zhu et al., 2021).

4.4. Migración celular y metástasis

La migración celular se define como el movimiento real de células individuales, láminas de células y cúmulos desde una ubicación a otra. Se han identificado dos tipos principales de migración celular: migración unicelular y migración celular colectiva. La migración celular colectiva es el movimiento coordinado de un grupo de células que mantienen sus conexiones intercelulares y su polaridad colectiva. La migración colectiva se puede manifestar como un movimiento bidimensional a través de una superficie de tejido donde las células migran como una lámina plana en monocapa o como un movimiento tridimensional a través de un andamio de tejido donde las células están organizadas como una red de hebras multicelulares (Grada et al., 2017).

El proceso de metástasis consiste en una serie de eventos de transporte celular, comenzando con las células cancerígenas invadiendo a través de restricciones físicas en el sitio primario, seguido por una migración que atraviesa el endotelio y culminando en la colonización de un tejido secundario (Fig. 2). Las células deben superar barreras estrechas para lograr la migración en varias etapas de la metástasis, como pequeños poros en la matriz extracelular de tejido estromal denso. Un estudio reciente ha demostrado que el potencial metastásico de las células cancerígenas *in vivo* puede estar relacionado con la morfología de esas células en un sustrato en 2D. Este estudio promueve la morfología celular bidimensional, como un posible indicador del potencial metastásico de una célula de cáncer (Wu et al., 2020).

La metástasis puede involucrar una célula individual o un pequeño cúmulo tumoral interactuando y migrando colectivamente. Muchos factores influyen en el número de células que escapan del tumor en el sitio primario. En algunos casos, múltiples células cancerígenas migran juntas con un comportamiento de líder-seguidor. Además, la metástasis puede ocurrir a lo largo de un periodo prolongado durante el cual las células se pueden dividir (Zhang et al., 2021).

Las tasas de crecimiento rápido en el cáncer de mama triple negativo y las prominentes inflamaciones linfoplasmocíticas, debido a las respuestas inmunes del huésped promueven metástasis a los huesos, los pulmones, el hígado y el cerebro (Arroyo-Crespo et al., 2019).

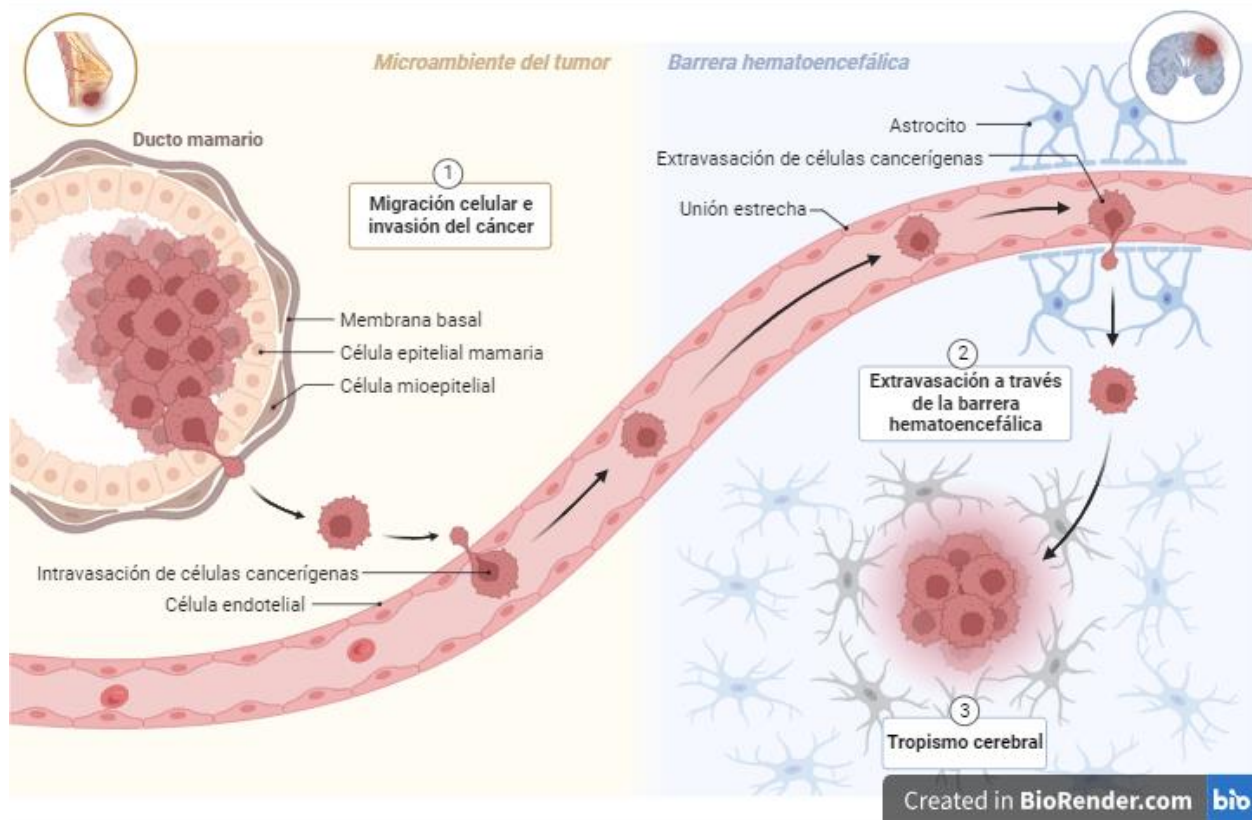


Figura 2. Proceso de metástasis de cáncer de mama al cerebro.

El cáncer de mama es una de las causas más frecuentes de metástasis cerebral, con un estimado de ocurrencia de aproximadamente 5% en poblaciones selectas y de un 15 a 30% en pacientes con enfermedad en etapa IV (Tomasik et al., 2023).

Aunque todos los pacientes con cáncer de mama se encuentran en riesgo de metástasis cerebral, algunos factores que aumentan ese riesgo han sido identificados: pacientes más jóvenes, tumores de alto grado y ciertos subtipos moleculares como el triple negativo (Santos et al., 2020).

Aproximadamente el 30% de la metástasis en el cáncer de mama triple negativo se localiza en el cerebro, tres veces más si se compara con los subtipos de cáncer de mama luminales (positivos a receptores de hormonas) (Hosonaga et al., 2020). Así mismo, el tiempo medio entre el diagnóstico de cáncer de mama y el desarrollo de metástasis cerebral en el subtipo triple negativo es de 28 a 36 meses, similar al subtipo positivo a

HER2 y mucho menor en comparación a los subtipos luminales, que es de 47 a 54 meses (Tomasik et al., 2023). El tiempo medio de supervivencia después de ocurrida la metástasis cerebral es menor a un año, aunque depende de múltiples características clínicas (Bailleux et al., 2021).

Además del cerebro, los pulmones son el sitio más común de metástasis en el cáncer de mama triple negativo (W. Chen et al., 2018). Más del 90% de muertes por cáncer de mama se deben más a la metástasis que al propio cáncer primario (Riggio et al., 2021).

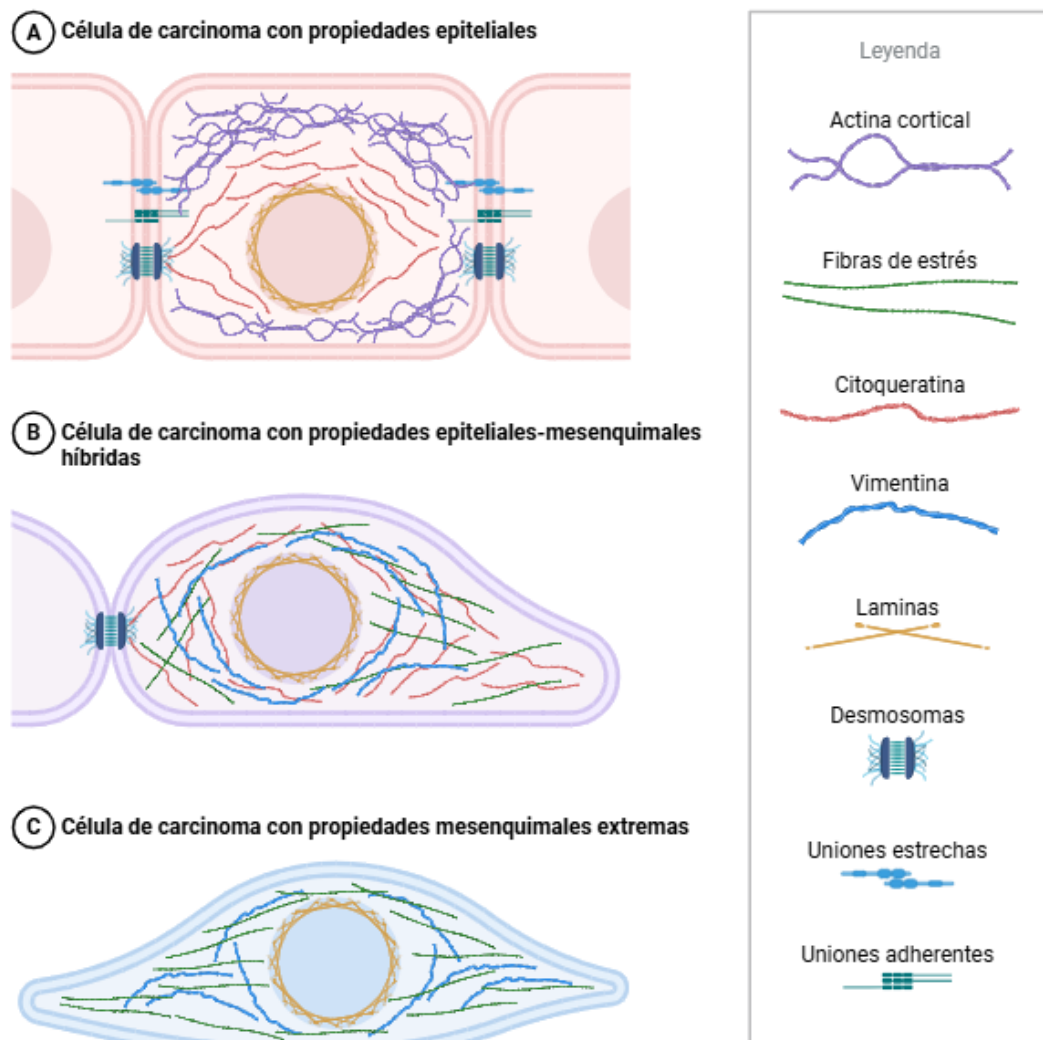
El diagnóstico de metástasis es considerado la fase final en muchos de los tipos de cáncer, esta involucra múltiples mecanismos celulares. Para poder invadir tejidos circundantes, las células de tumores primarios deben experimentar procesos de desdiferenciación o transdiferenciación. En particular, el proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT) está presente en la mayoría de los tipos de cáncer (Park et al., 2022).

La EMT es un evento biológico complejo en el cual las células epiteliales pierden su fenotipo epitelial, junto con su capacidad de adherencia célula-célula y matriz-célula; y obtienen un fenotipo mesenquimal, permitiéndoles realizar migración e invasión. Se han descubierto tres tipos de EMT. La EMT tipo 1 está asociada a la embriogénesis, gastrulación y formación neural; la EMT tipo 2 está ligada a la regeneración de tejido y cierre de heridas. La EMT tipo 3 está relacionada a la malignidad, invasión y metástasis (Buyuk et al., 2022).

Durante la metástasis se requiere una drástica reorganización del citoesqueleto para producir los cambios morfológicos necesarios para promover la movilización de las células tumorales. De manera típica se asocia a la EMT con una transformación morfológica celular de polígono apical-basal a un aspecto fusiforme (Fig. 3), capaz de degradar e invadir la matriz extracelular de tejidos cercanos y distantes (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

Las células tumorales epiteliales usualmente están unidas con las células de su alrededor a través de E-cadherina. E-cadherina es una molécula de adhesión presente en las uniones adherentes que conectan de manera estrecha a las células epiteliales.

Para llevar a cabo la metástasis, las células tumorales rompen las uniones intercelulares, migran como células individuales e invaden los tejidos colindantes. En el proceso de EMT, se ve disminuida la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y citoqueratinas, incluyendo CK18, CK19, laminina, Syndecan-1 y MUC-1; por otro lado, se ve aumentada la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, vimentina, fibronectina, Twist, Snail y Slug (Buyuk et al., 2022).



Created in **BioRender.com** **bio**

Figura 3. Cambios en las propiedades celulares durante la transición epitelial-mesenquimal.

Cuando las células cancerosas que se encuentran migrando a través de los vasos sanguíneos y linfáticos llegan a otros tejidos experimentan una transición mesenquimal-epitelial (MET), el proceso inverso a la EMT, en el cual las células vuelven a adquirir un fenotipo epitelial para formar uniones estrechas en los tejidos distantes (Park et al., 2022).

El proceso de la EMT puede ser progresivo, algunas células que conforman la masa tumoral en la transición pueden expresar marcadores proteicos de ambos fenotipos, epitelial y mesenquimal. Esta plasticidad en la expresión de proteínas está directamente relacionada con la respuesta a tratamientos farmacológicos y el desarrollo de resistencia a los mismos (Navas et al., 2020).

Se ha descubierto que la regulación de la transición epitelial-mesenquimal en el cáncer de mama triple negativo involucra varias vías de señalización, incluyendo el factor de crecimiento β (TGF- β), Wnt/ β -catenina y Notch (Buyuk et al., 2022).

4.5. Ensayos de migración *in vitro*

Analizar la migración colectiva de las células en monocapa de manera bidimensional en condiciones *in vitro* altamente controladas, permite a los investigadores simular y explorar mecanismos críticos de acción involucrados en el proceso, como las interacciones célula-matriz y célula-célula. Lo anterior tiene aplicaciones muy útiles en estudios de detección de genes involucrados en la migración celular del cáncer y el descubrimiento de nuevos fármacos (Grada et al., 2017).

El ensayo de herida provee una manera directa y económica de comprender los mecanismos de acción que regulan la migración celular, así como los efectos de esta bajo diferentes condiciones experimentales *in vitro* (Liang et al., 2007). El ensayo involucra cultivar las células a una alta confluencia, y crear una raspadura al remover una sección de la superficie de la monocapa celular de manera mecánica con una herramienta de punta afilada. Frecuentemente utilizando una punta de micropipeta. Posteriormente, se observan las células en cada borde de la herida, que buscarán migrar

hacia el borde opuesto hasta establecer nuevamente contactos célula-célula para finalmente cerrar el espacio de la raspadura (Fig. 4) (S. Chen et al., 2023).

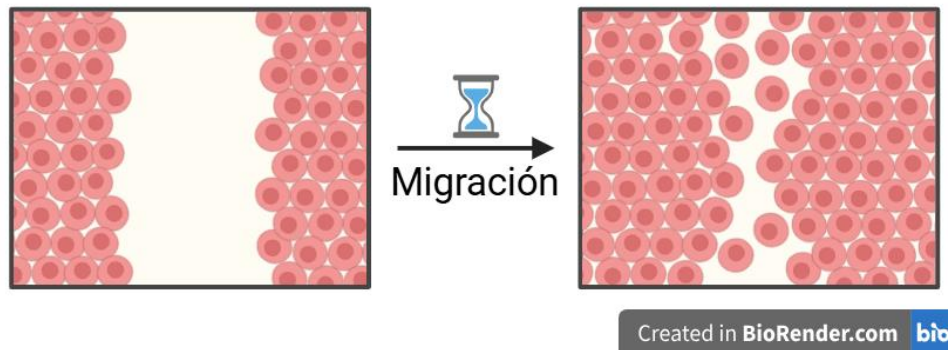


Figura 4. Migración celular en cultivo *in vitro*.

Subsecuentemente, se capturan las imágenes de las células llenando el espacio a intervalos de tiempo regulares y se analizan para cuantificar la migración. El proceso en su totalidad involucra migración y diferenciación celular (Grada et al., 2017).

Por su parte, el ensayo de migración Transwell involucra dos cámaras llenas de medio que son divididas por una membrana porosa. En la parte inferior de la cámara se agrega medio que contenga un agente quimiotáctico, mientras que en la parte superior se agregan las células para establecer un gradiente de quimioatrayente y generar migración celular direccional. Después de un periodo de incubación, el grado de quimiotaxis celular puede ser evaluado por la cuantificación de células adherentes que han migrado al lado basal de la membrana porosa (Justus et al., 2023).

4.6. Línea celular MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 es de tipo epitelial correspondiente a cáncer de mama humano. Fue establecida a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico. Es una línea celular de cáncer de mama triple negativo altamente agresiva e invasiva. Además, es una de las líneas

celulares de cáncer de mama más utilizadas en laboratorios de investigación, y se ha empleado para el desarrollo de medicamentos efectivos para tratar este tipo de cáncer (ECACC, s/f).

4.7. Canales iónicos y su papel en el cáncer

Recientemente se ha demostrado que los canales iónicos dependientes de voltaje se encuentran sobre expresados aberrantemente en tejidos cancerosos no excitables (mama, pulmón, próstata, colon y cérvix), puesto que su expresión es altamente regulada en tejidos no cancerosos del mismo origen. Su expresión en las células de carcinoma ha sido asociada con la progresión del cáncer, sugiriendo que podrían servir como marcadores y factores de pronóstico (Lopez-Charcas et al., 2021). Sin embargo, el rol funcional de los canales iónicos en el cáncer y desarrollo de la metástasis aún no se conoce por completo.

Los canales iónicos son proteínas que se encuentran en la membrana celular y permiten el paso de iones a través de ella de manera selectiva. Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSCs, por sus siglas en inglés), se caracterizaron inicialmente en células excitables, donde son responsables de la generación y propagación de potenciales de acción. Su actividad fisiológica, a través de una corriente transitoria despolarizante de entrada de sodio en células como cardiomiocitos, células del músculo esquelético o neuronas, se distingue por ser la responsable de dar inicio a procesos como la excitación-contracción, excitación-secreción o excitación-expresión. Por lo tanto, estos canales iónicos son críticos en numerosas funciones fisiológicas, y la desregulación de su actividad puede conducir a graves patologías, también conocidas como canalopatías (Lopez-Charcas et al., 2021).

Existen dos compuertas en el canal de sodio, la de activación y la de inactivación. La compuerta de activación se mantiene cerrada en el estado de reposo del canal, se abre rápidamente en respuesta a una despolarización de la membrana (permitiendo la conducción de iones sodio hacia el interior de la célula), y se cierra rápidamente en respuesta a una repolarización. La puerta de inactivación cuenta con una cinética y

dependencia de voltaje diferente a la de activación, manteniéndose abierta en el estado de reposo, cerrándose lentamente durante la despolarización (bloqueando la entrada de iones) y abriéndose lentamente en respuesta a una repolarización (Angus & Ruben, 2019).

La corriente de sodio que atraviesa los canales dependientes de voltaje presenta dos componentes principales: el componente transitorio, responsable del flujo rápido de sodio hacia el interior de las células durante los potenciales de acción, y el componente persistente, el cual representa una pequeña fracción del componente transitorio (aproximadamente 10%) que muestra poca o nula inactivación. Esta última es relevante en aquellos casos donde se necesita una baja pero constante afluencia de sodio para facilitar la generación de potenciales de acción, como en las neuronas de activación repetitiva (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

Los canales de sodio dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad α , formadora de poro, la cual consiste en cuatro dominios (I, II, III y IV) cada uno con seis segmentos transmembranales, S1-S6. Los segmentos S1-S4 sirven como el sensor de voltaje, mientras que los segmentos S5 y S6 forman las paredes internas del poro del canal. El conector entre los dominios III y IV es la puerta de inactivación rápida, que opera como una tapa con bisagras para inactivar el canal rápidamente después de ser abierto. El movimiento de S4 es el responsable de la apertura del poro del canal y causa la activación del mismo. En respuesta a la despolarización de membrana, un segmento S4 de cada uno de los dominios se mueve hacia afuera (Angus & Ruben, 2019).

Hasta el momento, nueve subunidades α de canales de sodio dependientes de voltaje de mamíferos, Nav1.1 a Nav1.9, codificadas por los genes SCN1A-SCN5A y SCN8A-SCN11A, han sido identificadas y caracterizadas. Estos diferentes canales de sodio tienen estructuras y propiedades funcionales similares, pero su expresión es específica para cada tipo celular, y presentan distintas características regulatorias y farmacológicas (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

La subunidad α puede ser expresada por sí misma para producir un canal funcional, sin embargo, puede estar acompañada de dos subunidades auxiliares β que son importantes en la cinética de activación. Existen cuatro subunidades β (Nav β 1-Nav β 4),

su expresión incrementa las tasas de activación e inactivación, y también se ha descubierto que aumentan en gran medida la expresión del canal en la membrana. Las subunidades β también pueden funcionar como moléculas de adhesión celular y se ha demostrado que tienen un papel en la migración y agregación celular (Angus & Ruben, 2019).

La sobreexpresión de canales de sodio dependientes de voltaje se ha visto involucrada en la motilidad direccional, actividad secretora de membrana, adhesión e invasión de las células de distintos tipos de cáncer (Erdogan et al., 2023). Hay un incremento substancial en evidencias de expresión de VGSCs en tumores *in vivo*, incluyendo tejidos humanos (Djamgoz et al., 2019). Una alta expresión se ha correlacionado con la recurrencia del cáncer, desarrollo de metástasis y una reducida supervivencia del paciente (Lopez-Charcas et al., 2021). Sin embargo, esta correlación no indica el mecanismo de acción, lo que incrementa la necesidad de investigación al respecto.

En cuanto a la proliferación celular, el mecanismo molecular que vincula este fenómeno con los canales de sodio no es completamente claro, pero parece estar relacionado con una mayor respuesta a hormonas y/o factores de crecimiento. Una estrecha relación entre varias de estas moléculas y los VGSCs ha sido reportada, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento semejante a insulina, el factor de crecimiento nervioso, β -estradiol y dihidrotestosterona (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

Distintas isoformas de canales de sodio dependientes de voltaje se encuentran sobre expresadas en varios tipos de cáncer. En muestras de cáncer de mama, el canal Nav1.5, codificado por el gen SCN5A, se muestra sobre expresado en comparación con los tejidos normales (Lopez-Charcas et al., 2021). Además, dentro del conjunto de tipos de cáncer de mama, los niveles de expresión de Nav1.5 en la línea celular MDA-MB-231 (triple negativo), altamente metastásica, son significativamente mayores que en la línea celular MCF-7 (positivo a hormona), la cual es débilmente metastásica (Luo et al., 2020).

El canal Nav1.5 funciona como desencadenante de una variedad de mecanismos en las células de cáncer de mama que regulan la capacidad metastásica e invasiva de las mismas, siendo un indicador de mala prognosis. Esto es demostrado por varios estudios,

donde se ha visto que existe sobreexpresión del gen SCN5A en muestras de tumores de individuos que presentaron recurrencia, y fallecieron dentro de 5 años después de su diagnóstico (Erdogan et al., 2023).

Específicamente, el canal nNav1.5, una variante de empalme neonatal que muestra un reemplazo de siete aminoácidos dentro del tercer y cuarto segmento del primer dominio del canal (DI:S3), comparada con su forma adulta (Nav1.5), es la isoforma predominante de canal de sodio dependiente de voltaje encontrada en biopsias de tumores altamente malignos, y en células de cáncer de mama metastásicas; mientras que no parece estar expresada en tejidos humanos saludables (Dutta et al., 2018). Esto fue demostrado en el estudio de Yamaci et al., (2017), en el que se encontró que la expresión de nNav1.5 es significativamente mayor, en intensidad y extensión, en el cáncer de mama en comparación a tejidos no tumorales. Es por esto que se le atribuye a la forma neonatal el alto potencial metastásico de las células de cáncer.

Estas dos variantes presentan diferentes propiedades electrofisiológicas en términos de sensibilidad de voltaje y cinética de corriente, resultando en un aumento del flujo de entrada de corriente de sodio por parte de la forma neonatal (Lopez-Charcas et al., 2021). Los determinantes moleculares para la expresión anormal de la variante nNav1.5 en células de cáncer no han sido identificados, pero esta expresión coincide con el hecho de que el cáncer es un padecimiento no diferenciado y que algunos genes cancerígenos son oncofetales (Erdogan et al., 2023).

Es posible que la sobre expresión espontánea de los canales de sodio dependientes de voltaje en tejidos donde normalmente no se expresan, se deba a cambios drásticos en la regulación epigenética de las células de cáncer; ya que los cambios genéticos son una causa ampliamente aceptada de carcinogénesis (Angus & Ruben, 2019).

En una situación normal, los canales de sodio dependientes de voltaje se abren e inactivan dentro de pocos milisegundos después de la despolarización de la membrana (Fig. 5), sin embargo, se ha descrito que en las células de cáncer de mama, el nNav1.5 permanece en un estado parcialmente activado, y no en el estado inactivado que normalmente poseen durante el potencial de membrana en reposo de las células; resultando en un flujo de entrada permanente de iones sodio (llamada ventana de

corriente). Y se ha postulado que, esta actividad constante es la encargada de elevar la proteólisis de la matriz extracelular y la invasión de la célula de cáncer (Erdogan et al., 2023).

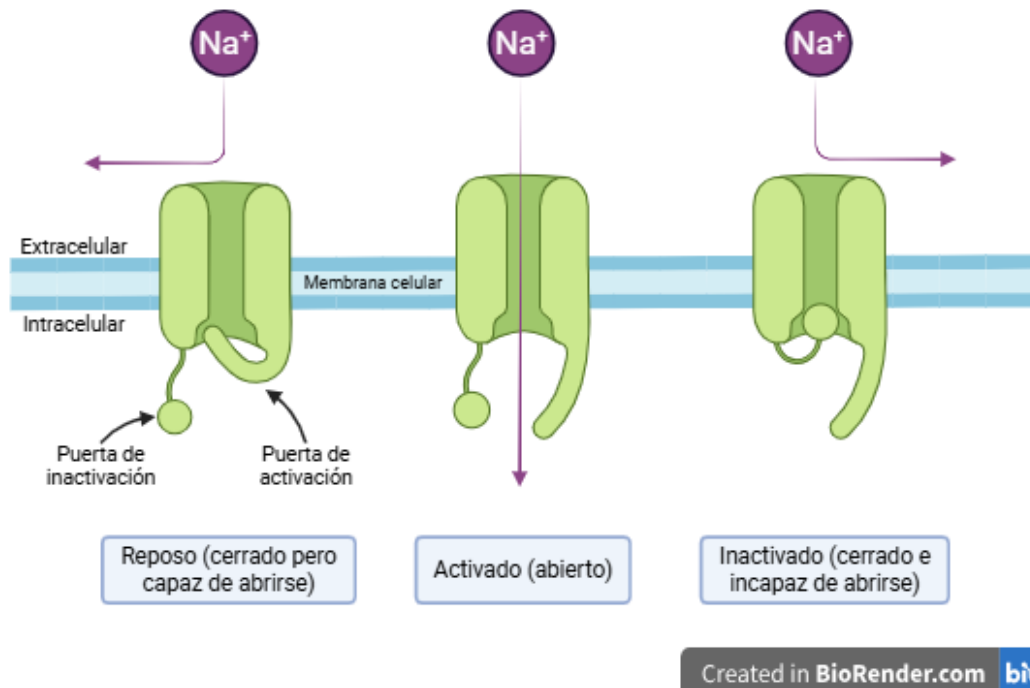


Figura 5. Estados en los que se pueden encontrar los canales de sodio dependientes de voltaje.

Actualmente se conoce que las células de cáncer generalmente poseen un potencial de membrana más despolarizado respecto a los tejidos normales, este potencial de membrana despolarizado por sí mismo juega un papel importante en la progresión del ciclo celular, la síntesis de ADN, mitosis, proliferación, migración y diferenciación. Diversos estudios han demostrado que la concentración intracelular de sodio es mayor en células de cáncer comparadas con células no tumorales, y esta concentración aumentada está relacionada con la oncogénesis. Además, se ha propuesto que el componente persistente de la corriente de sodio es el principal responsable del incremento en la concentración de sodio intracelular (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

A nivel tisular, una concentración elevada de sodio intracelular promueve la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer; mientras que una concentración elevada de sodio extracelular induce un microambiente inflamatorio que favorece la progresión de tumores (Leslie et al., 2019).

En los últimos años, se ha trabajado específicamente la reducción de la expresión y actividad de los canales Nav1.5, en la búsqueda de un blanco ideal para el tratamiento contra el cáncer de mama; para esto, se han utilizado toxinas naturales y agentes farmacológicos (Luo et al., 2020).

Experimentos llevados a cabo en cáncer de mama utilizando tetrodotoxina (TTX), un bloqueador selectivo de canales de sodio, mostraron una reducción en la extensión celular, galvanotaxis, endocitosis, migración e invasión celular (Angus & Ruben, 2019).

A nivel molecular, se ha mostrado que la EMT está controlada por factores de transcripción como SNAIL y ZEB. En este aspecto, se ha descubierto que la actividad de los canales Nav1.5 puede inducir la expresión de los factores de transcripción SNAI1 y ZEB1 en el cáncer de mama; y que una reducción en la actividad de este canal puede revertir el fenotipo mesenquimal (Gradek et al., 2019).

Además, considerando que la adhesión y desprendimiento de la matriz extracelular y de las células vecinas por parte de las células de cáncer es una etapa crucial en la EMT, diversos estudios con dicho enfoque concluyeron que un tratamiento con TTX incrementa la adhesión celular en las células de la línea MDA-MB-231 y en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), ambas expresando VGSCs funcionales, sugiriendo que la actividad de los canales modula la adhesión celular (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

Un análisis reciente mostró que la subunidad Nav β 4 puede participar en el mantenimiento del fenotipo epitelial en células mamarias, debido a que su desregulación promueve una pérdida completa de la organización epitelial. Este efecto fue asociado con un incremento en la degradación de β -catenina, una expresión reducida de E-cadherina, y una inducción de marcadores mesenquimales como N-cadherina, vimentina y α -SMA. Con esta evidencia experimental, los autores llegaron a la conclusión de que

una reducción en la función de la subunidad $\beta 4$ podría ser un paso determinante en la carcinogénesis temprana (Doray et al., 2021).

Las células utilizan endocitosis para diversas funciones, incluyendo la modulación de respuestas a factores de crecimiento, así como la regulación en la expresión de canales iónicos, receptores y transportadores en la membrana plasmática. Como consecuencia de la alteración genética generada en la oncogénesis, distintos tipos de cáncer muestran expresiones anormales y mutaciones de proteínas relacionadas a la endocitosis, incluyendo receptores de membrana, pequeñas GTPasas que controlan el reciclaje de vesículas, y otros componentes de los mecanismos reguladores. Esta actividad endocítica aumentada está relacionada a la presencia de VGSCs en cáncer metastásico de mama, próstata y pulmón. En las células MDA-MB-231 se realizaron mediciones por captación de peroxidasa de rábano picante y se observó que la actividad endocítica se redujo en presencia de TTX, así como por la eliminación del sodio extracelular (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

Una etapa crucial en la progresión de la metástasis se encuentra en la capacidad de las células de cáncer de degradar la matriz extracelular, permitiendo la invasión a través del tejido adyacente. Esta actividad proteolítica está mediada por diferentes enzimas llamadas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), las cuales llevan a cabo la degradación de proteínas presentes en la matriz extracelular. Se ha encontrado que las MMPs están sobre expresadas y/o sobre activadas en casi todos los tipos de cáncer si se compara con tejidos normales, regulando una variedad de comportamientos celulares, incluyendo crecimiento celular, migración, invasión, inmunovigilancia y angiogénesis. La actividad de las MMPs está regulada por complejos mecanismos; en el caso del cáncer de mama, esta actividad se ha correlacionado con la actividad de canales de sodio dependientes de voltaje (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

En las células MDA-MB-231, un tratamiento con TTX durante 24 horas redujo significativamente los niveles de ARNm de MMP-9. Por otro lado, al utilizar un modelo de xenoinjerto ortotópico, el número de células de MDA-MB-231 que expresan MMP-9 se vio significativamente disminuido en tumores animales tratados con fenitoína, un bloqueador de VGSCs (Nelson et al., 2015).

Los podosomas son estructuras que permiten a ciertos tipos de células migrar e invadir a través de los tejidos al formar protrusiones ricas en actina en el borde delantero de la célula, y romper los componentes de la matriz extracelular mediante la secreción de MMPs, facilitando el desprendimiento celular y la reconfiguración del citoesqueleto para impulsar el movimiento celular. Algunas de las células capaces de formar podosomas son las células microgliales en el sistema nervioso central y los macrófagos en el resto del cuerpo. Estas células contribuyen a la respuesta inmune al moverse rápidamente a través de los microambientes de tejido para eliminar restos celulares y agentes infecciosos. Los podosomas son estructuras dependientes de los VGSCs, estos canales se encuentran de manera abundante en las membranas podosomales, con un posible rol en la invasión celular (Angus & Ruben, 2019).

Durante el proceso de invasión, las células de cáncer desarrollan regiones protuberantes especializadas en la membrana y, debido al gran parecido en estructura y componentes con los podosomas, estas estructuras se han identificado como invadosomas o invadopodios. La actividad funcional de los VGSCs promueve cambios en la fisiología celular, lo cual activa el movimiento direccional celular iniciado por los invadopodios en las células de cáncer al inicio del proceso metastásico. La afluencia de sodio a través de los VGSCs está acoplada a la actividad de otras proteínas localizadas en balsas lipídicas que potencian la reorganización del citoesqueleto, el desprendimiento celular de la matriz extracelular y la invasión de tejidos circundantes y distantes (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

El bloqueo de los canales Nav1.5 suprime la activación de Rac1, reduce la reorganización del citoesqueleto y la migración celular, mostrando un vínculo entre los cambios eléctricos en la membrana plasmática y la reorganización del citoesqueleto, conectando con la adquisición del fenotipo celular mesenquimal y el comportamiento metastásico (Yang et al., 2020).

Las investigaciones en el rol mecánico de nNav1.5 en la metástasis revelan que el nNav1.5 y el intercambiador de Na^+/H^+ tipo 1 (NHE1), uno de los principales reguladores de la salida de iones hidrógeno en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, se encuentran localizados en las estructuras invasivas de las células (invadopodios). El

nNav1.5 incrementa la actividad del NHE1, promoviendo la salida de H⁺ y acidificando el pH extracelular. Debido a la acidez del medio, se activan las catepsinas que inducen la proteólisis de la matriz extracelular y así se incrementa la capacidad de invasión de las células (Erdogan et al., 2023).

En las células de MDA-MB-231, la interacción física entre Nav1.5, NHE1 y caveolina-1 en los invadopodios se ha mostrado por medio de ensayos de inmunoprecipitación. La activación de Nav1.5 incrementa la actividad de la quinasa Src, modifica la polimerización de F-actina y, por consiguiente, la regulación de la formación de invadopodios (Sanchez-Sandoval et al., 2023).

Además de los canales de sodio, también se ha estudiado la relación de los canales de potasio con el cáncer. Los canales de potasio son proteínas complejas que forman poros selectivos para la conducción de iones potasio (K⁺) en las membranas biológicas, son críticos en la homeostasis de K⁺, regulación del volumen celular, establecimiento de potenciales de reposo de membrana, liberación de neurotransmisores y regulación de la excitabilidad en neuronas y tejido muscular (Zúñiga et al., 2022).

Los canales de potasio pueden dividirse en cuatro tipos: rectificadores de entrada (Kir), canales de dominio de doble poro (K2p), canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) y canales de potasio activados por calcio y sodio (K_{Ca} y K_{Na}) (Sun et al., 2023).

Se ha hipotetizado que existe una relación entre la sobreexpresión de canales de potasio y la generación, así como el crecimiento, de tumores malignos; también se les ha asociado a procesos como proliferación celular, apoptosis y diferenciación celular (Zúñiga et al., 2022). Un gran número de estudios ha demostrado que la progresión del cáncer de mama está estrechamente relacionada con una variedad de canales de potasio, ya que se ha reportado la sobreexpresión de estos en tumores de mama, y se han vinculado con la pobre prognosis de los pacientes (Hou et al., 2021).

La familia de los canales de potasio dependientes de voltaje es la más numerosa entre todos los tipos, contando con funciones relevantes en varios procesos celulares y fisiológicos. Además, se han visto implicados en propiedades del cáncer como proliferación celular, progresión y migración (Zúñiga et al., 2022).

Los canales Kv1.3, miembros de la familia dependiente de voltaje y codificados por el gen KCNA3, cuentan con un papel clave en diferentes procesos como la proliferación celular, apoptosis, establecimiento del potencial de reposo en la membrana celular y en la regulación del volumen celular. Asimismo, se ha asociado a los canales Kv1.3 con una baja prognosis en pacientes con cáncer de mama (Lastraioli, 2020).

Los canales Kv3.4 y Kv3.1 son conocidos por ser sensores de oxígeno, y su función en la hipoxia ha sido ampliamente investigada. Estos canales están relacionados con la hipoxia de los tumores, y se encuentran involucrados en la migración e invasión de las células de cáncer MDA-MB-231. Otro conjunto de experimentos ha demostrado una expresión variada de canales Kv4.1 dependiendo de la fase del tumor en tejidos de cáncer de mama (Zúñiga et al., 2022).

Se han encontrado altos niveles de la proteína Kv10.1, perteneciente a los canales dependientes de voltaje y codificada por el gen KCNH1, en cánceres de mama humanos. El canal Kv10.1 se encuentra altamente sobre expresado en el cáncer de mama triple negativo con respecto a otros subtipos moleculares, asociándose con la etapa y tamaño del tumor, así como con las variaciones del ganglio linfático (Lastraioli, 2020).

También se ha observado la sobreexpresión de los canales Kv11.1 en células de cáncer de mama. Los canales Kv11.1 cuentan con un papel clave en el ciclo celular, actuando como reguladores de la apoptosis y proliferación celular en el cáncer (Zúñiga et al., 2022).

De esta manera, diferentes estudios han demostrado la posibilidad de utilizar los canales iónicos como blancos terapéuticos. Se ha experimentado con la combinación de bloqueadores de canales específicos y medicamentos que se utilizan actualmente en el área clínica; un ejemplo de ello es la inhibición de las corrientes de Kv10.1 causada por cloroquina, un fármaco utilizado para el tratamiento de la malaria que se ha investigado por sus efectos antitumorales, esta inhibición ha logrado reducir la migración celular en la línea celular MDA-MB-231 (Valdés-Abadía et al., 2019).

4.8. Combinaciones terapéuticas en el cáncer

Una amplia variedad de transportadores iónicos se expresa en células y tejidos de cáncer, contribuyendo de manera dinámica en las diferentes fases del proceso de este, desde la actividad proliferativa inicial hasta la invasión y metástasis. Estos transportadores o canales iónicos ofrecen ventajas significativas como posibles blancos clínicos anticancerígenos, debido a que su farmacología y atributos funcionales son bastante comprendidos. Lo anterior está generando posibilidades de tratamientos novedosos, a menudo no invasivos y con mínimos efectos secundarios (Djamgoz, 2022).

La readaptación de fármacos se refiere a la identificación de nuevas indicaciones para drogas ya existentes, y ofrece ventajas sobre el descubrimiento de drogas desde cero, incluyendo el uso de compuestos no riesgosos, cronogramas de desarrollo más cortos, y potencialmente costos generales de desarrollo más bajos. Estas ventajas convierten a la readaptación de fármacos en una estrategia atractiva para el tratamiento de enfermedades, incluyendo los tumores y el cáncer (Song et al., 2022).

En el caso de los canales iónicos, ya se encuentra disponible una amplia serie de agentes moduladores de mecanismos iónicos (bloqueadores/inhibidores o activadores) que pueden ser empleados contra varios mecanismos del proceso cancerígeno. De hecho, alrededor del 15% de los fármacos utilizados actualmente dirigen su efecto a los transportadores iónicos, y estos podrían ser readaptados como fármacos para combatir el cáncer, aprovechando las ventajas clínicas de contar con una farmacocinética y seguridad conocidas (Djamgoz, 2022).

Las modalidades clínicas de tratamiento que se emplean actualmente contra el cáncer (cirugía, quimioterapia, radioterapia) pueden ser más efectivas con la combinación de moduladores de mecanismos iónicos, aumentando la eliminación de las células cancerígenas, de modo que potencialmente mejorarían los resultados de los pacientes. Las combinaciones que involucren a los moduladores de mecanismos iónicos también pueden suprimir algunos de los efectos secundarios no deseados de los tratamientos, así como evitar el desarrollo de resistencia contra los mismos. Además, debido a que estos agentes pueden servir como fármacos anticancerígenos, las combinaciones terapéuticas pueden ser triplemente beneficiosas (Djamgoz, 2022).

4.9. Paroxetina como posible auxiliar en el tratamiento de cáncer

La paroxetina (PX) es un antidepresivo que pertenece al grupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. Es un medicamento indicado para el tratamiento de una variedad de trastornos de ansiedad, incluyendo el trastorno de ansiedad generalizada, el trastorno obsesivo-compulsivo, el trastorno depresivo mayor, trastorno disfórico premenstrual, trastorno de estrés postraumático, trastorno de pánico y trastorno de ansiedad social (Kowalska et al., 2021).

Se ha reportado en la literatura una estrecha relación entre los antidepresivos y la disfunción de canales iónicos cardiacos. En el caso de la paroxetina, se ha establecido un efecto inhibitor en la función de los canales de sodio neuronales Nav1.4, Nav1.7 y Nav1.8. Además, un estudio de Pliijter y colaboradores obtuvo como resultado que la paroxetina inhibe la densidad de corriente pico del canal de sodio Nav1.5 en células HEK-293, de manera dependiente de concentración con una IC_{50} de 6.8 μ M. La paroxetina inhibe la corriente del canal Nav1.5 al cambiar su inactivación de estado estable hacia potenciales más hiperpolarizantes y aumenta la tasa de inactivación de manera dependiente de concentración (Pliijter et al., 2023).

Por otro lado, un estudio de Hwang y colaboradores demostró que la paroxetina reduce las corrientes pico de los canales de potasio humanos Kv1.3 de manera dependiente de concentración con una IC_{50} de 53.9 μ M, en ovocitos de *Xenopus laevis* que fueron inyectados con cARN que codifica los canales humanos Kv1.3 (Hwang et al., 2021). La investigación de Lee (2016) reportó que paroxetina inhibe la corriente de los canales Kv1.5 de manera dependiente de concentración. De igual manera, en otra publicación demostró que paroxetina inhibe la corriente de los canales Kv3.1, actuando como un bloqueador de canal abierto (Lee et al., 2018).

En cuanto a su relación con el cáncer, se ha descubierto que paroxetina promueve la apoptosis en células de cáncer de pulmón al bloquear el flujo de la autofagia e inducir la fragmentación de mitocondrias. Paroxetina induce la muerte celular por medio de canales de calcio tanto en células OC2 de cáncer oral como en células PC3 de cáncer de próstata. Aunado a esto, la paroxetina también causa la apoptosis en células de cáncer

de mama humano MCF-7 al incrementar el calcio (Ca^{2+}) extracelular o generar disfunción mitocondrial e inhibir canales de potasio (Song et al., 2022).

Otra investigación reveló que paroxetina disminuye la viabilidad celular de manera concentración-dependiente en las células de cáncer de colon humano HCT116 y HT29, con una IC_{50} de 26.49 μM (24h) y 13.50 μM (48h) en las células HCT116 y una IC_{50} de 14.22 μM (24h) y 7.01 μM (48h) en las células HT29 (Jang et al., 2019).

Un estudio reciente mostró que paroxetina inhibe la proliferación celular de dos líneas celulares correspondientes al cáncer de mama triple negativo, 4T1 y MDA-MB-231, con una tendencia dependiente de concentración, determinando las IC_{50} a 24h, 48h y 72h: 19.44 μM , 13.34 μM y 7.63 μM para 4T1 y 22.3 μM , 19.38 μM , y 7.88 μM para MDA-MB-231, respectivamente (Huang et al., 2024).

Sin embargo, se desconoce el impacto que la paroxetina tiene en los procesos de migración y viabilidad celular de líneas tumorales asociadas al cáncer de mama triple negativo por lo que, tomando como antecedentes los estudios anteriormente mencionados y recordando que el cáncer de mama triple negativo cuenta con una alta expresión de canales Nav1.5 y canales Kv1.3, es relevante seguir estudiando los procesos celulares antes descritos en busca de una respuesta que permita describir con detalle las interacciones entre el fármaco, los canales y las células cancerígenas, y así proponer opciones terapéuticas coadyuvantes.

Además de lo anterior, en algunas pruebas clínicas, los antidepresivos han demostrado ser efectivos contra desórdenes mentales en pacientes que han sido tratados con quimioterapia (Zheng et al., 2023). Esto indica la importancia de los antidepresivos en el tratamiento de cáncer desde otra perspectiva.

4.10. Mefloquina y su potencial para combatir el cáncer

La mefloquina (MQ) es un agente antimalárico derivado del 4-aminoquinolina-metanol, que está químicamente relacionado con la quinidina. La mefloquina es el fármaco de elección para el tratamiento de la malaria de *Plasmodium falciparum* resistente a

cloroquina. Las quinolinas son medicamentos con una gran variedad de efectos secundarios, incluyendo alteraciones neuropsiquiátricas y gastrointestinales, así como anomalías del sistema de conducción cardíaco (Perez-Cortes et al., 2015).

La mefloquina también actúa como un inhibidor de amplio espectro de varios receptores y transportadores de la membrana celular. Los bloqueos de canales de membrana causados por la mefloquina resultan principalmente en irregularidades del flujo de iones y pequeñas moléculas a través de la membrana, ocasionando la despolarización de la misma. Varios canales de potasio son ubicuamente inhibidos por la mefloquina. El canal de potasio dependiente de voltaje Kv4.2 es uno de ellos, además de los canales de potasio cardíacos KvLQT1/mink, HERG (Kv11.1) y los canales de potasio dependientes de ATP (complejo K_{ATP}) (Ghosh et al., 2021).

Un estudio demuestra que la mefloquina a concentraciones en el rango de 2.5 μ M a 15 μ M presenta una pronunciada actividad citotóxica en células de cáncer de mama positivas a estrógeno, triple negativas y resistentes a fármacos, indicando que este agente debería ser evaluado para su inclusión en terapias dirigidas a estos tipos de cáncer (Sharma et al., 2012). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar ensayos específicos para determinar con mayor exactitud su efecto en la actividad celular del cáncer de mama triple negativo.

5. Planteamiento del problema

El cáncer de mama se origina a partir del crecimiento descontrolado e independiente de un grupo de células, las cuales forman un tumor maligno que puede invadir tejidos circundantes y también órganos distantes (metástasis). La Organización Mundial de la Salud lo reconoce como el tipo de cáncer más común en el mundo.

De acuerdo con la OMS, en 2020, en todo el mundo se diagnosticó cáncer de mama a 2.3 millones de mujeres, y 685,000 fallecieron por esa enfermedad. A fines del mismo año, 7.8 millones de mujeres a las que en los anteriores cinco años se les había diagnosticado cáncer de mama seguían con vida, lo que hace que este cáncer sea el de mayor prevalencia en el mundo. Se estima que, a nivel mundial, los años de vida perdidos ajustados en función de la discapacidad (AVAD) en mujeres con cáncer de mama superan a los de otro tipo de cáncer. Se ha reportado que el cáncer de mama afecta a las mujeres de cualquier edad después de la pubertad en todos los países del mundo, pero las tasas de incidencia aumentan en su vida adulta (Organización Mundial de la Salud, 2021).

En México, durante 2022, se registraron 23,790 nuevos casos de cáncer de mama en la población mayor a 20 años de edad. La tasa de incidencia de tumor maligno de mama a nivel nacional fue de 27.64 casos nuevos por cada 100 mil habitantes mayores a 20 años.

La distribución de casos nuevos de tumor maligno de mama entre las mujeres de 20 años o más por entidad federativa para 2022, mostró que Baja California se encuentra en el estrato con la incidencia más alta, de 85.41 a 165.87 casos nuevos por cada 100 mil mujeres de 20 años o más (INEGI, 2023).

En México, según las cifras preliminares de 2023, por tumores malignos fallecieron 89,633 personas de 20 años y más. De estas, 8,034 fueron por tumores malignos de mama, lo que equivale a 9% del total. A nivel nacional, la tasa de mortalidad por cáncer de mama fue de 17.9 defunciones por cada 100 mil mujeres mayores a 20 años de edad. Baja California se encuentra entre los estados con las tasas más altas de defunciones (21.0 por cada 100 mil mujeres) (INEGI, 2024).

El cáncer de mama triple negativo, el cual es el enfoque principal de este estudio, es un subtipo molecular que se caracteriza porque no posee ninguno de los receptores que se han descrito en el cáncer de mama (receptores de estrógeno, receptores de progesterona y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano 2). El cáncer de mama triple negativo representa entre el 15 y 20% de los nuevos casos diagnosticados de cáncer de mama, con un ambiente molecular bastante complejo, bajas tasas de detección, una naturaleza agresiva y altamente proliferativa, así como una prognosis pobre. Las rápidas tasas de crecimiento de este subtipo de cáncer promueven metástasis a los pulmones, el hígado y el cerebro, favoreciendo la recurrencia en los pacientes, agravando su situación clínica e impactando de manera negativa en las tasas de supervivencia (Arroyo-Crespo et al., 2019).

El cáncer de mama triple negativo actualmente carece de un blanco terapéutico apropiado, y las estrategias que se utilizan para combatirlo han generado respuestas muy variadas entre los pacientes. Adicionalmente, no existe un tratamiento estandarizado para el cáncer de mama triple negativo metastásico.

La quimioterapia es el tratamiento más común, pero inefectivo con el paso del tiempo, ya que la recurrencia de los tumores es muy probable. En pacientes diagnosticados con cáncer de mama triple negativo, el tiempo promedio de relapso es de aproximadamente 19 a 40 meses, con una tasa de muerte del 75% durante los primeros 3 meses después del relapso (Yin et al., 2020). Por lo tanto, existe la necesidad de investigar y proponer nuevos tratamientos altamente efectivos, o bien, desarrollar terapias complementarias que permitan evitar la progresión del cáncer de mama y así disminuir la probabilidad de metástasis. Para ello, es importante conocer los factores determinantes que desencadenan esta patología y centrar proyectos de investigación en la búsqueda de biomarcadores que sirvan como blanco para la detección temprana de este cáncer; con la finalidad de reducir las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad en la población, mejorando su calidad de vida.

6. Justificación

A lo largo de la última década se han incrementado en gran medida el número de casos nuevos de cáncer de mama en todo el país y, al mismo tiempo, han aumentado las tasas de mortalidad en las mujeres mexicanas a causa de este tipo de tumores, siendo una de las principales razones de fallecimiento en la población femenina mayor a 20 años. Si se analiza la información por entidades federativas, Baja California se encuentra en el grupo de estados con las mayores tasas de incidencia de cáncer de mama y en el segundo grupo con más tasas de defunción debido a esta enfermedad, dejando en claro que esta zona del país es una de las más afectadas. Lo anterior demuestra la fuerte relación entre las prioridades de la región y el tema principal de esta investigación, el cáncer de mama, ya que la salud de la población es uno de los asuntos más importantes dentro de un país.

Con la investigación planteada en este trabajo se busca expandir el conocimiento acerca del cáncer de mama, específicamente del subtipo triple negativo, ya que su naturaleza altamente agresiva representa una amenaza no sólo para las personas que están diagnosticadas con este padecimiento sino también para la población en general. La información que se tiene acerca de este cáncer sigue siendo muy escasa, principalmente en lo que concierne a estrategias terapéuticas y de eficaz detección que permitan prevenir o detener la migración de las células tumorales, por lo que existe una gran necesidad de investigación al respecto.

Asimismo, distintos trabajos de investigación han reportado la importancia de los canales iónicos dependientes de voltaje en procesos de migración y metástasis celular; y se ha planteado que pueden ser un elemento clave en el desarrollo de estrategias terapéuticas para evitar el estado invasivo del cáncer, y por ende combatir la migración de las células del cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, aún no se conoce por completo la relación entre los canales iónicos y la progresión de esta patología. Por lo tanto, trabajos enfocados en dilucidar el papel funcional de este tipo de proteínas integrales de membrana, representan una alternativa esencial en la búsqueda de tratamientos coadyuvantes cruciales en la progresión y capacidad de metástasis de la enfermedad. De esta manera, el conocimiento que se obtendrá como resultado de este estudio tiene como finalidad aportar a esa búsqueda, una respuesta eficaz contra el cáncer de mama

triple negativo, teniendo como objetivo el desarrollo de terapias auxiliares a los métodos universalmente utilizados como la quimioterapia. Igualmente, se plantea contribuir en la búsqueda de potenciales biomarcadores que permitan una detección temprana del cáncer de mama triple negativo, e incluso impulsen el desarrollo de tratamientos que se dirijan específicamente a estos blancos; con lo que se podría atacar de manera más directa este padecimiento.

Los resultados obtenidos al final de la investigación podrán ser utilizados para su divulgación científica a manera de artículo o presentación para dar a conocer los hallazgos conseguidos, y así sentar bases para futuros proyectos que tengan relación con el tema. La información podrá ser aprovechada para profundizar en el desarrollo de las terapias del cáncer de mama triple negativo y sobre todo comunicar la importancia de esta enfermedad y su impacto en la población. Beneficiando no solamente a las miles de mujeres mexicanas afectadas por este cáncer, sino también a la población femenina en general, ya que este es un problema de escala global. Todos los esfuerzos van orientados hacia la innovación científica en la medicina y la evaluación de la aplicabilidad en la práctica de los procesos estudiados, con el objetivo de brindar una mayor seguridad y mejor atención a los pacientes durante su padecimiento.

7. Hipótesis

Mefloquina y paroxetina inhiben significativamente la viabilidad y migración celular en la línea celular MDA-MB-231.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Analizar el efecto de mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad y migración celular en la línea MDA-MB-231 asociada al cáncer de mama triple negativo.

8.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la viabilidad celular en presencia de mefloquina y paroxetina en la línea celular MDA-MB-231.
- 2) Evaluar el efecto de los compuestos mefloquina y paroxetina sobre la migración celular en la línea celular MDA-MB-231.
- 3) Comparar los efectos citotóxicos de los compuestos mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad y migración celular de la línea celular MDA-MB-231.

9. Materiales y métodos

9.1. Cultivo de la línea celular

La línea celular MDA-MB-231 (*American Type Culture Collection*, EE. UU.) se cultivó en placas con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 3.5 g/L de glucosa, 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Gibco, EE. UU.) y una mezcla de antibiótico-antimicótico 2x [200 unidades/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomina y 0.50 µg/mL de anfotericina B (Gibco, EE. UU.)], manteniéndose a 37°C en una incubadora con atmósfera humidificada de 5% CO₂ - 95% aire. El mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo realizando subcultivos de baja densidad cada 3 a 5 días.

Para realizar el subcultivo de la línea celular, se seleccionó el cultivo con una confluencia de células vivas cercana al 90%. Se trabajó en campana de flujo laminar, cerciorándose de que todas las soluciones y equipos que entraron en contacto con las células fueran estériles. Se comenzó removiendo y desechando el medio de cultivo contenido en la caja Petri seleccionada. Posteriormente, se lavaron las células utilizando la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) sin calcio ni magnesio (aproximadamente 2 mL por cada 10 cm² de superficie de cultivo). La solución de lavado se agregó gentilmente en el lado del recipiente opuesto a la monocapa celular para evitar alterarla, después se sacudió ligeramente el recipiente para distribuir la solución de manera uniforme durante aproximadamente 30 segundos y finalmente se retiró de la caja Petri.

El siguiente paso fue agregar tripsina (reactivo de disociación) para provocar un desprendimiento de las células que se encontraban adheridas a la base de la caja Petri; se utilizó reactivo suficiente para cubrir la monocapa celular y se sacudió gentilmente el contenedor para distribuir en toda la superficie. Una vez desprendidas, se agregó medio de cultivo completo con la finalidad de inactivar la tripsina. Posteriormente, se transfirieron las células a un cubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 2000 RPM durante 2 minutos, con lo cual se obtuvo un agregado celular en el fondo del tubo. Se desechó el medio con la tripsina inactivada por decantación y se resuspendió el agregado celular en un volumen mínimo de medio de cultivo completo.

Una vez distribuidas las células en el medio, se tomó una muestra para conteo y se determinó el número total de células (concentración celular) utilizando una cámara de Neubauer y el método de viabilidad celular por exclusión con azul de tripano. Para finalizar, se agregó el volumen apropiado de suspensión celular a nuevos recipientes de cultivo, y se colocaron las células en la incubadora en las condiciones previamente mencionadas.

9.2. Preparación de soluciones de fármacos

Los compuestos paroxetina y mefloquina fueron comprados de Sigma-Aldrich (EE. UU.). Mefloquina se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO), preparando soluciones stock de 0.25 mM, 1 mM, 2.5 mM y 7.5 mM. Para los experimentos se trabajó con concentraciones en el rango de 0.5 μ M a 30 μ M en medio de cultivo. Paroxetina se disolvió en DMSO para preparar soluciones stock de 0.5 mM, 3 mM, 7.5 mM y 20 mM. Las soluciones de trabajo de PX fueron preparadas en medio de cultivo y se encuentran en el rango de 1 μ M a 100 μ M. En ningún ensayo se superó la concentración final de DMSO de 0.5% (v/v).

El compuesto mitomicina C fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology (EE. UU.). Se disolvió en agua grado tipo I para obtener un stock de 1.5 mM y se trabajó con una concentración de 12 μ M en medio de cultivo.

9.3. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Para la preparación de la solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), se disolvió MTT en medio con suero reducido Opti-MEM (Gibco, USA) a 2.1 mg/mL. Posteriormente, se filtró la solución a través de un filtro de 0.2 μ m dentro de un contenedor estéril. La solución de MTT se almacenó sin exposición a la luz, a 4 °C para uso frecuente o a -20 °C para almacenamiento a largo plazo.

Para preparar el buffer de lisis se seleccionó un contenedor apropiado para resistir el solvente y se trabajó bajo campana de extracción. Primero, se preparó dimetilformamida 50% (v/v) en agua grado tipo I y se agregó solución de dodecilsulfato sódico 20% (v/v).

La solución se almacenó a temperatura ambiente para evitar la precipitación del dodecilsulfato sódico.

Para el ensayo se sembraron las células en placas de 96 pocillos de manera que al agregar 100 μL de solución celular (con medio DMEM al 10% de SFB) se adicionaron 11,000 células en cada pocillo. Al llegar a una confluencia celular del 80%, se decantó la placa en gasa estéril para desechar el medio de cultivo. Se colocaron las células en tratamiento previo (ayuno) agregando 100 μL de medio Opti-MEM por cada pozo e incubando durante 2 horas a 37 °C.

Nuevamente se decantó la placa en gasa estéril para eliminar el medio utilizado en el ayuno. Se adicionó a cada pozo 100 μL de medio Opti-MEM con la concentración de tratamiento deseada, ajustando a las condiciones a evaluar, y se colocó la placa en incubadora durante 48 horas a 37 °C.

Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 30 μL de la solución de MTT por pocillo y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Después se agregaron 100 μL de buffer de lisis a cada pocillo para disolver los cristales de formazán que se generaron y se incubó durante toda la noche. Finalmente, se leyó la absorbancia a 590 nm.

9.4. Análisis de combinación de fármacos

Se evaluó la viabilidad celular por medio del ensayo MTT combinando diferentes concentraciones de mefloquina y paroxetina. Se generó una matriz con los resultados de las combinaciones y se analizó utilizando el software *SynergyFinder 3.0* (lanevski et al., 2022) para evaluar la interacción entre fármacos. Las respuestas esperadas de la combinación de fármacos fueron calculadas según el modelo de potencia de interacción cero (ZIP), bajo la asunción de que ambos fármacos no potencian su efecto entre sí. Los puntajes de sinergia se interpretaron de la siguiente manera:

- ◆ Menor a -10: es probable que la interacción entre ambos fármacos sea antagonista.

- ◆ Entre -10 y 10: es probable que la interacción entre ambos fármacos sea aditiva.
- ◆ Mayor a 10: es probable que la interacción entre ambos fármacos sea sinérgica.

9.5. Ensayo de migración celular (cierre de herida)

Se cultivaron las células en placas de 12 pocillos utilizando medio DMEM suplementado con 10% de SFB hasta alcanzar una confluencia celular de 90% en cada pocillo. Posteriormente, se realizó un tratamiento a las células, reemplazando el DMEM al 10% de SFB por DMEM sin suero fetal bovino con una concentración de 12 μM de mitomicina e incubando durante 2 horas a 37 °C para inhibir la proliferación durante el experimento. Una vez transcurrido el tiempo, se raspó la monocapa celular en línea recta con una punta de micropipeta de 200 μL , creando una herida. Se eliminaron los residuos desechando el medio de cultivo y posteriormente se lavaron las células por duplicado con 300 μL de PBS en cada lavado. Por último, se agregó medio de cultivo suplementado con 5% de suero fetal bovino. En el caso de los ensayos con fármaco, se adicionó a cada pocillo el volumen correspondiente de solución según la concentración a probar.

Se documentaron fotográficamente los resultados utilizando una cámara acoplada a un microscopio invertido; se capturó la primera imagen de cada herida a las 0 horas. Posteriormente, se almacenó la placa de cultivo en incubadora a 37 °C. El tiempo de incubación debía permitir que las células con una migración más rápida alcancen a cerrar la herida por completo, para la línea MDA-MB-231 este tiempo fue de 48 horas. Se examinaron los cultivos periódicamente, y después se reanudó la incubación las veces requeridas.

Para dar por terminado el ensayo, se analizaron las imágenes obtenidas en cada muestra utilizando el software ImageJ y se compararon las imágenes en los distintos tiempos, reportándose el porcentaje de cierre de la herida.

9.6. Ensayo de migración celular (Transwell)

Se cultivaron células MDA-MB-231 en caja Petri con DMEM (10% SFB) hasta alcanzar alta confluencia. Dos horas antes de comenzar el ensayo, se removió el medio con suero y se agregó mitomicina C en DMEM experimental (0% SFB) hasta alcanzar una concentración final de 12 μM . Se incubó la caja a 37 °C durante 2 horas.

Una vez finalizado el ayuno de las células, se realizó el procedimiento de resiembra celular, evitando completamente el contacto de las células con medio que contenga suero fetal bovino. Para disminuir la acción de la tripsina, se diluyó con un volumen máximo de DMEM experimental. Se preparó una solución de 15,000 células por cada 100 μL de medio.

Se colocaron los insertos Transwell en una placa de 24 pocillos utilizando pinzas estériles previamente bañadas en etanol y se añadieron 100 μL de células dentro de cada canastilla. Se agregó 600 μL de cada solución de condición experimental en los pocillos vacíos y posteriormente se movieron los Transwell hacia estos. Se incubó la placa a 37 °C durante 48 horas.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se retiró la placa de la incubadora y se colocó cada inserto en un pocillo con 600 μL de solución de fijación (formaldehído 4%) por 5 minutos. Después se realizó un lavado con 600 μL de PBS a cada inserto y se retiró el exceso de líquido en la parte superior utilizando hisopos de algodón.

Para teñir las células fijadas, se colocó cada canastilla en un pocillo con 600 μL de solución de cristal violeta (0.2% v/v) durante 15 minutos. Tras finalizar la tinción, se lavó cada inserto por triplicado en PBS y se les retiró el exceso de cristal violeta en la parte superior utilizando pequeños trozos de algodón.

Utilizando una cámara acoplada a un microscopio invertido con un aumento de 5x, se capturaron tres imágenes en distintas zonas de la parte inferior de cada inserto. Finalmente, estas imágenes se analizaron en el software ImageJ para realizar un conteo de las células que migraron a través del Transwell.

9.7. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar (n = número de experimentos). Los gráficos y análisis de los datos experimentales se realizaron con el programa GraphPad Prism (versión 9.3.0). Para evaluar la significancia estadística de los resultados obtenidos se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes. Para comparaciones múltiples se utilizó el método de análisis de varianza ANOVA seguido de una prueba de Dunnett. En el análisis de los ensayos de viabilidad se utilizó ANOVA de bloques aleatorizados para controlar la variabilidad entre placas. La estadística se realizó utilizando los datos crudos, estos datos se transformaron a porcentaje relativo al control para las figuras y descripción. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

10. Resultados

10.1. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Como se muestra en la figura 6, se evaluó el efecto del fármaco mefloquina sobre la viabilidad celular de la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 utilizando el ensayo de MTT en condiciones control (sin fármaco), en presencia del vehículo DMSO (0.5% v/v) y en un rango de concentraciones de MQ desde 0.5 μ M hasta 30 μ M, con un tiempo de exposición de 48 horas. Los porcentajes de viabilidad se normalizaron respecto a lo obtenido en las células control, tomando este valor como 100%. En presencia de la máxima concentración utilizada del vehículo DMSO (0.5% v/v), el valor de la viabilidad fue $99.5 \pm 10.2\%$, esto no representó diferencia estadística con el control, por lo que se utilizaron las células en condiciones control como referencia en los análisis.

Con las concentraciones de 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 7 μ M y 10 μ M de mefloquina, los resultados de la viabilidad celular fueron $102.6 \pm 15.86\%$, $99.8 \pm 10.6\%$, $99.5 \pm 9.2\%$, $102.1 \pm 7.0\%$, $99.7 \pm 10.4\%$ y $88.9 \pm 11.2\%$, respectivamente. Como se observa en la figura 6, al exponer las células a las concentraciones ya mencionadas de mefloquina, no se obtuvieron cambios significativos en la viabilidad celular respecto al control. El tratamiento con una concentración de 15 μ M de MQ dio como resultado una viabilidad del $60.8 \pm 15.8\%$, lo cual representó una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0.0001$) respecto a las condiciones control. Asimismo, al agregar una concentración de 30 μ M de MQ, la viabilidad celular se redujo significativamente ($p \leq 0.0001$), con un valor de $19.0 \pm 0.1\%$ en comparación al control.

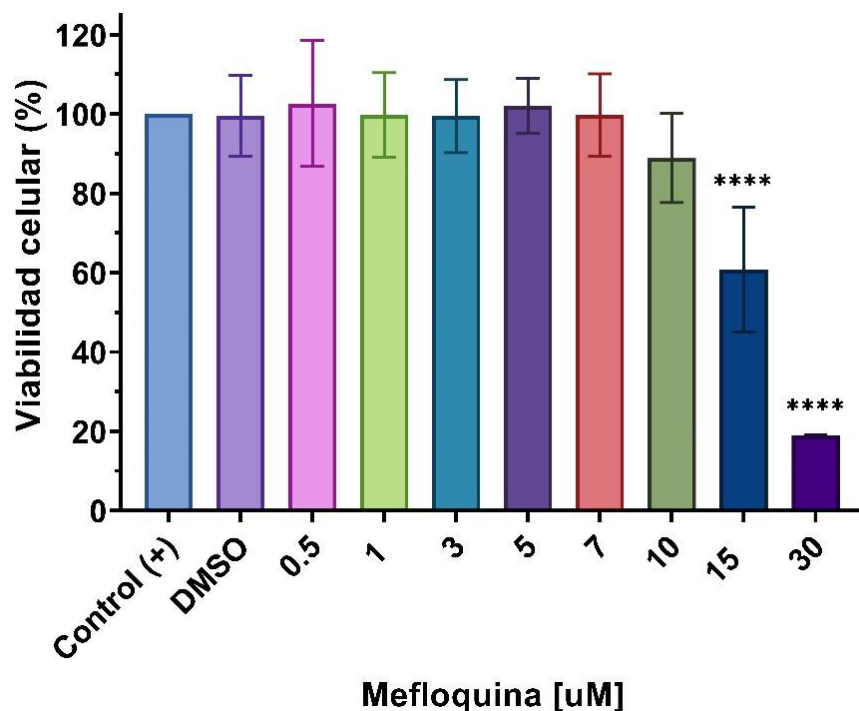


Figura 6. Efecto de mefloquina sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 evaluada con el ensayo de MTT. Las células fueron expuestas a un 0.5% v/v del vehículo (DMSO) y a distintas concentraciones de MQ (0.5 - 30 μ M) durante 48 horas (n = 3). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad respecto al control. **** p \leq 0.0001, respecto a las condiciones control.

Para determinar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) se realizó un análisis de regresión no lineal (Fig. 7), resultando en una curva con una R^2 igual a 0.91. La IC_{50} de mefloquina sobre la línea celular MDA-MB-231 a 48 horas obtenida fue de 15.48 μ M.

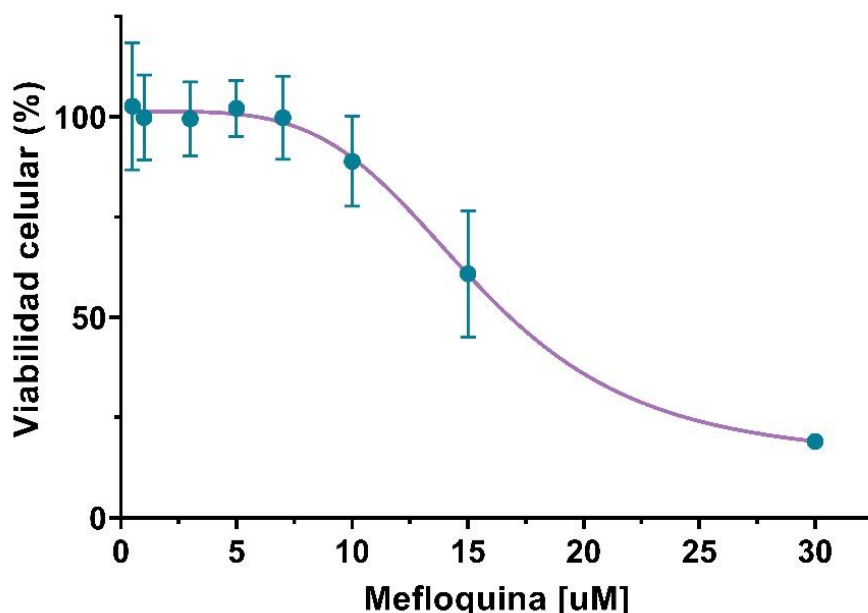


Figura 7. Curva concentración-efecto de mefloquina sobre la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231, donde se muestra una $IC_{50} = 15.48 \mu M$. La curva cuenta con un valor de $R^2 = 0.91$. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar.

En la figura 8 se observa cómo por medio del ensayo MTT se evaluó el efecto del fármaco paroxetina sobre la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 en un rango de concentraciones de $1 \mu M$ a $100 \mu M$ de PX durante un periodo de 48 horas. Los resultados se normalizaron considerando 100% de viabilidad en las condiciones control debido a que no existieron cambios significativos en la viabilidad celular al cultivar las células con la máxima concentración utilizada de vehículo, cuyo valor fue de $94.9 \pm 10.1\%$. En presencia de las concentraciones $1 \mu M$, $5 \mu M$, $10 \mu M$, $15 \mu M$, $20 \mu M$ y $30 \mu M$ de PX, los porcentajes obtenidos fueron $92.3 \pm 8.9\%$, $94.0 \pm 4.8\%$, $91.4 \pm 6.1\%$, $89.4 \pm 9.2\%$, $88.1 \pm 4.7\%$ y $76.3 \pm 3.9\%$, respectivamente, ninguna de estas concentraciones presentó diferencia significativa respecto al control. La disminución en la viabilidad se incrementó significativamente ($p \leq 0.001$) utilizando las concentraciones de $50 \mu M$ y $100 \mu M$ del fármaco, alcanzando un valor de $8.1 \pm 2.8\%$ en ambos casos comparando con las células sin tratamiento.

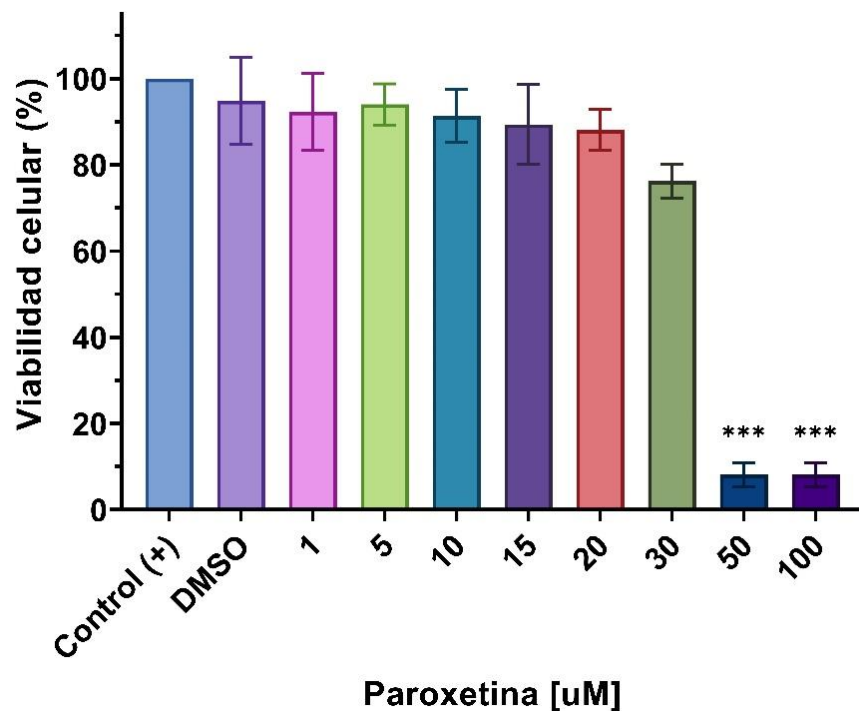


Figura 8. Efecto de paroxetina sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 evaluada con el ensayo de MTT. Las células fueron expuestas a un 0.5% v/v del vehículo (DMSO) y a distintas concentraciones de PX (1 - 100 μ M) durante 48 horas (n = 3). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad respecto al control. *** $p \leq 0.001$, respecto a las condiciones control.

Se determinó que la IC_{50} de paroxetina sobre la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 a una exposición de 48 horas es 34.07 μ M. Lo anterior se obtuvo mediante un análisis de regresión no lineal, resultando en una curva con un valor de R^2 igual a 0.97 (Fig. 9).

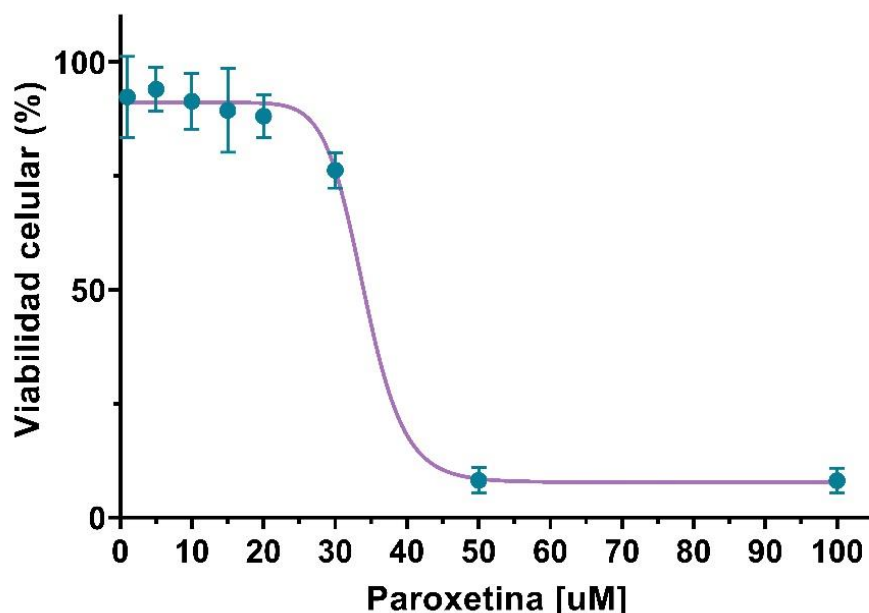


Figura 9. Curva concentración-efecto de paroxetina sobre la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231, donde se muestra una $IC_{50} = 34.07 \mu\text{M}$. La curva cuenta con un valor de $R^2 = 0.97$. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar.

10.2. Ensayo de viabilidad celular en combinación de fármacos

Se evaluó el efecto de la combinación de concentraciones bajas de mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 utilizando el ensayo de MTT, con un tiempo de 48 horas (Fig. 10). Como condición control se tomó la viabilidad celular en la ausencia de ambos fármacos y los resultados se expresaron en términos de porcentaje del control. Durante este análisis, los efectos de paroxetina de manera individual para las concentraciones de $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ fueron $127.0 \pm 24.4\%$, $107.5 \pm 15.3\%$ y $91.8 \pm 20.8\%$, respectivamente (Fig. 10A). Para mefloquina, utilizando las concentraciones de $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ y $5 \mu\text{M}$, los porcentajes fueron 98.1 ± 6.4 , $103.1 \pm 8.6\%$ y $102.7 \pm 23.4\%$, respectivamente. Estas concentraciones por sí mismas no generaron una diferencia significativa en la viabilidad respecto a las condiciones control (como se reportó previamente en las figuras 6 y 8).

Al combinar 1 μM de mefloquina con 1 μM , 5 μM y 10 μM de paroxetina, se obtuvo una viabilidad porcentual de $108.4 \pm 16.4\%$, $107.4 \pm 20.9\%$ y $77.31 \pm 25.55\%$, respectivamente. Este conjunto de combinaciones no cambi6 de manera significativa la viabilidad respecto al control, ni tampoco respecto a las concentraciones individuales (Fig. 10B).

La exposici6n combinada de 3 μM de mefloquina con 1 μM de paroxetina tampoco gener6 diferencia estadística en la viabilidad celular, resultando en $110.5 \pm 17.8\%$. Sin embargo, la presencia combinada de 3 μM de MQ con 5 μM de PX y con 10 μM de PX, redujo significativamente la viabilidad a $78.17 \pm 15.0\%$ y $40.5 \pm 20.4\%$, respectivamente, comparada con la respuesta en condiciones control y tambi6n a la exposici6n individual de 10 μM de paroxetina ($p \leq 0.001$), tal como se muestra en la figura 10C.

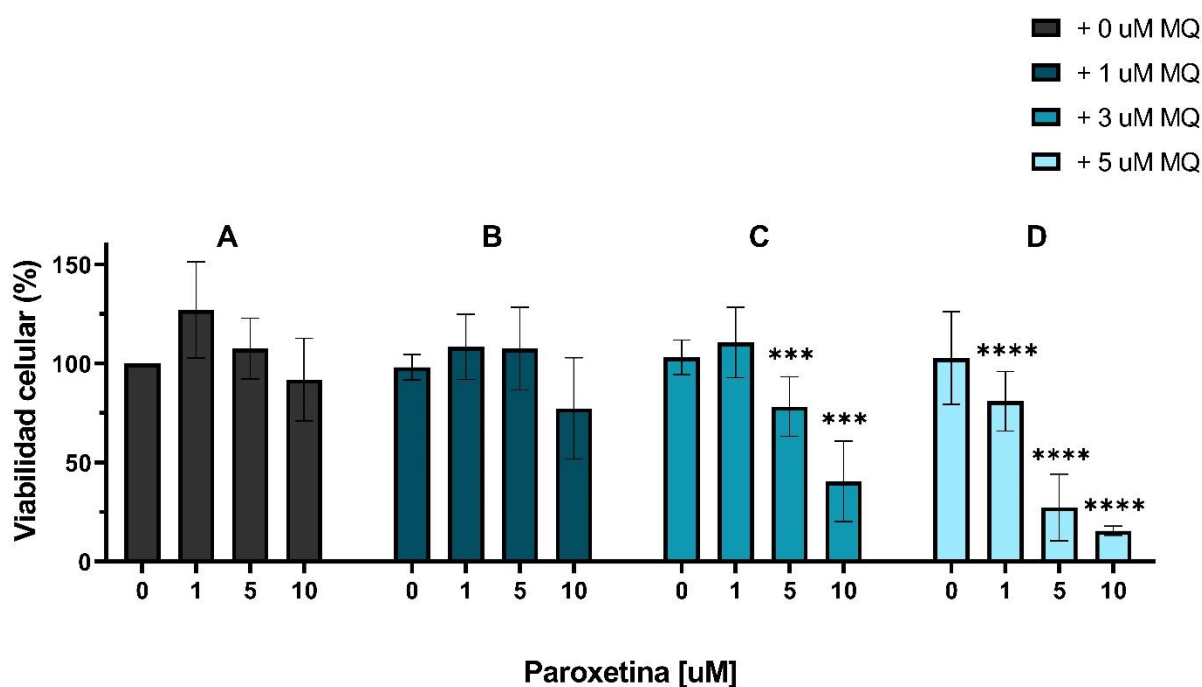


Figura 10. Efecto de la aplicaci6n combinada de paroxetina y mefloquina sobre la viabilidad celular en la lnea celular MDA-MB-231 evaluada con el ensayo de MTT. Las c6lulas fueron expuestas a las concentraciones de 1 μM , 5 μM y 10 μM de paroxetina, en ausencia (A) y en presencia de 1 μM (B), 3 μM (C) y 5 μM (D) de mefloquina, durante 48 horas ($n = 4$). Los datos se presentan como la media \pm desviaci6n estandar del porcentaje de viabilidad respecto al control. *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a las concentraciones correspondientes de paroxetina en ausencia de mefloquina (A).

La exposición combinada de 5 μM de mefloquina con cada una de las concentraciones evaluadas de paroxetina, 1 μM , 5 μM y 10 μM , resultó en una viabilidad celular estadísticamente menor a las condiciones control, siendo $80.87 \pm 15.1\%$, $27.3 \pm 16.8\%$ y $15.5 \pm 2.3\%$, respectivamente. Como se puede observar en la figura 10D, este conjunto de combinaciones generó una reducción notable ($p \leq 0.0001$) en comparación con la aplicación individual de paroxetina.

Para determinar el tipo de interacción que existe entre mefloquina y paroxetina al actuar sobre la viabilidad celular utilizando el software *Synergyfinder*, los resultados de las combinaciones de los fármacos fueron transformados a porcentaje de inhibición, restando a 100% el porcentaje de viabilidad obtenido en cada combinación. Al aumentar la concentración de cada fármaco en las combinaciones, se incrementó de manera gradual el porcentaje de inhibición de la viabilidad (Fig. 11). El mayor porcentaje de inhibición, 84.46%, se obtuvo con la combinación de 5 μM de MQ y 10 μM de PX.

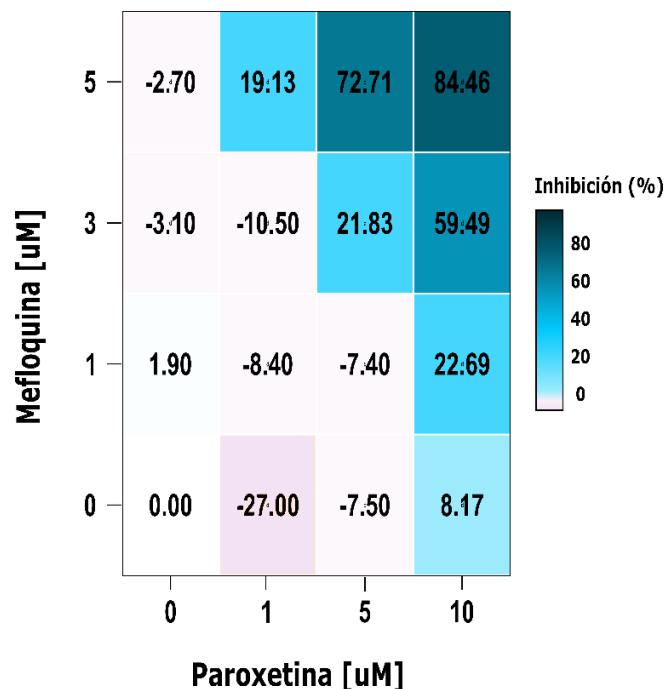


Figura 11. Mapa de calor del porcentaje de inhibición en la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231 al realizar combinaciones de diferentes concentraciones de mefloquina (1, 3 y 5 μM) y paroxetina (1, 5, y 10 μM), tras 48 horas de exposición ($n = 4$). Los datos se presentan como la media del porcentaje de inhibición en cada una de las combinaciones.

El análisis de sinergia utilizando el modelo de referencia ZIP arrojó un puntaje de sinergia de 12.791; por lo tanto, este modelo nos indica que el efecto sobre la viabilidad celular de la aplicación combinada de mefloquina y paroxetina es sinérgico.

La figura 12 muestra un mapa de sinergia entre mefloquina y paroxetina, en el cual se observan las zonas donde el puntaje es positivo (sinergia), negativo (antagonismo) o cercano a cero (aditivo). El área más sinérgica se encuentra en las combinaciones de concentraciones más altas, específicamente en las regiones de 3 μM a 5 μM de mefloquina y de 5 μM a 10 μM de paroxetina.

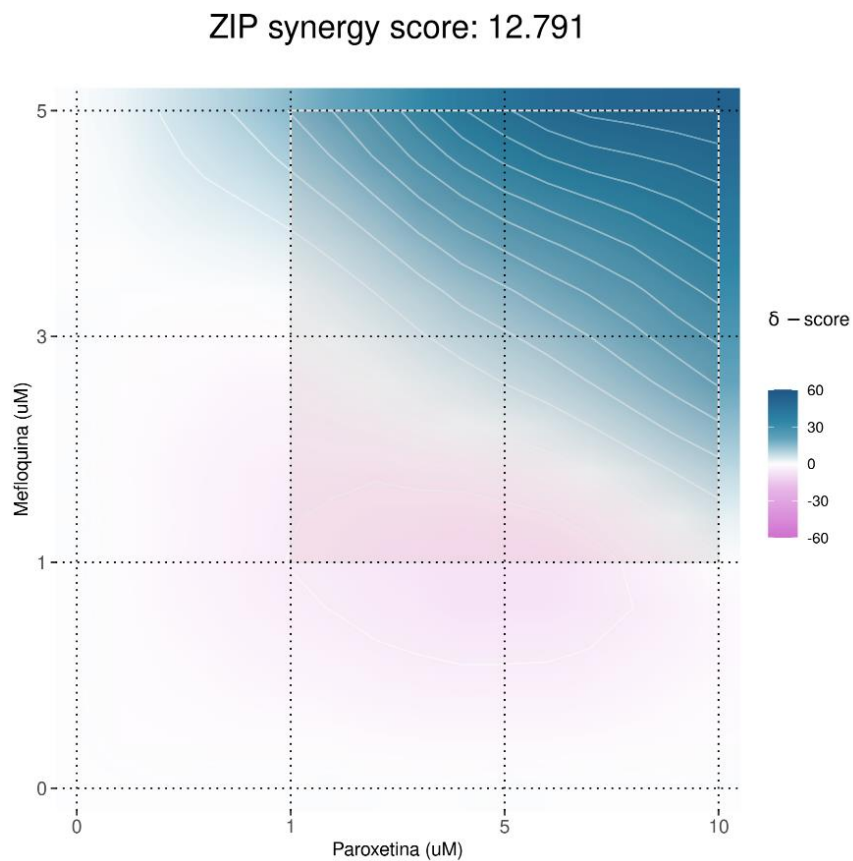


Figura 12. Mapa en 2D del análisis de sinergia entre las diferentes concentraciones de mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231. El gráfico presenta los puntajes de sinergia según el modelo ZIP, así como el área más sinérgica. Los puntajes se interpretan de la siguiente manera: $\delta < -10$ efecto antagonista, $-10 < \delta < 10$ efecto aditivo, $\delta > 10$ efecto sinérgico.

Una representación del mapa tridimensional de sinergia entre mefloquina y paroxetina se encuentra en la figura 13. El grado de interacción entre los fármacos genera diferentes alturas en el eje Z, los picos (valores positivos) representan sinergia, los valles (valores negativos) representan antagonismo, mientras que las superficies planas (valores cercanos a cero) representan efecto aditivo. El pico máximo, con un puntaje de sinergia de 53.92, es el resultado de la combinación de 5 μM de MQ y 10 μM de PX.

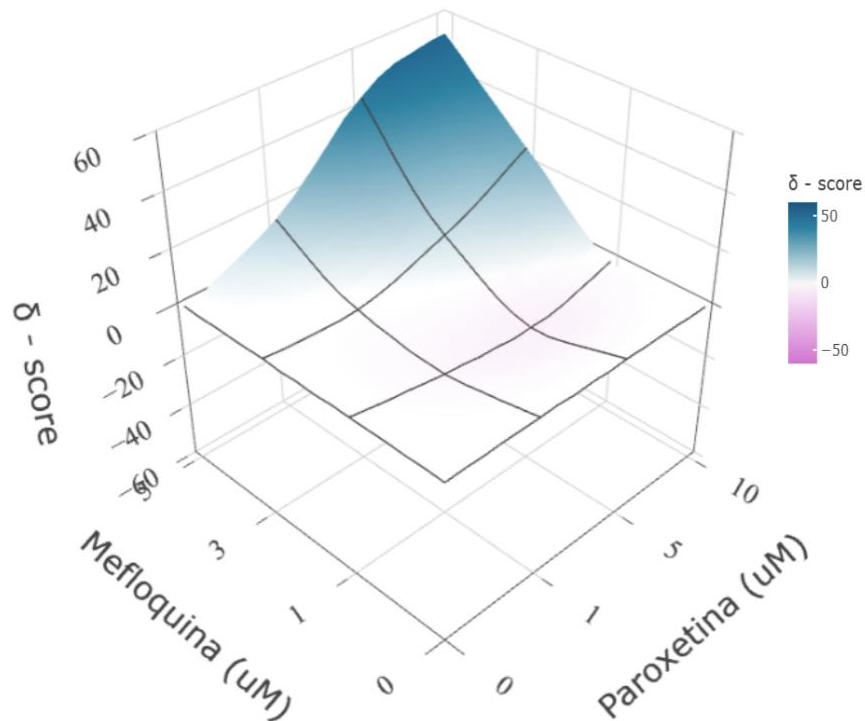


Figura 13. Mapa en 3D del análisis de sinergia entre las diferentes concentraciones de mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231. El gráfico presenta los puntajes de sinergia según el modelo ZIP, los cuales se interpretan de la siguiente manera: $\delta < -10$ efecto antagonista, $-10 < \delta < 10$ efecto aditivo, $\delta > 10$ efecto sinérgico.

10.3. Ensayo de migración celular (cierre de herida)

Se analizó el efecto de los fármacos mefloquina y paroxetina sobre la migración celular de la línea MDA-MB-231 utilizando el ensayo de cierre de herida. La experimentación se llevó a cabo en condiciones control positivo (DMEM sin fármaco con 5% de SFB), control negativo (DMEM sin fármaco y sin SFB), en presencia de la máxima concentración

utilizada de vehículo (DMSO 0.5% v/v) y en un rango de concentraciones de MQ de 1 μ M hasta 10 μ M y de PX de 1 μ M hasta 20 μ M (todos los compuestos en solución con 5% de SFB), con un tiempo de exposición de 24 y 48 horas.

En la figura 14 se pueden observar imágenes representativas de la migración celular en la línea MDA-MB-231 en condiciones control positivo. Se presentó un cierre completo a las 48 horas de haber realizado la herida. Por otro lado, en la figura 15 se representa la migración celular limitada cuando se realizó el ensayo en condiciones control negativo. La ausencia total de los componentes que provee el suero impidió el cierre de la herida incluso al alcanzar las 48 horas de prueba, cumpliendo la función de mostrar un cultivo en el que se conoce que las células no serán capaces de migrar.

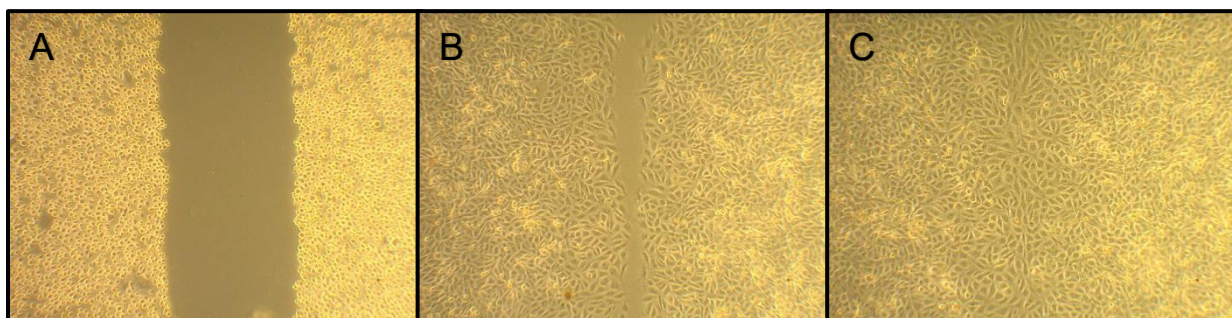


Figura 14. Representación de ensayo de herida en condiciones control positivo. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

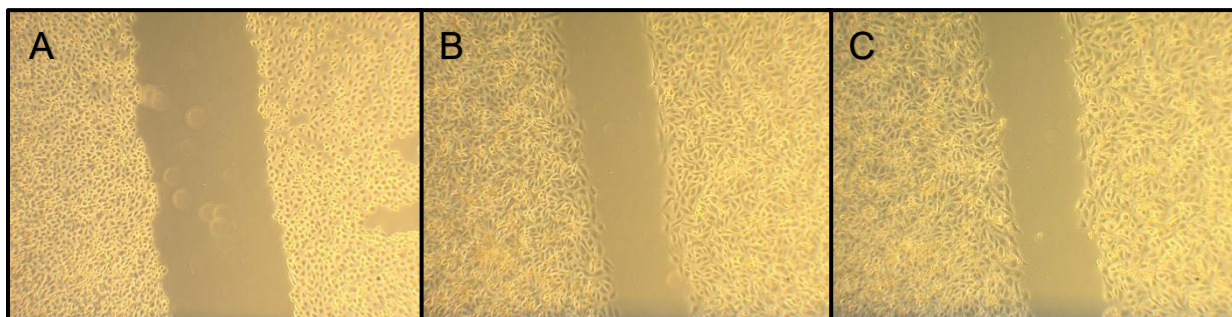


Figura 15. Representación de ensayo de herida en condiciones control negativo. Células MDA-MB-231 en medio DMEM sin suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

En la figura 16 se muestra el comportamiento de las células al aplicar una concentración de 1 μM de mefloquina, donde se observó un cierre parcial (alrededor de 90%) a las 24 horas y un cierre completo a las 48 horas; mientras que en la figura 17, al agregar 3 μM del fármaco, se obtiene un cierre parcial (alrededor de 75%) a las 24 horas y un cierre de aproximadamente 95% a las 48 horas. Con ambas concentraciones, las células migraron de manera similar a las condiciones control positivo, es decir, no se presentó ningún cambio.

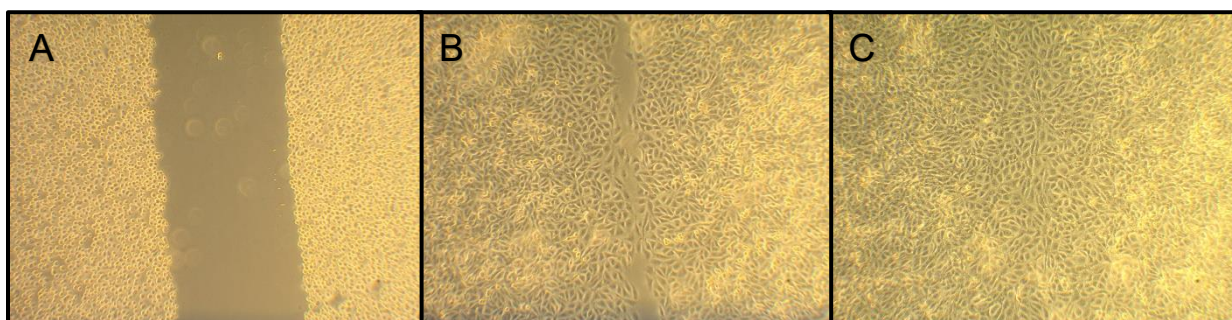


Figura 16. Representación de ensayo de herida con una concentración de 1 μM de MQ. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

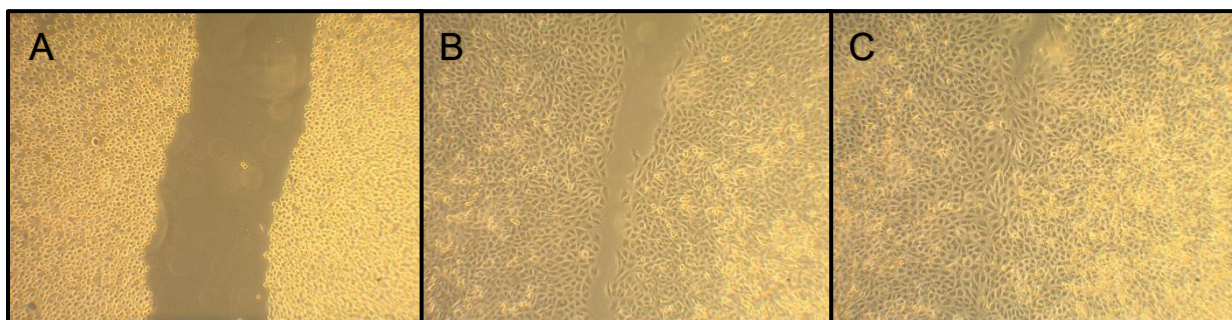


Figura 17. Representación de ensayo de herida con una concentración de 3 μM de MQ. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

Los efectos de las concentraciones 5 μM y 7 μM de mefloquina en la migración celular se muestran en la figura 18 y la figura 19, respectivamente. En ambas figuras se observó un cierre menor de la herida a las 24 horas, aproximadamente 50% y 40%, respectivamente, si se compara con la imagen correspondiente al control. Lo mismo sucede a las 48 horas, las células no lograron cerrar por completo la herida, obteniéndose un porcentaje de cierre de 80% y 70% aproximadamente, para 5 μM y 7 μM , respectivamente. La diferencia en comparación a las condiciones control fue más notable utilizando la concentración de 7 μM .

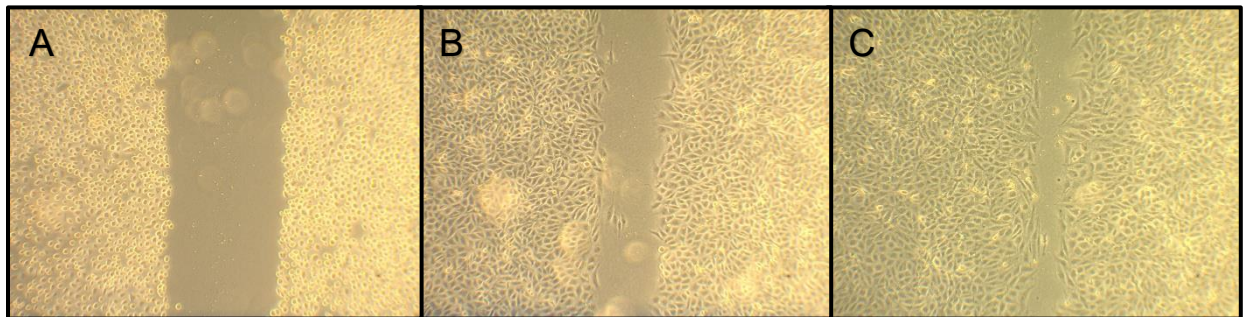


Figura 18. Representación de ensayo de herida con una concentración de 5 μM de MQ. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

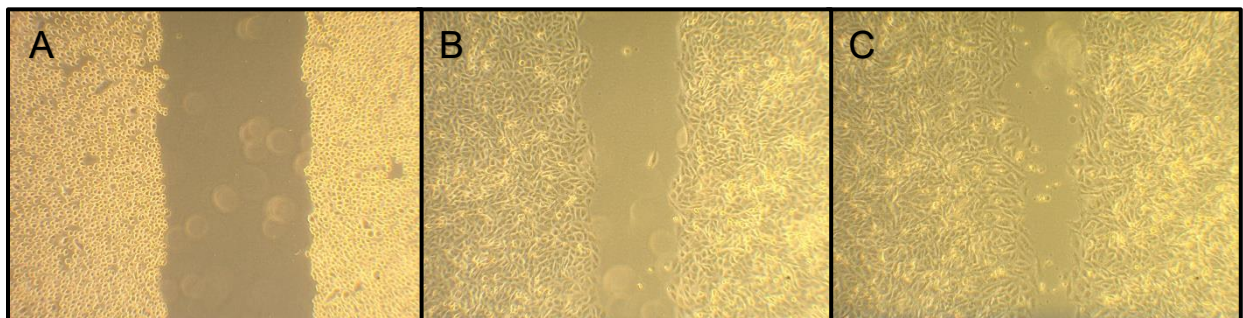


Figura 19. Representación de ensayo de herida con una concentración de 7 μM de MQ. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

La concentración más alta de la experimentación con mefloquina fue de 10 μM , representada en las imágenes de la figura 20. El efecto de reducción del porcentaje de cierre de herida fue mayor en comparación con las células control. Este comportamiento se observó desde las 24 horas de exposición al fármaco, con un cierre aproximado del 50%, y continúa hasta las 48 horas, con un cierre de 65% aproximadamente.

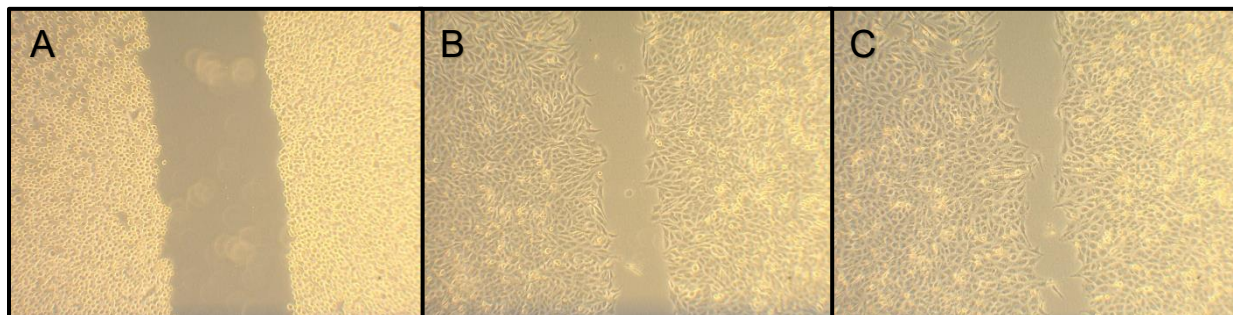


Figura 20. Representación de ensayo de herida con una concentración de 10 μM de MQ. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

El porcentaje de cierre de herida por parte de las células en condiciones control positivo a las 24 horas fue de $79.7 \pm 14.1\%$. En ese mismo tiempo, las células expuestas a la máxima concentración de vehículo utilizada (DMSO 5% v/v) tuvieron un cierre de $78.5 \pm 14.1\%$, lo cual no representó un cambio significativo respecto al control, por lo que se utilizaron las células en condiciones control como referencia. Los valores de cierre obtenidos a las 24 horas para las concentraciones de 1 μM , 3 μM y 5 μM de mefloquina fueron $75.9 \pm 13.3\%$, $75.1 \pm 10.3\%$ y $68.3 \pm 14.4\%$, respectivamente; no se observó una diferencia significativa comparando con el control en los tres casos. La primera reducción significativa ($p \leq 0.05$) en el cierre de herida respecto al control ocurrió a una concentración de 7 μM de MQ, con un porcentaje de $56.3 \pm 10.1\%$. La exposición de la línea celular a 10 μM del compuesto también indicó un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.01$) en comparación al control, con un valor de $59.2 \pm 5.2\%$. Finalmente, las células en presencia de medio DMEM sin suero (control negativo) presentaron un cierre de $40.7 \pm 6.7\%$ a las 24 horas, una diferencia significativa ($p \leq$

0.0001) si se compara con las células control positivo. Estos resultados se encuentran resumidos en la figura 21.

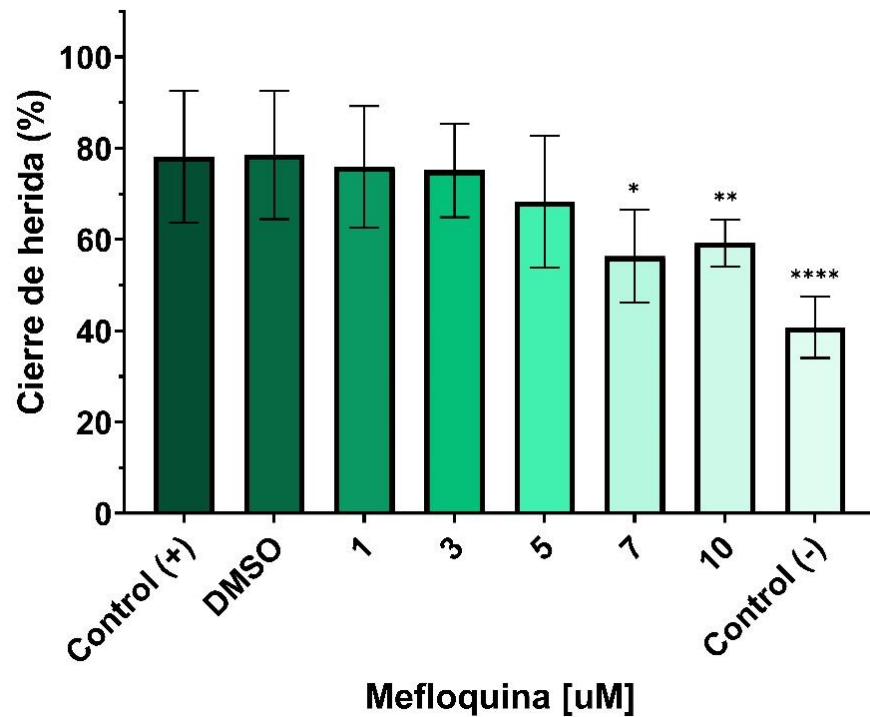


Figura 21. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 horas de transcurrido el ensayo. Se estudiaron las siguientes condiciones experimentales: control positivo, DMSO 0.5% v/v, MQ 1 μ M, MQ 3 μ M, MQ 5 μ M, MQ 7 μ M, MQ 10 μ M, control negativo (n = 5). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de cierre en cada una de las condiciones. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a la media del control.

Transcurridas las 48 horas de prueba (Fig. 22), las células en condiciones control alcanzaron un cierre de herida igual a $97.1 \pm 4.2\%$. Aquellas células en presencia de DMSO 0.5% (v/v) lograron un cierre de $96.3 \pm 4.9\%$, esto no representa una diferencia estadística respecto al control. Para las concentraciones de 1 μ M, 3 μ M y 5 μ M de mefloquina tampoco hubo disminución significativa en los porcentajes de cierre al comparar con el control, dando como resultado $96.6 \pm 3.5\%$, $94.6 \pm 3.7\%$ y $92.9 \pm 8.2\%$,

respectivamente. La concentración de MQ 7 μM redujo significativamente el cierre de herida ($p \leq 0.01$), resultando en $79.6 \pm 6.0\%$; esa misma diferencia se obtuvo utilizando la concentración de 10 μM , con un $77.5 \pm 5.9\%$ de cierre. Las células en condiciones control negativo alcanzaron un cierre de $44.3 \pm 6.7\%$, una gran diferencia estadística ($p \leq 0.0001$) al comparar con su contraparte positiva.

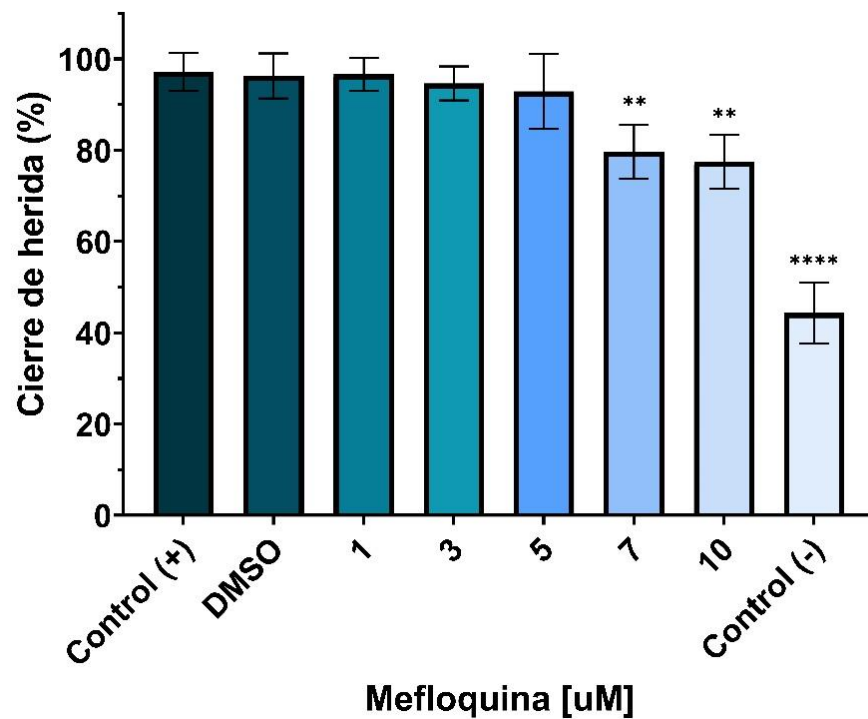


Figura 22. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231 después de 48 horas de transcurrido el ensayo. Se estudiaron las siguientes condiciones experimentales: control positivo, DMSO 0.5% v/v, MQ 1 μM , MQ 3 μM , MQ 5 μM , MQ 7 μM , MQ 10 μM , control negativo ($n = 5$). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de cierre en cada una de las condiciones. ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a la media del control.

En la figura 23 se muestra el análisis comparativo del porcentaje de cierre de herida a las 24 y 48 horas, después de su exposición a mefloquina. En ambos tiempos, las concentraciones del fármaco que presentaron un comportamiento significativamente diferente al de las células control fueron 7 μM y 10 μM .

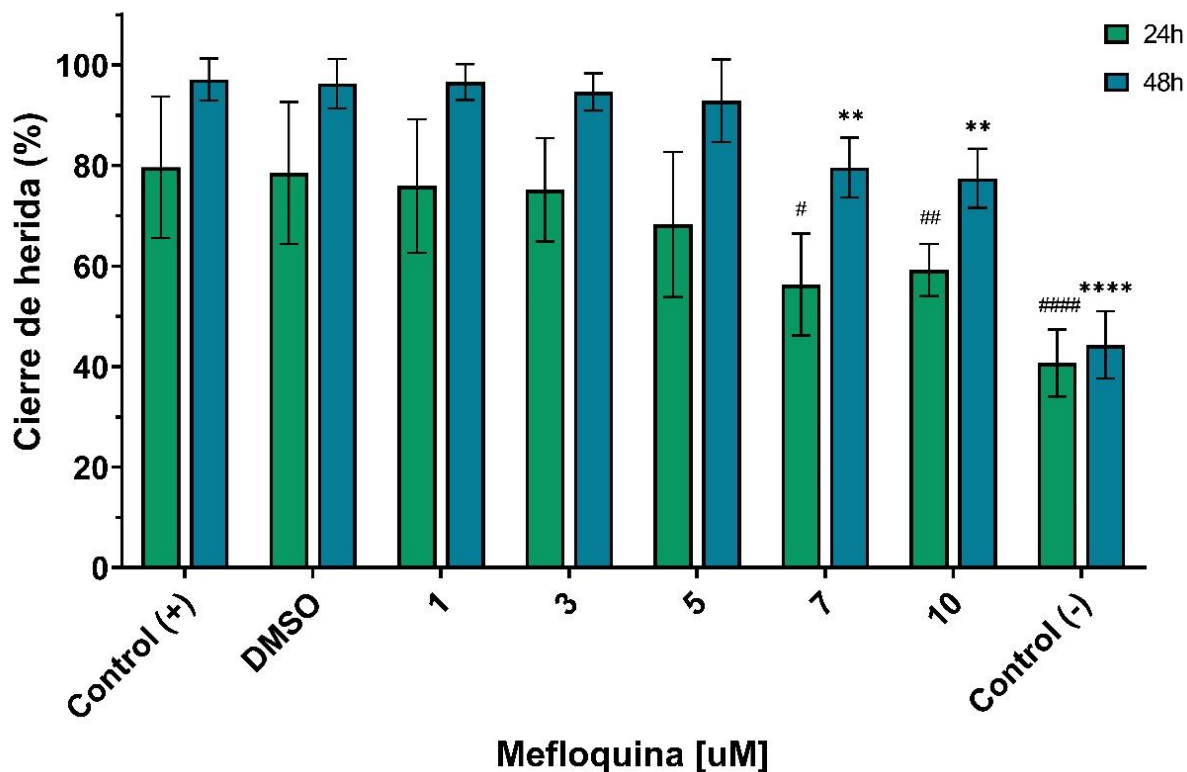


Figura 23. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 y 48 horas de transcurrido el ensayo. Se estudiaron las siguientes condiciones experimentales: control positivo, DMSO 0.5% v/v, MQ 1 µM, MQ 3 µM, MQ 5 µM, MQ 7 µM, MQ 10 µM, control negativo (n = 5). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de cierre en cada una de las condiciones. # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.0001$, respecto a la media del control a las 24 horas. ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a la media del control a las 48 horas.

En la figura 24 se representa el comportamiento típico de la línea celular MDA-MB-231 durante el ensayo de cierre de herida después de exponer a las células a una concentración de 1 µM de paroxetina, a las 24 horas se obtuvo un cierre parcial (aproximadamente 85%) y a las 48 horas un cierre del 100%. En la figura 25 se muestra lo mismo para una concentración de 5 µM, con un menor cierre después de 24 horas (alrededor de 70%), y de manera similar un cierre completo de la herida a las 48 horas. Ambas condiciones con comportamiento similar a las del control, al finalizar el ensayo.

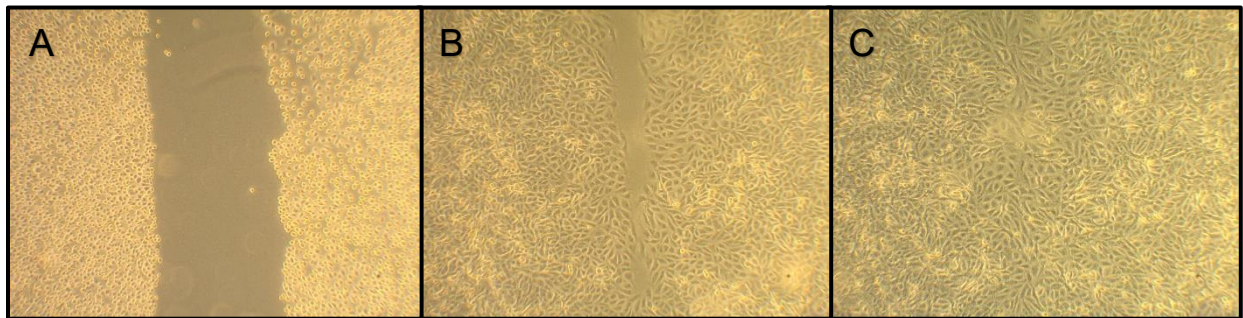


Figura 24. Representación de ensayo de herida con una concentración de 1 μM de PX. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

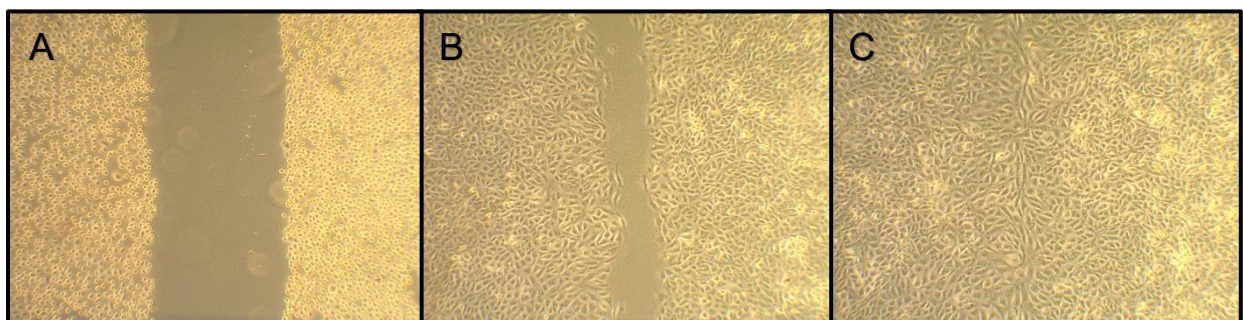


Figura 25. Representación de ensayo de herida con una concentración de 5 μM de PX. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

Los efectos de una concentración de 10 μM de PX en la migración de las células se pueden observar en la figura 26, con un cierre aproximado del 50% a las 24 horas y del 80% a las 48 horas. Por su parte, la figura 27 muestra estos efectos de manera más notable (comparando con lo observado en el control) al utilizar una concentración de 15 μM , resultado en un cierre de aproximadamente 50% a las 24 horas y 70% a las 48 horas.

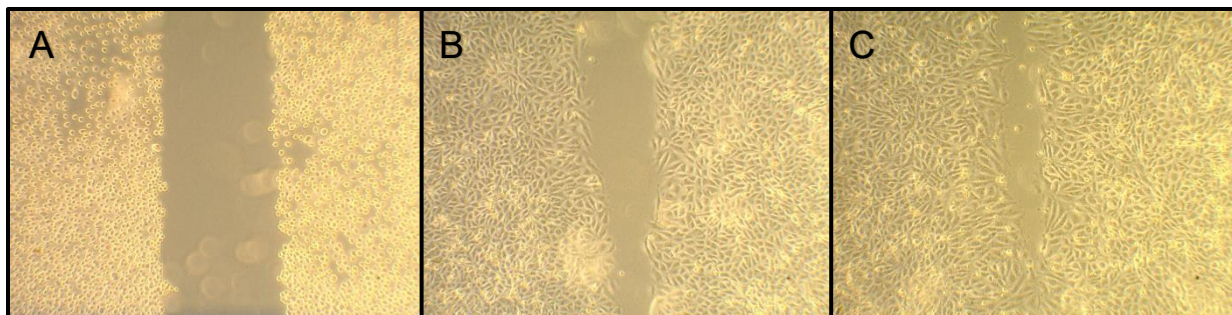


Figura 26. Representación de ensayo de herida con una concentración de 10 μM de PX. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

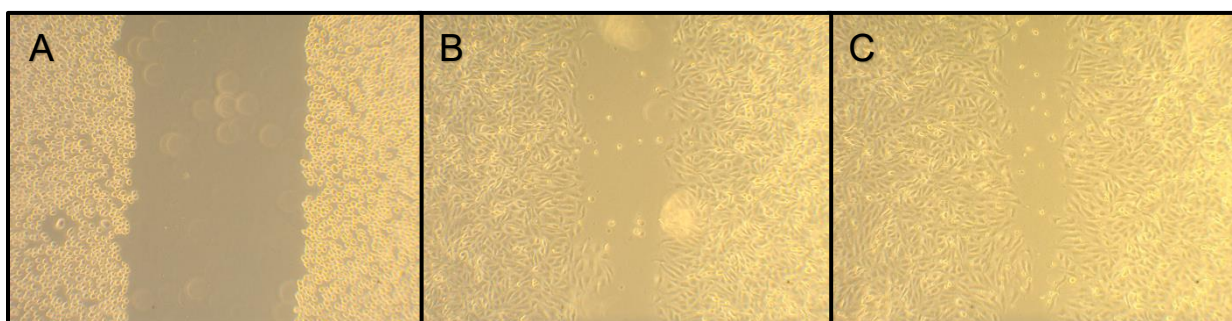


Figura 27. Representación de ensayo de herida con una concentración de 15 μM de PX. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

La figura 28 permite apreciar una representación de las células al ser expuestas a una concentración de 20 μM de PX, en estas imágenes las células alcanzaron un porcentaje de cierre cercano al 40% en 24 horas, y del 60% aproximadamente en 48 horas. Esto es muy diferente a lo observado en la figura 10 de las células control.

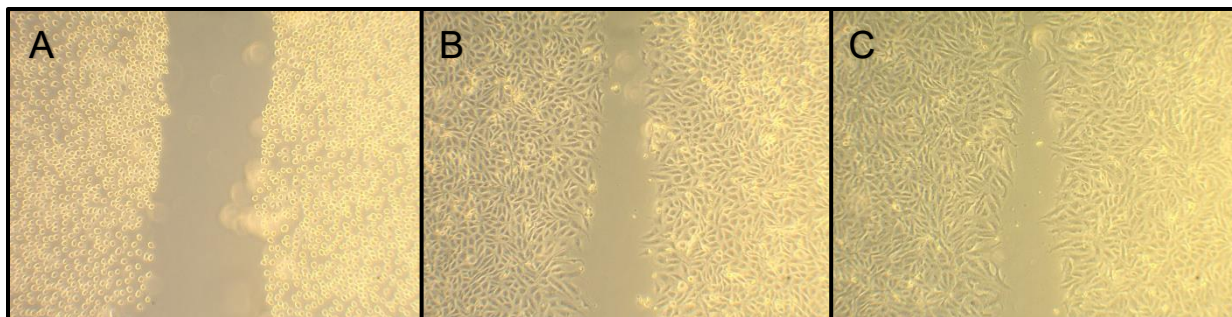


Figura 28. Representación de ensayo de herida con una concentración de 20 μM de PX. Células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Ensayo de herida a las (A) 0 horas, (B) 24 horas, y (C) 48 horas.

En los ensayos con paroxetina a las 24 horas de crear la raspadura (Fig. 29), las células en condiciones control positivo cerraron la herida un $69.9 \pm 12.8\%$. Los porcentajes de cierre para las concentraciones de 1 μM , 5 μM y 10 μM de paroxetina en el mismo tiempo fueron $67.9 \pm 14.4\%$, $59.2 \pm 11.3\%$ y $57.6 \pm 5.2\%$ respectivamente, ninguno de ellos representó una diferencia estadística respecto al control. Por otro lado, una concentración de 15 μM causó una reducción significativa ($p \leq 0.05$) en el cierre comparando con las células control, llegando a $55.6 \pm 4.9\%$. Las pruebas con 20 μM de PX dieron como resultado un valor igual a $55.8 \pm 6.0\%$, este grupo no presentó diferencia significativa comparado con el grupo control. Las células en condiciones control negativo resultaron con una diferencia significativa ($p \leq 0.001$) en el cierre, alcanzando un promedio de $40.7 \pm 6.7\%$.

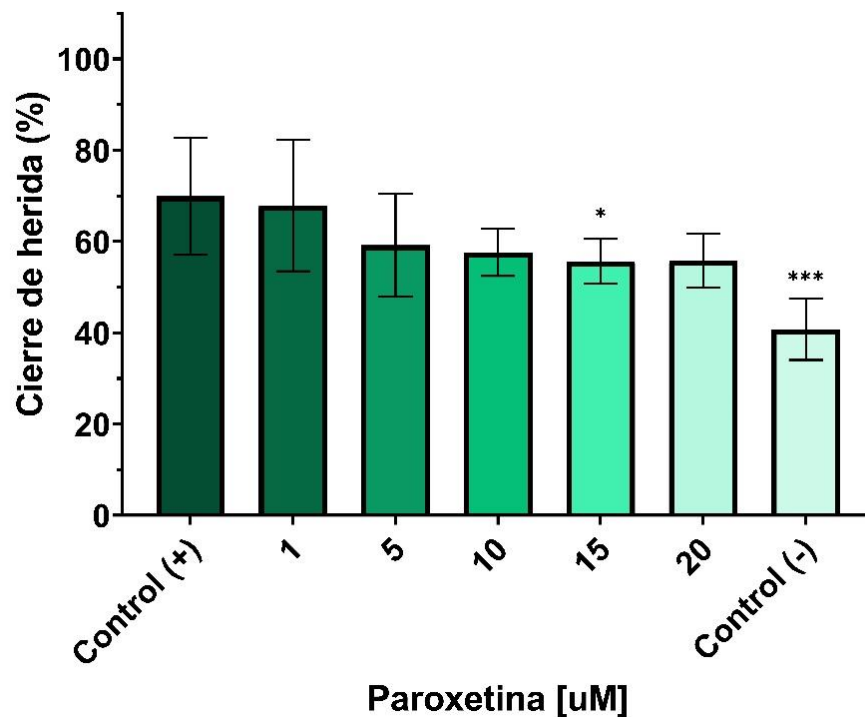


Figura 29. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de paroxetina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 horas de ensayo. Se estudiaron las siguientes condiciones experimentales: control positivo, PX 1 μ M, PX 5 μ M, PX 10 μ M, PX 15 μ M, PX 20 μ M, control negativo (n = 5). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de cierre en cada una de las condiciones. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, respecto a la media del control.

Para las pruebas con paroxetina después de 48 horas de comenzar el ensayo (Fig. 30), el grupo control obtuvo un porcentaje de cierre de herida igual a $94.8 \pm 4.5\%$. Las primeras dos concentraciones de PX utilizadas no resultaron en una diferencia significativa tras comparar con las células control, estas fueron 1 μ M y 5 μ M, siendo sus promedios $94.1 \pm 7.5\%$ y $90.5 \pm 8.8\%$, respectivamente. Las células tratadas con 10 μ M del compuesto vieron su migración reducida de manera significativa ($p \leq 0.05$), con un cierre de $85.5 \pm 4.0\%$. La diferencia respecto al control fue muy significativa ($p \leq 0.01$) al utilizar una concentración de 15 μ M, resultando en $79.9 \pm 4.6\%$. Mientras que el grupo expuesto a 20 μ M de PX alcanzó un cierre de $76.4 \pm 7.9\%$, logrando una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) al comparar con las células control. Finalmente, las células en

condiciones control negativo presentaron un cambio estadísticamente significativo ($p \leq 0.001$), con un valor de $44.3 \pm 6.7\%$.

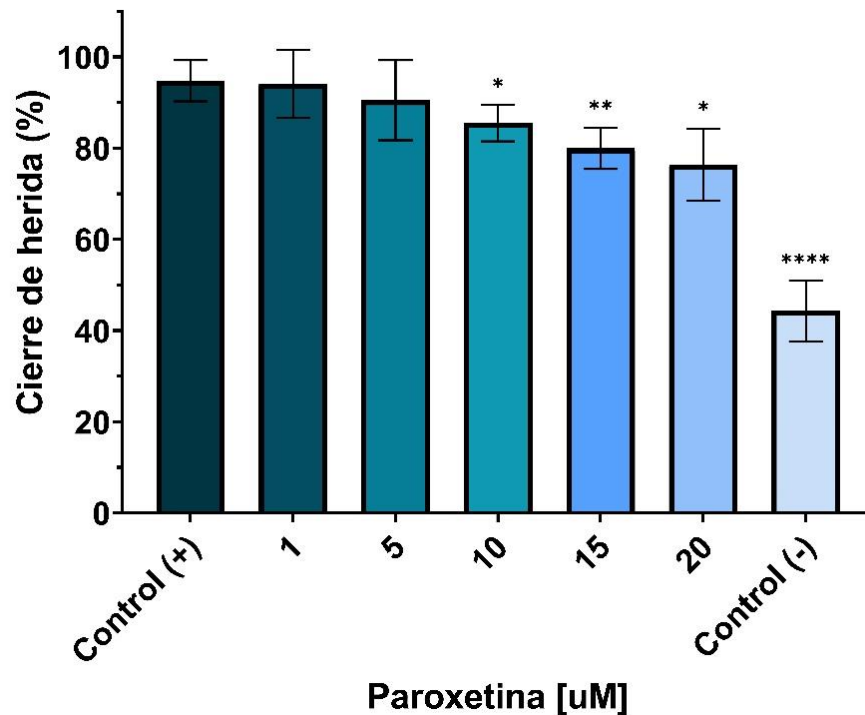


Figura 30. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de paroxetina en la línea celular MDA-MB-231 después de 48 horas de ensayo. Se estudiaron las siguientes condiciones experimentales: control positivo, PX 1 µM, PX 5 µM, PX 10 µM, PX 15 µM, PX 20 µM, control negativo (n = 5). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de cierre en cada una de las condiciones. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a la media del control.

En la figura 31 se comparan los resultados del porcentaje de cierre en ambos tiempos para el compuesto paroxetina. A las 24 horas, la única concentración de paroxetina que dio como resultado una diferencia estadística respecto al control fue la de 15 µM. La cantidad de concentraciones efectivas sobre la migración celular aumentó a las 48 horas, siendo 10 µM, 15 µM y 20 µM las que presentaron diferencias estadísticas relevantes. Las células control negativo presentaron diferencia significativa en ambos tiempos, siendo mayor a las 48 horas.

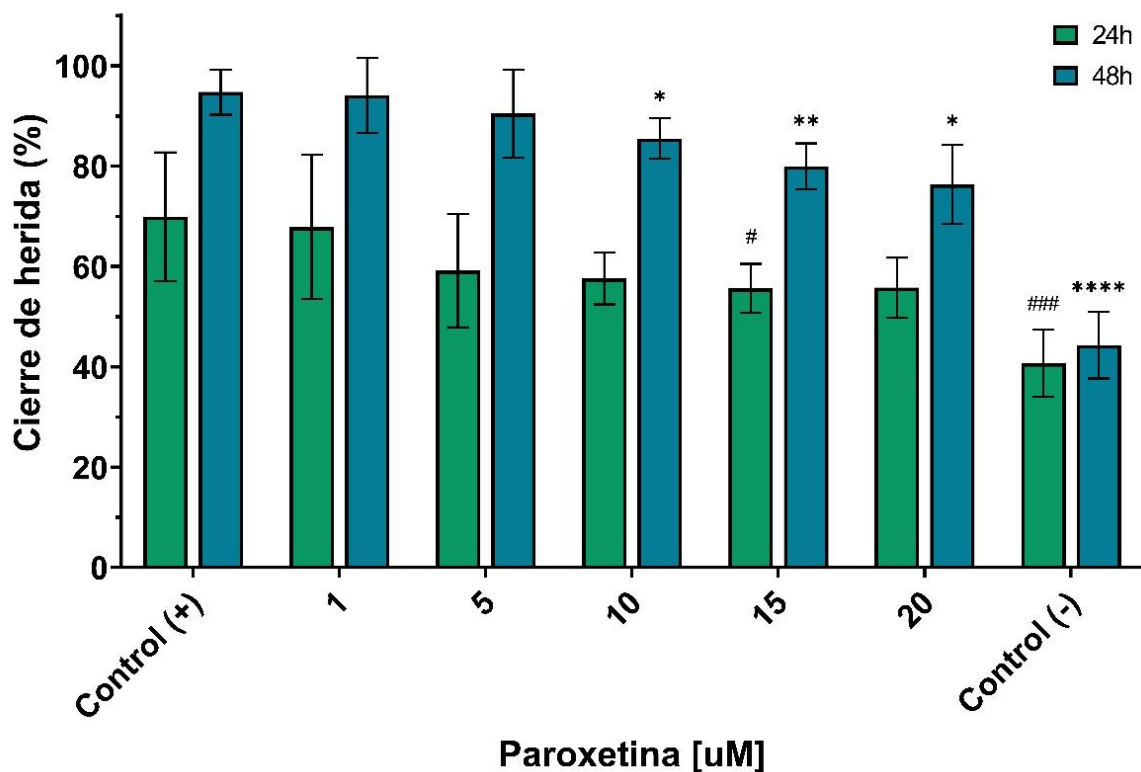


Figura 31. Comparación del porcentaje de cierre de herida en presencia de paroxetina en la línea celular MDA-MB-231 después de 24 y 48 horas de transcurrido el ensayo. Se estudiaron las siguientes condiciones experimentales: control positivo, PX 1 µM, PX 5 µM, PX 10 µM, PX 15 µM, PX 20 µM, control negativo (n = 5). Los datos se presentan como la media ± desviación estándar del porcentaje de cierre en cada una de las condiciones. # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.001$, respecto a la media del control a las 24 horas. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a la media del control a las 48 horas.

10.4. Ensayo de migración celular (Transwell)

Se llevó a cabo el ensayo de migración Transwell con la línea celular MDA-MB-231. Se realizaron pruebas en condiciones control positivo (DMEM sin fármaco con 5% de SFB), control negativo (DMEM sin fármaco y sin SFB), y con tratamiento de 5 µM y 7 µM de mefloquina, así como 10 µM y 15 µM de paroxetina (los fármacos en solución con 5% de SFB), finalizando en un tiempo de 48 horas.

En la figura 32 se presenta una imagen de cada condición experimental capturadas en la última etapa del ensayo. Lo que se muestra en color violeta son las células que

lograron migrar a través del inserto durante el tiempo de prueba. Se puede observar que en las condiciones control positivo la cantidad de células que realizaron migración es numerosa, abarcando un área superior al 85% de la zona capturada. Por el contrario, en las condiciones control negativo se observa una cantidad mínima de células que migraron a través del inserto.

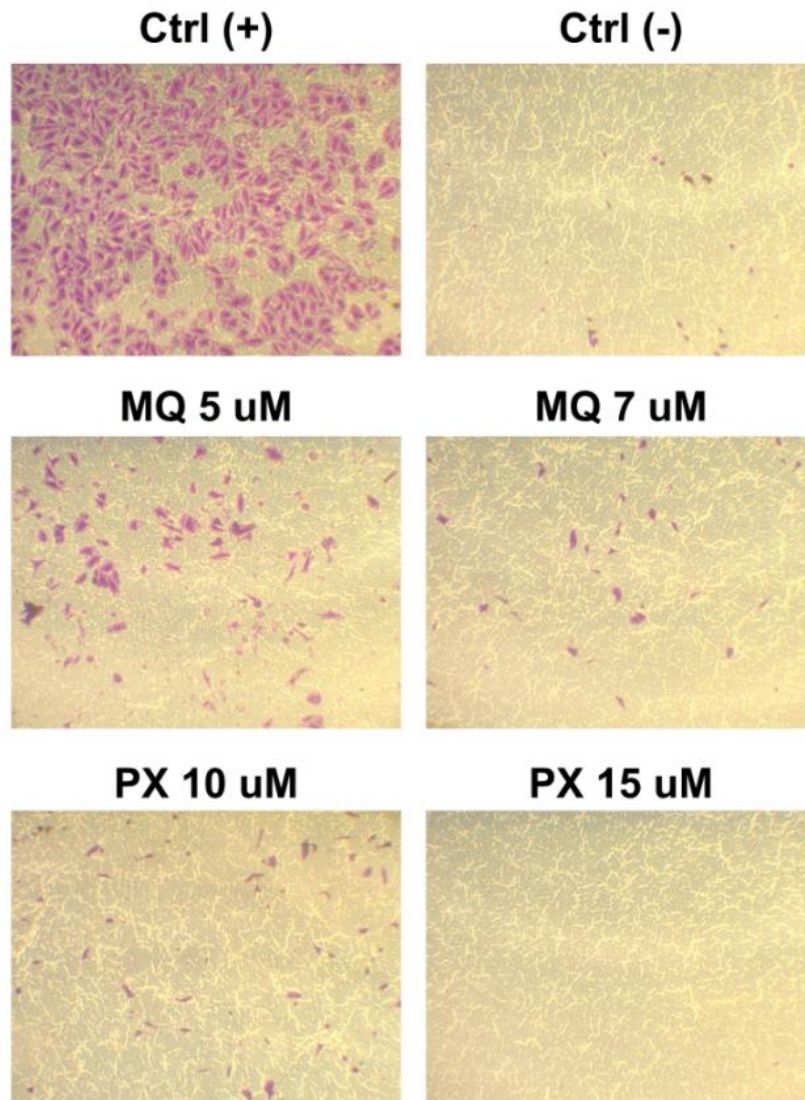


Figura 32. Representación de las células MDA-MB-231 que realizaron migración durante el ensayo Transwell en condiciones control positivo (sin fármaco, 5% SFB), control negativo (sin fármaco, 0% SFB), MQ 5 μ M, MQ 7 μ M, PX 10 μ M y PX 15 μ M (todos los fármacos en solución con 5% SFB). Las imágenes fueron capturadas en tres zonas distintas de cada cultivo utilizando una cámara acoplada a un microscopio invertido con un aumento de 5x.

Respecto a las imágenes correspondientes a los resultados en presencia de mefloquina, se observa una cantidad de células variable entre las concentraciones de 5 μM y 7 μM , siendo 5 μM la que presenta más células entre ellas, pero ambas cantidades menores a las que se muestran en las condiciones control positivo.

Con una concentración de paroxetina 10 μM , la cantidad de células en comparación a las condiciones control positivo se vio reducida notablemente, observándose solamente algunas decenas en la imagen del área representativa. Por su parte, en la imagen correspondiente a 15 μM de paroxetina no se logra observar ninguna célula.

Se calcularon los porcentajes de migración relativa a las células en condiciones control positivo (Fig. 33). Los valores obtenidos para mefloquina 5 μM y 7 μM fueron $23.1 \pm 4.2\%$ y $3.0 \pm 4.3\%$, respectivamente. Ambas concentraciones presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0.0001$).

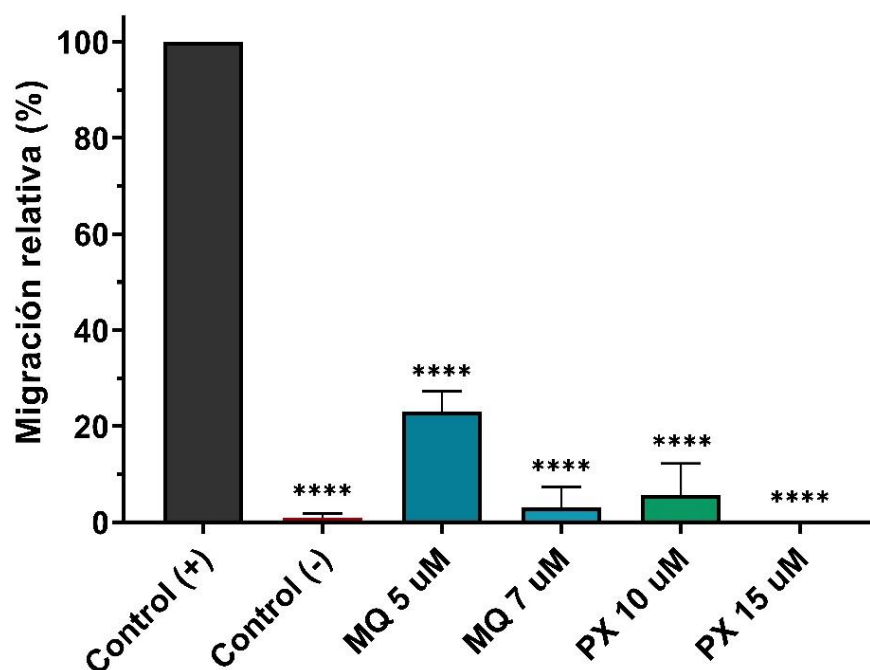


Figura 33. Porcentaje de migración celular de la línea celular MDA-MB-231 a las 48 horas de ensayo en Transwell. Se estudiaron las siguientes condiciones experimentales: control positivo, control negativo, MQ 5 μM , MQ 7 μM , PX 10 μM y PX 15 μM , $n = 2$. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de migración en cada una de las condiciones. **** $p \leq 0.0001$, respecto a la media del control.

En presencia de paroxetina 10 μM , las células redujeron drásticamente la migración, obteniéndose un $5.6 \pm 6.6\%$ de migración ($p \leq 0.0001$). Por su parte, la concentración de 15 μM de paroxetina impidió completamente la migración de las células, resultando en un 0% ($p \leq 0.0001$), en todas las zonas analizadas de los cultivos correspondientes. Las células en condiciones control negativo presentaron un porcentaje extremadamente bajo de migración, $0.97 \pm 0.84\%$, tal como se esperaba.

11. Discusión

En el presente trabajo de investigación, hemos encontrado que mefloquina reduce la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231 de manera dependiente de la concentración. En donde el efecto es mayor conforme aumenta la cantidad del compuesto, ya que las concentraciones iguales o menores a 10 μM dieron como resultado un efecto muy similar al de las células en condiciones control, observándose el primer cambio significativo a partir de la concentración de 15 μM .

La IC_{50} de 15.48 μM que se obtuvo tras la experimentación durante 48 horas, coincide con los estudios de Sharma y colaboradores (2012), quienes reportaron pronunciada actividad anticancerígena por parte de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231, con una IC_{50} para la viabilidad celular dentro del rango de 10 a 15 μM a las 48 horas de agregar el fármaco, mediante el ensayo de MTT.

De manera similar, se encontró que paroxetina inhibe de manera significativa la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231, mostrando un efecto mayor conforme aumenta la concentración del fármaco. Entre las concentraciones evaluadas, la disminución en la viabilidad celular se presentó a partir de 50 μM , pero es muy probable que la viabilidad se pueda ver afectada significativamente en concentraciones que se encuentren entre 30 μM y 50 μM (no evaluadas experimentalmente en este trabajo), debido a que la IC_{50} resultó de 34.07 μM a las 48 horas de exposición al compuesto. Lo anterior se podría sustentar al observar la pendiente pronunciada de la curva en la figura 9.

La concentración efectiva media obtenida de paroxetina difiere de lo presentado por Huang y colaboradores (2024), quienes reportaron una IC_{50} igual a 19.38 μM después de 48 horas de exposición a paroxetina en la línea MDA-MB-231. Esta discrepancia se podría atribuir a la metodología utilizada para el ensayo MTT, la cual suele variar entre diversos estudios, o a las condiciones experimentales (variabilidad celular debido al número de resiembras). Por su parte, Cho y colaboradores (2019) mediante un análisis del ciclo celular reportaron que un tratamiento con 30 μM de paroxetina durante 12 horas indujo apoptosis en las células MDA-MB-231. En ese mismo trabajo, evaluaron la viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama positivo a estrógeno MCF-7 y determinaron una IC_{50} de 30 μM de paroxetina utilizando el ensayo MTT, aunque su

tiempo de exposición fue de 24 horas, concluyeron una dependencia de concentración. La investigación de Jang (2019) en líneas celulares de cáncer de colon reveló que la paroxetina también disminuye la viabilidad celular de manera concentración-dependiente con una IC_{50} de 13.50 μM (48h) en las células HCT116 y de 7.01 μM (48h) en las células HT29, estos datos fueron obtenidos mediante el ensayo de MTT. Contrastando los resultados experimentales antes descritos, se destaca que paroxetina afecta la viabilidad celular en células tumorales y que dicho comportamiento es dependiente de la concentración, en donde la concentración efectiva puede variar según el tiempo de exposición y el tipo de línea celular.

Los resultados obtenidos sobre la viabilidad de la línea celular después de la exposición experimental individual a cada fármaco, nos indican que mefloquina presenta una mayor citotoxicidad en comparación con paroxetina en la línea MDA-MB-231, ya que se requiere una menor concentración para lograr el 50% de la reducción en la viabilidad celular a las 48 horas de tratamiento, 15.48 μM contra 34.07 μM , respectivamente.

Para determinar si la aplicación combinada de mefloquina y paroxetina genera cambios en la viabilidad celular respecto a los efectos individuales de los fármacos, se llevó a cabo un análisis de la exposición combinada de las células a diferentes concentraciones de mefloquina y paroxetina. Se encontró que la combinación de ambos fármacos reduce de manera significativa la viabilidad celular en la línea MDA-MB-231 a concentraciones más bajas, comparadas con las concentraciones efectivas de los fármacos por separado.

Las combinaciones de 3 μM de MQ con 10 μM de PX, 5 μM de MQ con 5 μM de PX y 5 μM de MQ con 10 μM de PX, tras 48 horas de exposición, causaron una viabilidad celular por debajo del 50% respecto a las células en condiciones control. Contrastando con los resultados obtenidos de la aplicación individual de los fármacos, se necesitó una concentración mayor o igual a 15 μM de mefloquina para reducir la viabilidad con la misma eficacia que la aplicación combinada; así como una concentración mayor a 30 μM en el caso de paroxetina; por lo tanto, la aplicación combinada de ambos compuestos redujo con mayor efectividad la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231.

Las combinaciones de concentraciones más altas resultaron en una viabilidad muy similar a la que se obtuvo con la combinación de 5 μM de MQ y 10 μM de PX (15.5%), por lo que se consideró este punto como referencia de la viabilidad mínima obtenida.

Tras observar el efecto potenciado de los fármacos en combinación, el análisis para determinar el tipo de interacción entre los compuestos utilizando el software de *SynergyFinder*, dio como resultado un puntaje de sinergia de 12.791, según el modelo de referencia ZIP. En donde, un puntaje menor a -10 indica probabilidad de que la interacción entre ambos fármacos sea antagonista, si resulta entre -10 y 10 es probable que la interacción entre ambos fármacos sea aditiva, mientras que un puntaje mayor a 10 indica que es probable que la interacción entre ambos fármacos sea sinérgica. Por lo tanto, el puntaje obtenido de 12.791 revela la probabilidad de una relación de tipo sinérgica entre mefloquina y paroxetina sobre la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231. Es decir, al comparar el cambio de potencia entre las curvas concentración-efecto de los fármacos individuales con la de sus combinaciones, se obtuvo en promedio un 12.79% de respuesta más allá de la esperada.

Se tomó la decisión de calcular el puntaje de sinergia utilizando el modelo de referencia ZIP, por ser considerado uno de los más robustos y precisos, buscando una evaluación sistemática de varios tipos de patrones de interacciones farmacológicas. El puntaje de sinergia obtenido tras la experimentación demuestra que existe una posible interacción entre mefloquina y paroxetina, la cual provoca un aumento en la reducción en la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231, en comparación con los efectos producidos por cada compuesto de manera individual. Es decir, no se observó solamente la suma de los resultados de cada fármaco, como hubiera sucedido en un caso de interacción aditiva, sino que la reducción en viabilidad fue superior. Las posibles razones detrás del sinergismo se describirán más adelante.

Se realizaron ensayos de viabilidad celular con MTT en células HUVEC (ver anexo A) con la finalidad de evaluar la citotoxicidad de mefloquina y paroxetina en células no tumorales. Sin embargo, ambos compuestos mostraron una reducción significativa en la viabilidad celular a concentraciones más bajas en HUVEC, comparado con lo observado en la línea celular MDA-MB-231. Mefloquina causó una reducción significativa ($p \leq 0.001$)

en la viabilidad celular de HUVEC a partir de una concentración de 5 μM (Fig. A1 en anexos); paroxetina ocasionó reducción significativa ($p \leq 0.05$) a partir de 15 μM (Fig. A2 en anexos). El efecto aumentado observado en las células HUVEC puede estar relacionado con los hallazgos reportados por distintos grupos de trabajo; Andrikopoulos y colaboradores (2011), demostraron la presencia y actividad de canales iónicos dependientes de voltaje, mayormente Nav1.5, en HUVEC a niveles comparables con la línea MDA-MB-231. Si los fármacos mefloquina y paroxetina actúan sobre los canales iónicos (como se ha descrito y se discutirá más adelante), esta acción podría ser la responsable de afectar a las HUVEC.

Las células endoteliales no fueron las adecuadas para evaluar la selectividad de los fármacos en células no tumorales. Un modelo no tumoral más apropiado podría ser la línea MCF10A, células epiteliales de tejido mamario humano, debido a que comparten el tipo de tejido con la línea celular MDA-MB-231, lo que permitiría realizar una comparación más adecuada. Retomando la investigación de Cho (2019), en la que se realizaron pruebas con paroxetina, otra de las líneas celulares analizadas mediante el ensayo MTT fue precisamente la MCF-10A, sobre la cual reportaron una disminución significativa en la viabilidad celular al ser tratada con 10 μM y 30 μM de PX durante 48 horas; sin embargo, este efecto fue menor en comparación a las células tumorales. En el trabajo de Huang (2024) también se determinó una citotoxicidad reducida (en comparación a la línea MDA-MB-231) al tratar a las células MCF-10A con un rango de concentraciones de 5 μM a 30 μM de paroxetina en periodos de 24, 48 y 72 horas. Respecto a mefloquina, no existen reportes de su efecto sobre la línea MCF-10A. Profundizar en el análisis del efecto de mefloquina y paroxetina sobre una línea celular epitelial de tejido mamario humano podría aportar avances significativos en las investigaciones del cáncer de mama triple negativo.

Para las pruebas de migración celular, se tomó la decisión de utilizar únicamente aquellas concentraciones que no mostraron cambios significativos en los ensayos de viabilidad celular, esto con la finalidad de poder atribuir las diferencias en los cierres de herida al fenómeno de migración y no a la falta de células viables.

De manera general durante los ensayos de cierre de herida con mefloquina, las células llevaron a cabo la mayoría de su migración (en términos de porcentaje) durante las primeras 24 horas, pero la proporción entre las condiciones experimentales y control positivo se mantuvo muy similar en ambos registros de tiempo (24 y 48 horas). Esto se refuerza con el hecho de que, en ambos tiempos registrados para evaluar la migración celular, las dos concentraciones de mefloquina que resultaron en una diferencia significativa respecto a las condiciones control positivo fueron 7 μM y 10 μM , con efectos similares entre sí (56% y 59% de cierre, respectivamente a las 24 horas; 80% y 78% de cierre, respectivamente a las 48 horas). Esto nos podría indicar una posible constante en el movimiento de las células MDA-MB-231 para llevar a cabo el cierre de herida a pesar de las distintas condiciones.

Recordando que la IC_{50} para reducir la viabilidad celular con mefloquina en la línea MDA-MB-231 a las 48 horas resultó ser 15.48 μM , es relevante resaltar que se necesita menos de la mitad de dicha concentración para reducir de manera significativa la migración celular a las 48 horas, considerando los resultados con 7 μM de mefloquina.

Al comparar los porcentajes de cierre de herida de las diferentes concentraciones utilizadas, se observó un efecto inhibitor dependiente de concentración sobre la migración celular de la línea MDA-MB-231 conforme se aumenta la concentración de mefloquina, tanto a las 24, como a las 48 horas de tratamiento. No existen reportes previos sobre mefloquina en estudios de migración celular.

En las pruebas de cierre de herida a las 24 horas con paroxetina, solamente una concentración presentó cambios significativos respecto al control, la cual fue 15 μM . Estos resultados se ven influenciados por las desviaciones estándar de cada condición, las cuales provocan que los resultados de la mayoría de tratamientos sean similares al control positivo en términos del análisis estadístico, a pesar de las diferencias en los promedios de cierre de herida.

Por su parte, un tratamiento de 48 horas con paroxetina dio como resultado una diferencia significativa en el cierre de herida a concentraciones iguales o mayores a 10 μM . La concentración que mostró una disminución estadísticamente más significativa fue la de 15 μM , a pesar de mostrar resultados similares con 20 μM ($79.9 \pm 4.6\%$ y $76.4 \pm$

7.9%, respectivamente). No obstante, la ligera diferencia encontrada puede ser debido a que la concentración de 20 μM cuenta con una mayor desviación estándar, y eso puede estar afectando el análisis estadístico. Considerando que se obtuvo una IC_{50} de 34.07 μM para reducir la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 a las 48 horas con paroxetina, se requiere menos de un tercio de concentración (10 μM) para reducir de manera significativa la migración celular a las 48 horas.

De acuerdo a lo encontrado con este ensayo, al comparar los promedios de porcentaje de cierre de herida, se observa que paroxetina inhibe la migración celular de la línea MDA-MB-231 de manera dependiente de concentración, a las 24 y 48 horas de exposición. No hay estudios previos de migración celular utilizando paroxetina.

Al contrastar el efecto de mefloquina y paroxetina, se puede destacar que se requiere una menor concentración de mefloquina que de paroxetina para obtener un cambio significativo en la migración celular, respecto a las condiciones control, en la línea MDA-MB-231, tanto a las 24 como a las 48 horas de exposición a fármaco.

En el ensayo de migración Transwell, los resultados fueron contundentes para todas las condiciones experimentales. Ambos fármacos, mefloquina y paroxetina, generaron una reducción en la migración celular de la línea MDA-MB-231 dependiente del aumento de concentración, después de 48 horas de tratamiento. El porcentaje de migración respecto a las condiciones control positivo no superó el 25% en ninguno de los casos.

En el caso de los ensayos experimentales de migración Transwell con mefloquina, se decidió estudiar la concentración más baja que había mostrado resultados de reducción en el porcentaje de cierre de herida (7 μM); tras observar de manera preliminar que el porcentaje de migración era mínimo, se tomó la decisión de explorar una concentración más baja, 5 μM , la cual redujo significativamente la migración celular con respecto al control, a diferencia de los resultados obtenidos con esa misma concentración en el ensayo de cierre de herida. Con paroxetina se obtuvo un comportamiento similar, las dos concentraciones empleadas para el ensayo (10 μM y 15 μM) presentaron una migración mucho más baja que sus correspondientes en el ensayo de herida. En el caso de 15 μM de PX, la migración fue nula. Al momento de realizar el ensayo de Transwell, 15 μM de PX había sido la concentración más baja que presentaba reducción en el cierre de herida,

razón por la cual se realizaron las pruebas con dicha concentración. Al observar de manera preliminar que la migración era mínima, se redujo a una concentración de 10 μM de paroxetina.

Aunque ambos métodos, cierre de herida y Transwell, se utilizan para medir la migración celular, estos varían en cuanto a mecanismo y sensibilidad. El cierre de herida puede ser más lento y menos sensible a cambios sutiles en la capacidad migratoria, además de involucrar la reorganización colectiva de las células. Por su parte, el ensayo Transwell es más específico para la migración activa de células individuales o pequeños grupos, suele ser más sensible a inhibidores del citoesqueleto, canales iónicos, adhesión, entre otros. Por lo tanto, si mefloquina y paroxetina interfieren con los mecanismos de migración antes mencionados, el Transwell lo detectará antes que el cierre de herida.

De acuerdo a lo encontrado en este trabajo, sobre la inhibición de los diferentes mecanismos celulares (viabilidad y migración celular) debido a la aplicación de mefloquina en la línea celular MDA-MB-231, podría ser debido a su influencia en diferentes procesos de transducción de señales; los cuales se detallan a continuación.

Uno de estos procesos puede ser la ruta de PI3K (fosfatidilinositol-3-cinasa)/Akt/mTOR (blanco de la rapamicina en mamíferos), la cual está involucrada en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y supervivencia. La vía de PI3K frecuentemente se encuentra desregulada en el cáncer de mama, incluyendo en el subtipo triple negativo, induciendo transformación celular y consecuentemente la formación y progresión de tumores (Khan et al., 2019). Se ha reportado previamente que mefloquina reduce progresivamente la fosforilación de tirosina-199 de PI3K, serina-473 de Akt y serina-2481 de mTOR. La capacidad de mefloquina para interferir en las vías de señalización depende de las actividades moduladas de varias cinasas y fosfatasas. Aunque la causa exacta de este fenómeno no se conoce por completo, se puede plantear que mefloquina podría estar alterando la especificidad y sensibilidad de las cinasas y fosfatasas a sus sustratos (Ghosh et al., 2021).

Además, diversos estudios como el de Wang y colaboradores (2019) han revelado que los canales de potasio dependientes de voltaje, específicamente el canal Kv11.1, estimulan la vía PI3K/Akt, generando un incremento en la proliferación, inhibiendo

apoptosis y favoreciendo la transición epitelial-mesenquimal. Lo anterior no solo podría explicar la reducción en viabilidad por parte de mefloquina, sino también la reducción en la migración celular, al bloquear los canales de potasio dependientes de voltaje y evitar la estimulación de la ruta PI3K/Akt/mTOR, disminuyendo la progresión de los mecanismos que favorecen a los tumores.

Otra ruta que se ha asociado con el canal Kv11.1 es la de Wnt/ β -catenina, al interactuar con β 1-integrina, el mayor contribuidor en la señalización de adhesión celular. Las integrinas son receptores transmembrana involucrados en la adhesión matriz-célula, por lo que intervienen principalmente en la migración e invasión celular, sobre todo en el proceso de EMT (He et al., 2020). Al bloquear los canales de potasio con mefloquina, se alteraría la regulación que estos tienen sobre las integrinas, generando la reducción en la capacidad migratoria de las células.

De manera similar con paroxetina, Jang y colaboradores (2019) demostraron que el tratamiento de este antidepresivo en células de cáncer de colon suprime la vía de señalización MAPK/ERK. Esta ruta es responsable de controlar diversos procesos como la proliferación celular, diferenciación, supervivencia, invasión, migración y angiogénesis, así como la transición epitelial-mesenquimal. Si paroxetina tiene este mismo efecto en células de cáncer de mama, podría ser una explicación de la inhibición en la viabilidad y migración celular observada en esta investigación.

Erdogan y asociados (2023) descubrieron que el silenciamiento del canal Nav1.5 y su variante nNav1.5 causa una reducción significativa en la viabilidad, migración e invasión de las células MDA-MB-231; igualmente reportaron una disminución en la expresión de p-ERK en la misma línea celular, estableciendo una relación entre los canales antes mencionados y la vía de señalización de ERK.

Al unir los resultados de estos estudios se reforzaría la idea de que, al existir una inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje por parte de paroxetina, reportado en investigaciones como la de Plijter (2023), se disminuye la actividad alterada de la vía MAPK/ERK, generando la reducción en la viabilidad y migración de la línea celular MDA-MB-231.

De acuerdo a los antecedentes en cuanto a la relación de estos fármacos con la función y expresión de los canales iónicos en la membrana celular, se podrían hipotetizar mecanismos de acción que asocien el efecto de mefloquina sobre canales de potasio dependientes de voltaje; y de paroxetina sobre los canales de sodio dependientes de voltaje; en donde, a pesar de actuar sobre diferentes tipos de canales, es altamente probable que modifiquen de manera conjunta la homeostasis iónica de las células tumorales cuando se administran en combinación, disminuyendo en gran medida los beneficios que el flujo iónico desregulado brinda a las células cancerígenas (Fig. 34).

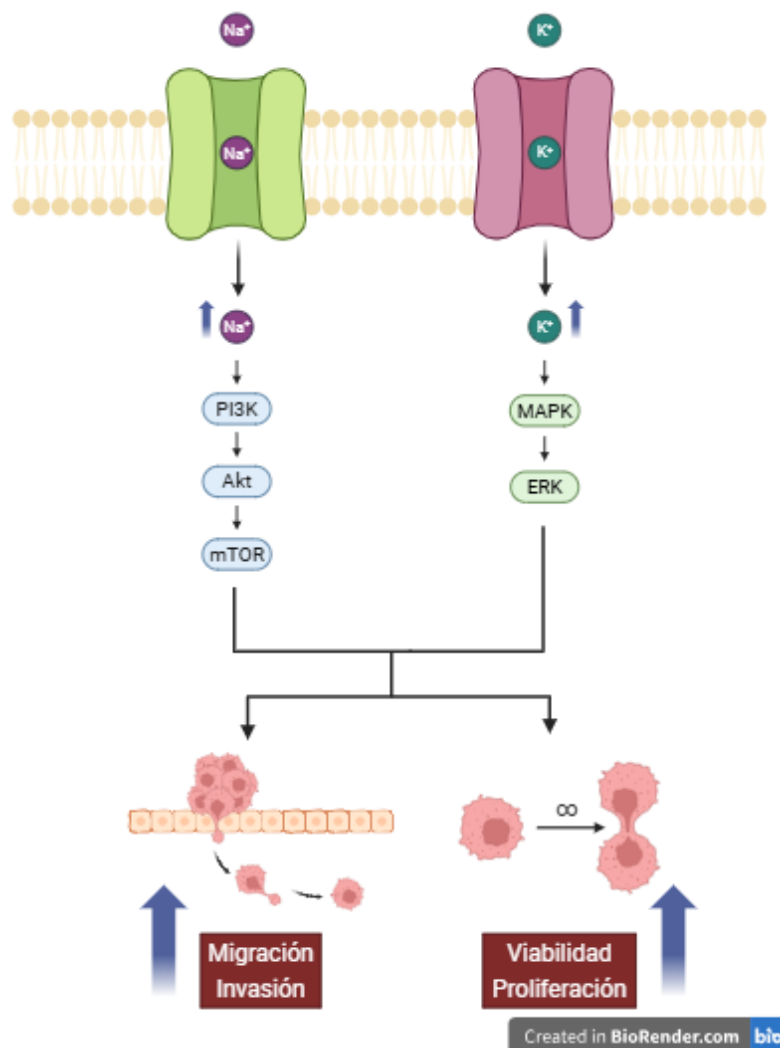


Figura 34. Modelo hipotético en el que la actividad aberrante de canales iónicos dependientes de voltaje (sodio y potasio) promueve la supervivencia, proliferación, migración e invasión en las células de cáncer de mama triple negativo, mediante las vías de señalización de PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK, según lo descrito en la literatura.

Si se considera la posibilidad de inhibir de manera simultánea las vías PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK, las cuales actúan sobre mecanismos celulares similares, aumentan las limitaciones para las células de cáncer triple negativo. Si se bloquea una ruta, las células de cáncer buscarán rutas alternas para reemplazar su rol; al bloquear dos rutas, la supervivencia y motilidad de las células quedan más comprometidas (Fig. 35). Lo anterior se traduce al efecto sinérgico observado entre mefloquina y paroxetina en esta investigación.

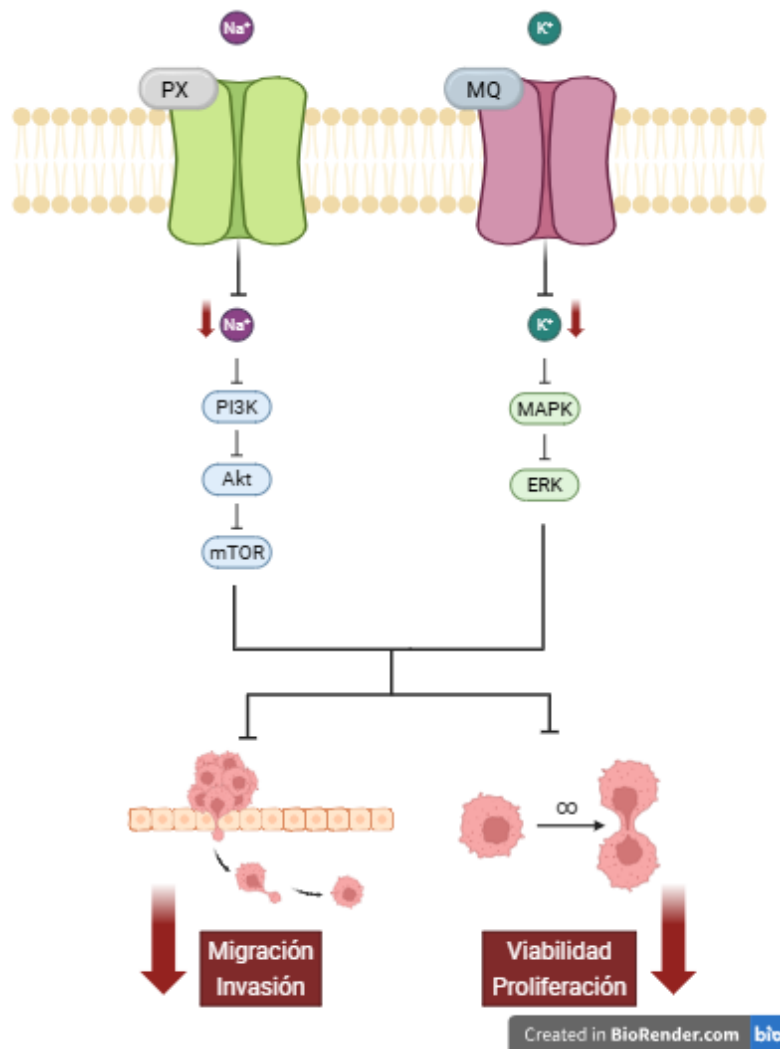


Figura 35. Modelo hipotético en el que mefloquina y paroxetina inhiben la actividad aberrante de canales iónicos dependientes de voltaje (sodio y potasio), lo que disminuye la supervivencia, proliferación, migración e invasión en las células de cáncer de mama triple negativo, al afectar las vías de señalización de PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK, según los efectos observados en la experimentación y lo descrito en literatura.

Los resultados obtenidos en esta investigación han presentado el potencial de los fármacos mefloquina y paroxetina de inhibir la viabilidad y migración celular de las células de cáncer de mama triple negativo. Al ser fármacos ya conocidos, la seguridad y eficacia de los mismos en el cuerpo humano han sido probadas, por lo que una readaptación hacia tratamientos anticancerígenos sería un proceso más rápido y económico que desarrollar fármacos desde cero. Un factor importante si consideramos que actualmente no existe un tratamiento especializado para el cáncer de mama triple negativo y las personas que sufren de este padecimiento incrementan año con año.

Según reportes como el de Vieira (2016), mefloquina puede alcanzar una concentración plasmática máxima en humanos de 3300 ng/mL después de un tratamiento estandarizado contra la malaria. Considerando el peso molecular de la mefloquina, sería el equivalente a 8.73 μM , una concentración superior a la obtenida como efectiva en nuestros ensayos de migración celular tanto en cierre de herida (7 μM) como Transwell (5 μM), resaltando así su importancia clínica. Por otro lado, el rango de concentraciones plasmáticas en pacientes tratados con paroxetina es de 20 a 60 ng/mL, es decir, de 0.06 a 0.2 μM . Las concentraciones efectivas en este trabajo de investigación fueron muy superiores (10 μM fue la concentración efectiva más baja en migración celular), por lo que su relevancia clínica es limitada. No obstante, los resultados son útiles para generar hipótesis y comprender interacciones celulares que podrían guiar estudios preclínicos adicionales.

A pesar de lo obtenido, para demostrar que el uso de mefloquina y paroxetina, ya sea de manera individual, en combinación, o incluso en conjunto con tratamientos convencionales, sería favorable para los pacientes que padecen cáncer de mama triple negativo, es necesario realizar análisis más profundos. Esto incluye desde ensayos de apoptosis, angiogénesis y proliferación *in vitro*, hasta experimentación *in vivo*, acompañados de ensayos clínicos, con la finalidad de definir la eficacia de los compuestos con más detalle, además de considerar las ventajas y desventajas que su aplicación conllevaría. Una comprensión exhaustiva de los mecanismos detrás de los inhibidores de canales iónicos con propiedades anticancerígenas resultaría altamente beneficiosa para la prevención y tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

12. Conclusiones

Mefloquina inhibe la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 de manera dependiente de concentración con una IC_{50} de 15.48 μM a 48 horas de exposición. Paroxetina produce el mismo efecto con una concentración de 34.07 μM .

El tratamiento combinado de mefloquina y paroxetina causa una reducción significativa en la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 a concentraciones menores que las observadas de manera individual a las 48 horas de tratamiento. Un análisis de sinergia en *Synergyfinder* indicó una interacción de tipo sinérgica entre ambos fármacos con un puntaje de 12.791.

Se reporta por primera vez que mefloquina y paroxetina inhiben la migración celular de la línea MDA-MB-231 conforme se aumenta la concentración. Utilizando el ensayo de cierre de herida, las concentraciones efectivas de mefloquina fueron 7 μM y 10 μM , tanto a 24 como a 48 horas de exposición. De igual manera, paroxetina inhibe el cierre de herida de esta línea de cáncer de mama triple negativo con una concentración de 15 μM a las 24 horas y de 10 μM , 15 μM y 20 μM a las 48 horas. Tras los ensayos de migración con Transwell, se concluye que mefloquina inhibe la migración celular de la línea MDA-MB-231 a partir de una concentración de 5 μM , mientras que paroxetina lo hace a partir de una concentración de 10 μM .

Es relevante profundizar en el estudio de los canales iónicos dependientes de voltaje y su papel en el cáncer, así como seguir explorando las interacciones entre los fármacos inhibidores de canales como mefloquina y paroxetina y las células cancerígenas. Determinar con detalle su mecanismo en los procesos tumorales puede ser un punto clave para combatir de manera eficaz la metástasis del cáncer de mama triple negativo.

13. Perspectivas

Para dar seguimiento a los avances obtenidos en este trabajo y profundizar en la investigación sobre la relación entre el cáncer de mama, los canales iónicos dependientes de voltaje y los compuestos inhibidores de canales iónicos, es importante llevar a cabo diversos estudios.

Se podrían realizar ensayos de electrofisiología y fluorescencia sobre las células de cáncer de mama triple negativo para medir la actividad de canales iónicos en ausencia y presencia de mefloquina y paroxetina, lo que podría ayudar a determinar con mayor detalle el efecto de estos fármacos sobre los canales en las células.

Llevar a cabo la técnica de *Western Blot* para detectar proteínas de los canales en las células MDA-MB-231, así como proteínas relacionadas con las vías de señalización que podrían verse afectadas por la presencia de mefloquina y paroxetina permitiría dilucidar la manera en la que actúan estos compuestos sobre los mecanismos de viabilidad y migración celular en las células de cáncer de mama triple negativo.

Realizar pruebas con un modelo no tumoral como la línea MCF10A ayudaría a determinar la selectividad de mefloquina y paroxetina sobre células cancerígenas y no cancerígenas con las concentraciones efectivas en los ensayos de viabilidad y migración celular.

14. Referencias bibliográficas

- Almansour, N. M. (2022). Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. En *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.836417>
- Andrikopoulos, P., Fraser, S. P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D., Diss, J. K. J., Box, C., Eccles, S. A., & Djamgoz, M. B. A. (2011). Angiogenic functions of voltage-gated Na⁺ channels in human endothelial cells: Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16846–16860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187559>
- Angus, M., & Ruben, P. (2019). Voltage gated sodium channels in cancer and their potential mechanisms of action. En *Channels* (Vol. 13, Número 1, pp. 400–409). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1666455>
- Arroyo-Crespo, J. J., Armiñán, A., Charbonnier, D., Deladriere, C., Palomino-Schätzlein, M., Lamas-Domingo, R., Forteza, J., Pineda-Lucena, A., & Vicent, M. J. (2019). Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *International Journal of Cancer*, 145(8), 2267–2281. <https://doi.org/10.1002/ijc.32270>
- Bailleux, C., Eberst, L., & Bachelot, T. (2021). Treatment strategies for breast cancer brain metastases. En *British Journal of Cancer* (Vol. 124, Número 1, pp. 142–155). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01175-y>
- Buyuk, B., Jin, S., & Ye, K. (2022). Epithelial-to-Mesenchymal Transition Signaling Pathways Responsible for Breast Cancer Metastasis. En *Cellular and Molecular Bioengineering* (Vol. 15, Número 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12195-021-00694-9>
- Chen, S., bin Abdul Rahim, A. A., Mok, P., & Liu, D. (2023). An effective device to enable consistent scratches for in vitro scratch assays. *BMC Biotechnology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-023-00806-5>

- Chen, W., Hoffmann, A. D., Liu, H., & Liu, X. (2018). Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. En *npj Precision Oncology* (Vol. 2, Número 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0>
- Cho, Y. W., Kim, E. J., Nyiramana, M. M., Shin, E. J., Jin, H., Ryu, J. H., Kang, K. R., Lee, G. W., Kim, H. J., Han, J., & Kang, D. (2019). Paroxetine induces apoptosis of human breast cancer MCF-7 Cells through Ca²⁺ -and p38 MAP kinase-dependent ROS generation. En *Cancers* (Vol. 11, Número 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11010064>
- Costa, B., Amorim, I., Gärtner, F., & Vale, N. (2020). Understanding Breast cancer: from conventional therapies to repurposed drugs. En *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 151). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105401>
- da Silva, J. L., Cardoso Nunes, N. C., Izetti, P., de Mesquita, G. G., & de Melo, A. C. (2020). Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. En *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 145). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.102855>
- Diori Karidio, I., & Sanlier, S. H. (2021). Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. En *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* (Vol. 33, Número 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s43046-021-00088-y>
- Djamgoz, M. B. A. (2022). Combinatorial Therapy of Cancer: Possible Advantages of Involving Modulators of Ionic Mechanisms. En *Cancers* (Vol. 14, Número 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14112703>
- Djamgoz, M. B. A., Fraser, S. P., & Brackenbury, W. J. (2019). In vivo evidence for voltage-gated sodium channel expression in carcinomas and potentiation of metastasis. En *Cancers* (Vol. 11, Número 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11111675>
- Doray, A., Lemoine, R., Severin, M., Chadet, S., Lopez-Charcas, O., Héraud, A., Baron, C., Besson, P., Monteil, A., Pedersen, S. F., & Roger, S. (2021). The voltage-gated

sodium channel beta4 subunit maintains epithelial phenotype in mammary cells. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071624>

Dutta, S., Lopez Charcas, O., Tanner, S., Gradek, F., Driffort, V., Roger, S., Selander, K., Velu, S. E., & Brouillette, W. (2018). Discovery and evaluation of nNav1.5 sodium channel blockers with potent cell invasion inhibitory activity in breast cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(9), 2428–2436. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.003>

ECACC. (s/f). *Cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424)*.

Erdogan, M. A., Yuca, E., Ashour, A., Gurbuz, N., Sencan, S., & Ozpolat, B. (2023). SCN5A promotes the growth and lung metastasis of triple-negative breast cancer through EF2-kinase signaling. *Life Sciences*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121282>

Ghosh, D. K., Kumar, A., & Ranjan, A. (2021). Cellular targets of mefloquine. En *Toxicology* (Vol. 464). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152995>

Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. En *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 137, Número 2, pp. e11–e16). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

Gradek, F., Lopez-Charcas, O., Chadet, S., Poisson, L., Ouldamer, L., Goupille, C., Jourdan, M. L., Chevalier, S., Moussata, D., Besson, P., & Roger, S. (2019). Sodium Channel Nav 1.5 Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasiveness in Breast Cancer Cells Through its Regulation by the Salt-Inducible Kinase-1. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55197-5>

He, S., Moutaoufik, M. T., Islam, S., Persad, A., Wu, A., Aly, K. A., Fonge, H., Babu, M., & Cayabyab, F. S. (2020). HERG channel and cancer: A mechanistic review of carcinogenic processes and therapeutic potential. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1873, Número 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188355>

- Hosonaga, M., Saya, H., & Arima, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms underlying brain metastasis of breast cancer. En *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 39, Número 3, pp. 711–720). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09881-y>
- Hou, X., Tang, L., Li, X., Xiong, F., Mo, Y., Jiang, X., Deng, X., Peng, M., Wu, P., Zhao, M., Ouyang, J., Shi, L., He, Y., Yan, Q., Zhang, S., Gong, Z., Li, G., Zeng, Z., Wang, F., ... Xiong, W. (2021). Potassium Channel Protein KCNK6 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation, Invasion, and Migration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.616784>
- Huang, Q., Wu, M., Pu, Y., Zhou, J., Zhang, Y., Li, R., Xia, Y., Zhang, Y., & Ma, Y. (2024). Inhibition of TNBC Cell Growth by Paroxetine: Induction of Apoptosis and Blockage of Autophagy Flux. *Cancers*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/cancers16050885>
- Hwang, S., Kim, J. H., & Jo, S. H. (2021). Inhibitory effect of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine on human Kv1.3 channels. *European Journal of Pharmacology*, 912. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174567>
- lanevski, A., Giri, A. K., & Aittokallio, T. (2022). SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W739–W743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac382>
- INEGI. (2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE)*. <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492>
- INEGI. (2023). *Comunicación social ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA INTERNACIONAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE)*.
- INEGI. (2024). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA INTERNACIONAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 de octubre)*.
- Jang, W. J., Jung, S. K., Vo, T. T. L., & Jeong, C. H. (2019). Anticancer activity of paroxetine in human colon cancer cells: Involvement of MET and ERBB3. *Journal of*

Cellular and Molecular Medicine, 23(2), 1106–1115.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14011>

Justus, C. R., Marie, M. A., Sanderlin, E. J., & Yang, L. V. (2023). Transwell In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2644, pp. 349–359). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3052-5_22

Khan, M. A., Jain, V. K., Rizwanullah, M., Ahmad, J., & Jain, K. (2019). PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. En *Drug Discovery Today* (Vol. 24, Número 11, pp. 2181–2191). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.001>

Kowalska, M., Nowaczyk, J., Fijałkowski, Ł., & Nowaczyk, A. (2021). Paroxetine—overview of the molecular mechanisms of action. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 4, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22041662>

Lastraioli, E. (2020). Focus on Triple-Negative Breast Cancer: Potassium Channel Expression and Clinical Correlates. En *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00725>

Lee, H. M., Chai, O. H., Hahn, S. J., & Choi, B. H. (2018). Antidepressant drug paroxetine blocks the open pore of Kv3.1 potassium channel. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 22(1), 71–80. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.1.71>

Lee, H. M., Hahn, S. J., & Choi, B. H. (2016). Blockade of Kv1.5 by paroxetine, an antidepressant drug. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 20(1), 75–82. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2016.20.1.75>

Leslie, T. K., James, A. D., Zaccagna, F., Grist, J. T., Deen, S., Kennerley, A., Riemer, F., Kaggie, J. D., Gallagher, F. A., Gilbert, F. J., & Brackenbury, W. J. (2019). Sodium homeostasis in the tumour microenvironment. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1872, Número 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.001>

- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Liu, M., Li, L., Huang, S., Pan, X., Dai, H., Chen, Z., Pan, Y., & Fang, S. (2022). Prognostic and Therapeutic Values of Autophagy-related Genes in Triple-negative Breast Cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discovery*, 17(4), 380–386.
- Lopez-Charcas, O., Pukkanasut, P., Velu, S. E., Brackenbury, W. J., Hales, T. G., Besson, P., Gomora, J. C., & Bastien Roger, S. (2021). *iScience Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers*. <https://doi.org/10.1016/j.isci>
- Lu, B., Natarajan, E., Balaji Raghavendran, H. R., & Markandan, U. D. (2023). Molecular Classification, Treatment, and Genetic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Review. En *Technology in Cancer Research and Treatment* (Vol. 22). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/15330338221145246>
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. En *Cancers* (Vol. 13, Número 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Luo, Q., Wu, T., Wu, W., Chen, G., Luo, X., Jiang, L., Tao, H., Rong, M., Kang, S., & Deng, M. (2020). The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in Metastatic Breast Cancer. En *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01111>
- Navas, T., Kinders, R. J., Lawrence, S. M., Ferry-Galow, K. V., Borgel, S., Hollingshead, M. G., Srivastava, A. K., Alcoser, S. Y., Makhlof, H. R., Chuaqui, R., Wilsker, D. F., Konate, M. M., Miller, S. B., Voth, A. R., Chen, L., Vilimas, T., Subramanian, J., Rubinstein, L., Kummar, S., ... Parchment, R. E. (2020). Clinical evolution of epithelial–mesenchymal transition in human carcinomas. *Cancer Research*, 80(2), 304–318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3539>

- Nelson, M., Yang, M., Dowle, A. A., Thomas, J. R., & Brackenbury, W. J. (2015). The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. *Molecular Cancer*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-014-0277-x>
- Organización Mundial de la Salud. (2021, marzo 26). *Cáncer de mama*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Organización Mundial de la Salud. (2022, febrero 3). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23126806>
- Perez-Cortes, E. J., Islas, A. A., Arevalo, J. P., Mancilla, C., Monjaraz, E., & Salinas-Stefanon, E. M. (2015). Modulation of the transient outward current (I_{to}) in rat cardiac myocytes and human Kv4.3 channels by mefloquine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *288*(2), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.07.015>
- Plijter, I. S., Verkerk, A. O., & Wilders, R. (2023). The Antidepressant Paroxetine Reduces the Cardiac Sodium Current. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24031904>
- Riggio, A. I., Varley, K. E., & Welm, A. L. (2021). The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. En *British Journal of Cancer* (Vol. 124, Número 1, pp. 13–26). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01161-4>
- Sanchez-Sandoval, A. L., Hernández-Plata, E., & Gomora, J. C. (2023). Voltage-gated sodium channels: from roles and mechanisms in the metastatic cell behavior to clinical potential as therapeutic targets. En *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1206136>
- Santos, J., Arantes, J., Carneiro, E., Ferreira, D., Silva, S. M., Palma de Sousa, S., & Arantes, M. (2020). Brain metastases from breast cancer. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *197*. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106150>

- Sharma, N., Thomas, S., Golden, E. B., Hofman, F. M., Chen, T. C., Petasis, N. A., Schönthal, A. H., & Louie, S. G. (2012). Inhibition of autophagy and induction of breast cancer cell death by mefloquine, an antimalarial agent. *Cancer Letters*, 326(2), 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.029>
- Song, Y., Yang, X., & Yu, B. (2022). Repurposing antidepressants for anticancer drug discovery. En *Drug Discovery Today* (Vol. 27, Número 7, pp. 1924–1935). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.10.019>
- Sun, X., Li, Y., Lan, H., Jiang, T., Wan, X., & Cheng, Y. (2023). Identification of KCNK1 as a potential prognostic biomarker and therapeutic target of breast cancer. *Pathology Research and Practice*, 241. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154286>
- Tomasik, B., Bieńkowski, M., Górka, Z., Gutowska, K., Kumięga, P., Jassem, J., & Duchnowska, R. (2023). Molecular aspects of brain metastases in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 102521. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102521>
- Valdés-Abadía, B., Morán-Zendejas, R., Rangel-Flores, J. M., & Rodríguez-Menchaca, A. A. (2019). Chloroquine inhibits tumor-related Kv10.1 channel and decreases migration of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 855, 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.017>
- Vieira, J. L. F., Borges, L. M. G., Ferreira, M. V. D., Rivera, J. G. B., & Gomes, M. do S. M. (2016). Patient age does not affect mefloquine concentrations in erythrocytes and plasma during the acute phase of falciparum malaria. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(5), 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.07.005>
- Wang, H., Yang, X., Guo, Y., Shui, L., Li, S., Bai, Y., Liu, Y., Zeng, M., & Xia, J. (2019). HERG1 promotes esophageal squamous cell carcinoma growth and metastasis through TXNDC5 by activating the PI3K/AKT pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1284-y>
- Won, K. A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. *International Journal of Oncology*, 57(6), 1245–1261. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>

- Wu, P.-H., Gilkes, D. M., Phillip, J. M., Narkar, A., Wen-Tao Cheng, T., Marchand, J., Lee, M.-H., Li, R., & Wirtz, D. (2020). *Single-cell morphology encodes metastatic potential*.
- Yamaci, R. F., Fraser, S. P., Battaloglu, E., Kaya, H., Erguler, K., Foster, C. S., & Djamgoz, M. B. A. (2017). Neonatal Nav1.5 protein expression in normal adult human tissues and breast cancer. *Pathology Research and Practice*, 213(8), 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.06.003>
- Yang, M., James, A. D., Suman, R., Kasprowicz, R., Nelson, M., O'Toole, P. J., & Brackenbury, W. J. (2020). Voltage-dependent activation of Rac1 by Nav1.5 channels promotes cell migration. *Journal of Cellular Physiology*, 235(4), 3950–3972. <https://doi.org/10.1002/jcp.29290>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. En *Breast Cancer Research* (Vol. 22, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Zhang, X., Chan, T., & Mak, M. (2021). Morphodynamic signatures of MDA-MB-231 single cells and cell doublets undergoing invasion in confined microenvironments. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85640-5>
- Zheng, Y., Chang, X., Huang, Y., & He, D. (2023). The application of antidepressant drugs in cancer treatment. En *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 157). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113985>
- Zhu, Y., Zhu, X., Tang, C., Guan, X., & Zhang, W. (2021). Progress and challenges of immunotherapy in triple-negative breast cancer. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1876, Número 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188593>
- Zúñiga, L., Cayo, A., González, W., Vilos, C., & Zúñiga, R. (2022). Potassium Channels as a Target for Cancer Therapy: Current Perspectives. En *Oncotargets and Therapy* (Vol. 15, pp. 783–797). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S326614>

15. Anexos

15.1. Anexo A: ensayos de viabilidad celular en HUVEC

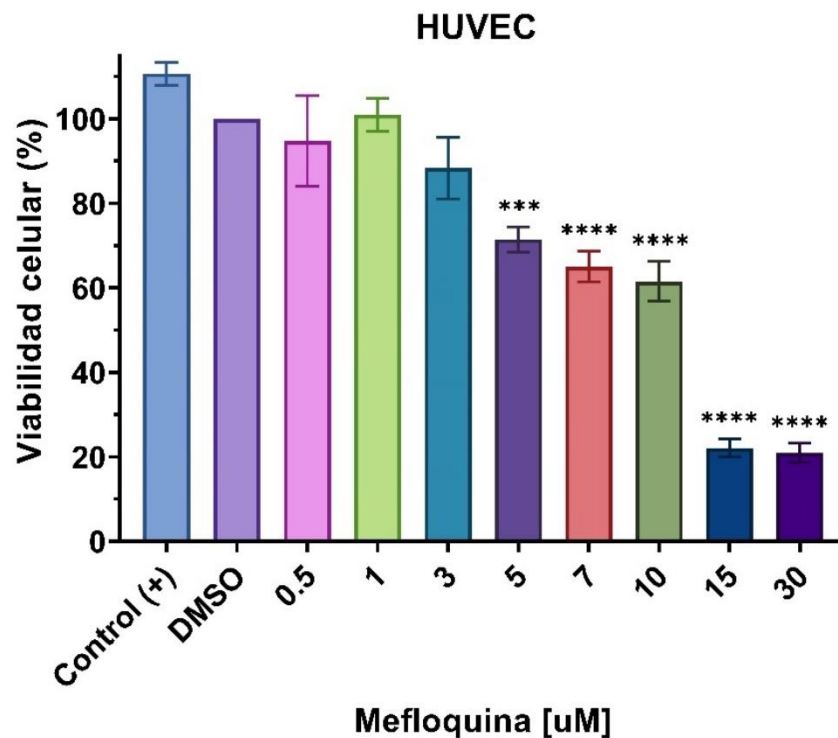


Figura A1. Efecto de mefloquina sobre la viabilidad celular en línea HUVEC evaluada con el ensayo de MTT. Las células fueron expuestas a un 0.5% v/v del vehículo (DMSO) y a distintas concentraciones de MQ (0.5 - 30 μ M) durante 48 horas (n = 4). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad respecto a DMSO. *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a la máxima concentración utilizada de vehículo.

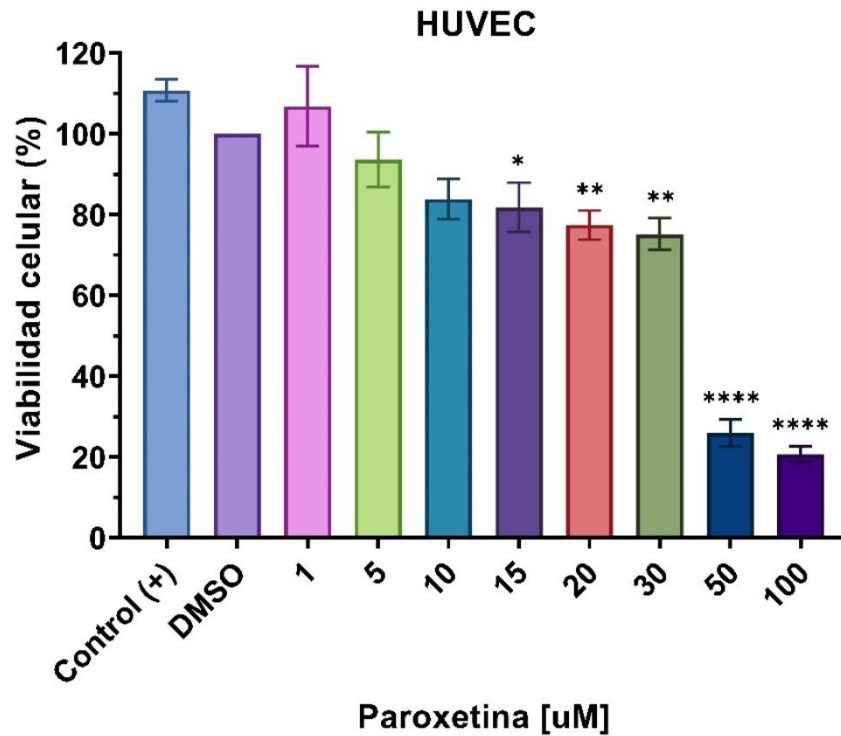


Figura A2. Efecto de paroxetina sobre la viabilidad celular en línea HUVEC evaluada con el ensayo de MTT. Las células fueron expuestas a un 0.5% v/v del vehículo (DMSO) y a distintas concentraciones de PX (1 - 100 μ M) durante 48 horas (n = 4). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad respecto a DMSO. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, respecto a la máxima concentración utilizada de vehículo.