



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Efecto antitumoral de medicación utilizada en psiquiatría y neurología

Tesis presentada para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas

Candela Diva Pastore

Director: Dr. Abel Luis Carcagno

Director asistente: Lic. Federico Julián Garde

Lugar de trabajo: Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, IQUIBICEN-CONICET, FCEyN-UBA, CABA, Argentina

Buenos Aires, diciembre 2024

Resumen

El reposicionamiento de fármacos es una estrategia que consiste en el uso de un fármaco existente para un propósito diferente al de su indicación médica original con el objetivo de acortar tiempos y gastos en la aprobación de terapias. Debido a las limitaciones existentes en los tratamientos oncológicos, el reposicionamiento surge como una posibilidad prometedora. En este trabajo se evaluaron dos fármacos a ser reposicionados en distintos tipos de cáncer: el ácido valproico en neuroblastoma, y la fluoxetina en cáncer de páncreas. El neuroblastoma (NB) es uno de los tumores sólidos infantiles más frecuentes representando aproximadamente el 8% de los tumores malignos pediátricos. Este tipo de tumor se origina a partir de células progenitoras de la cresta neural, las cuales dan lugar al linaje simpatoadrenal. Se sabe que las células de NB suelen presentar un bajo grado de diferenciación, y se ha establecido que cuanto menor es el grado de diferenciación celular, peor es el pronóstico clínico de los pacientes. Por este motivo, resulta fundamental comprender los mecanismos que regulan la diferenciación del linaje simpatoadrenal, del cual derivan las células del NB, para diseñar nuevas estrategias terapéuticas. Un tratamiento posible que se ha presentado en los últimos años es el ácido retinoico (AR), un agente diferenciador ya aprobado para otros tipos de cáncer que posee efectos diferenciadores y antitumorales en el NB. Sin embargo, la mayoría de los pacientes de alto riesgo presentan resistencia a esta terapia, por lo que se plantea la posibilidad de combinar este tratamiento con algún otro medicamento. El ácido valproico (VPA) es un inhibidor de histona deacetylases que se utiliza en la clínica para el tratamiento de la epilepsia y desórdenes bipolares. Se ha demostrado que el VPA no solo reduce la capacidad proliferativa, sino que también promueve la diferenciación celular en diversos tipos tumorales. Adicionalmente, se ha reportado que el VPA suprime el fenotipo agresivo de algunas líneas celulares de NB. La hipótesis de esta parte del trabajo es que el tratamiento con VPA en líneas celulares de NB induce la diferenciación neuronal, disminuye la proliferación celular, la migración, el crecimiento tumoral y la capacidad invasiva y que podría aumentar la eficacia del tratamiento con AR. Esta hipótesis sugiere que la diferenciación de células de NB involucra cambios en la expresión de factores que resultan en la disminución de la agresividad celular. El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar los efectos del tratamiento con VPA como tratamiento único y en combinación con el AR sobre la diferenciación celular y su impacto en la agresividad tumoral en líneas celulares de NB. Para ello, se trataron las líneas celulares SK-N-SH y SH-SY5Y con VPA sólo o combinado con AR. Los resultados obtenidos indican que el VPA como tratamiento individual indujo cambios en la morfología celular compatible con un proceso de diferenciación celular, evidenciada por un alargamiento celular adquiriendo una morfología similar a la de las neuronas. Además, el tratamiento redujo significativamente las capacidades proliferativas y

migratorias en ensayos de confluencia, clonogénicos y *transwell*, sin afectar la viabilidad celular (ensayos de MTT y *Trypan blue*). Los efectos inhibitorios sobre la proliferación también se observaron en ensayos en 3D, siendo los esferoides tratados con VPA significativamente más pequeños que los control. También, se realizaron implantes de esferoides de NB en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo para evaluar los efectos de VPA *in vivo*. En el tratamiento combinado con el AR se vio un aumento en la longitud de las células y una disminución en la proliferación en tres dimensiones en comparación con el tratamiento individual con el AR. Sin embargo, no se vieron diferencias significativas en estos aspectos con respecto al tratamiento con VPA. En conjunto, estos resultados sugieren que el VPA, un fármaco aprobado por la FDA para otras patologías, tiene potencial para ser reposicionado como tratamiento para el NB. Al reducir tanto la proliferación como la migración de las células tumorales de NB y promover su diferenciación, la combinación de los tratamientos actuales junto con VPA podría ofrecer una nueva estrategia terapéutica para mejorar el pronóstico clínico de esta enfermedad. Más estudios son necesarios para evaluar el efecto de su combinación con el AR, pero estos resultados preliminares sugieren que la acción del VPA en combinación con el AR es más eficaz que el AR como tratamiento individual, pero no que el VPA.

El cáncer de páncreas es el sexto tipo de cáncer con mayor mortalidad en el mundo, y el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, del inglés *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) es el subtipo más frecuente. Las terapias para este tipo de cáncer suelen generar resistencia o ser poco eficaces para su tratamiento, por lo que es necesario buscar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Dentro de los focos moleculares para dirigir una terapia se encuentra la autofagia, un mecanismo de reciclado de componentes celulares que ha cobrado importancia en los últimos años e interés en el campo del cáncer por los distintos efectos que puede tener sobre la agresividad tumoral. En el PDAC se ha visto que la autofagia se encuentra sobreactivada y podría asociarse a la resistencia a quimioterapias. Además, su inhibición se ha visto asociada a un menor crecimiento tumoral, por lo que se presenta como un posible blanco terapéutico. La fluoxetina (FLX) es un antidepresivo cuyos efectos antitumorales se han comprobado en distintos tipos de cáncer, siendo que en alguno de ellos estos efectos se vieron asociados al impacto de la droga sobre el flujo autofágico. La hipótesis de esta parte del trabajo es que el tratamiento con FLX en una línea celular de PDAC disminuye la agresividad tumoral siendo la inhibición de la autofagia un posible mecanismo. El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar los efectos del tratamiento con FLX sobre la viabilidad y proliferación de células de PDAC y explorar los cambios en el flujo autofágico como un posible mecanismo molecular responsable del efecto. Para ello, se trató la línea celular PANC-1 con FLX. Los resultados obtenidos indican que la FLX reduce la viabilidad y la proliferación de las células PDAC e inhibe el proceso autofágico.

Estas observaciones preliminares aportan evidencia de los efectos antitumorales de esta droga, además de presentar un posible mecanismo de acción para los mismos y respaldar la posibilidad de reposicionar este antidepresivo como terapia oncológica.

Título y resumen en inglés

Antitumoral effect of medication used in psychiatry and neurology

Drug repositioning is a strategy that consists of using an existing drug for a purpose other than its original medical indication with the aim of shortening the time and cost of approving therapies. Due to the existing limitations in oncological treatments, repositioning emerges as a promising possibility. In this work, two drugs were evaluated for repositioning in different types of cancer: valproic acid in neuroblastoma, and fluoxetine in pancreatic cancer.

Neuroblastoma (NB) is one of the most common childhood solid tumors, representing approximately 8% of pediatric malignancies. This type of tumor originates from neural crest progenitor cells, which give rise to the sympathoadrenal lineage. It is known that NB cells usually show a low degree of differentiation, and it has been established that the lower the degree of cellular differentiation, the worse the clinical prognosis of patients. For this reason, it is essential to understand the mechanisms that regulate the differentiation of the sympathoadrenal lineage, from which NB cells derive, in order to design new therapeutic strategies. One potential treatment that has been introduced in recent years is retinoic acid (RA), a differentiating agent already approved for other cancers that has differentiating and antitumor effects in NB. However, most high-risk patients show resistance to this therapy, so the possibility of combining this treatment with some other drug is being considered. Valproic acid (VPA) is a histone deacetylase inhibitor used in the clinic for the treatment of epilepsy and bipolar disorders. VPA has been shown not only to reduce proliferative capacity, but also to promote cell differentiation in various tumor types. Additionally, VPA has been reported to suppress the aggressive phenotype of some NB cell lines. The hypothesis of this part of the work is that VPA treatment of NB cell lines induces neuronal differentiation, decreases cell proliferation, migration, tumor growth and invasiveness, and could increase the efficacy of RA treatment. This hypothesis suggests that NB cell differentiation involves changes in the expression of factors that result in decreased cell aggressiveness. The aim of this part of the work was to evaluate the effects of VPA as a single treatment and in combination with RA on cell differentiation and its impact on tumor aggressiveness in NB cell lines. For this purpose, SK-N-SH and SH-SY5Y cell lines were treated with VPA alone or combined with RA. Results indicate that VPA as an individual treatment induced changes in cell morphology, compatible with a process of cell differentiation, evidenced by cell elongation, acquiring a neuron-like morphology. In addition, treatment significantly reduced proliferative and migratory capacities in confluence, clonogenic and transwell assays, without affecting cell viability (MTT and Trypan blue assays). Inhibitory effects on proliferation were also observed in 3D assays, with VPA-treated spheroids being significantly smaller than the control ones. Also, NB spheroid implants in the chorioallantoic membrane of the chick embryo were performed to evaluate the

effects of VPA *in vivo*. Combined treatment was found to increase cell length and decrease proliferation in three dimensions compared to RA alone. However, no significant differences in these aspects were seen in relation to VPA treatment. Taken together, these results suggest that VPA, an FDA-approved drug for other pathologies, has potential to be repositioned as a treatment for NB. By reducing both proliferation and migration of NB tumor cells and promoting their differentiation, the combination of current treatments together with VPA could offer a new therapeutic strategy to improve the clinical prognosis of this disease. More studies are needed to evaluate the effect of its combination with RA, but these preliminary results suggest that the action of VPA in combination with RA is more effective than RA as a single treatment, but not VPA.

Pancreatic cancer is the sixth type of cancer with the highest mortality in the world, and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most frequent subtype. Therapies for this type of cancer often generate resistance or are not very effective for its treatment, so it is necessary to search for new therapeutic strategies to improve the quality of life of patients. One of the molecular targets for therapy is autophagy, a mechanism for recycling cellular components that has gained importance in recent years and interest in the field of cancer due to the different effects it can have on tumor aggressiveness. In PDAC, autophagy has been found to be overactivated and could be associated with resistance to chemotherapies. In addition, its inhibition has been associated with reduced tumor growth, making it a possible therapeutic target. Fluoxetine (FLX) is an antidepressant whose antitumor effects have been demonstrated in different types of cancer, and in some of them these effects were associated with the impact of the drug on autophagic flux. The hypothesis of this part of the work is that treatment with FLX in a PDAC cell line decreases tumor aggressiveness being the inhibition of autophagy, a possible mechanism. The aim of this part of the work was to evaluate the effects of FLX treatment on PDAC cell viability and proliferation and to explore changes in autophagic flux as a possible molecular mechanism responsible for the effect. For this purpose, the PANC-1 cell line was treated with FLX. The results obtained indicate that FLX reduces the viability and proliferation of PDAC cells and inhibits the autophagic process. These preliminary observations provide evidence of the antitumor effects of this drug, in addition to presenting a possible mechanism of action for these effects and supporting the possibility of repositioning this antidepressant as an oncological therapy.

Agradecimientos

A Abel, el mejor director que alguien podría pedir. Gracias por ver potencial en mí desde el primer día y darme la oportunidad de formar parte de un grupo tan hermoso. Por siempre impulsarme a superarme y a tener más confianza en mí misma. Gracias por tu paciencia, tu disposición y tu apoyo constante. Por crear un espacio tan lindo en el laboratorio que lo convierte en un hogar. Por todo lo que me enseñaste y por contribuir tanto a mi formación y crecimiento. Y sobre todo, gracias por siempre asegurarte de que estuviera bien y por ofrecer ayuda en los momentos más complicados que me tocó vivir mientras hacía esta tesis.

A Fede, mi director asistente. Gracias por enseñarme prácticamente todo lo que llegué a hacer en el laboratorio. Por ayudarme con todos los experimentos de esta tesis. Por tu paciencia y por tu tiempo. Gracias por explicarme lo mismo mil veces por mi memoria de pez o porque llegaba al laboratorio con la cabeza quemada después de cursar.

A Jime, mi melliza perdida que llegó al mundo unos años antes que yo. Gracias por tus consejos, por nuestras conversaciones sobre la vida donde hablábamos de las novelas que podríamos escribir con todos nuestros problemas personales. Por escucharme siempre y por todas las veces que nos reímos juntas para no llorar. Por ser mi compañera de cuarto en congresos y estar siempre lista para defenderme frente a cualquier persona.

A Marce, mi compañero de silbidos. Gracias por las risas, por siempre pegarme canciones y por imitar todos mis ruidos raros hasta asustar al resto. Gracias por los falopa fridays y por estar tan loco como yo. Por ayudarme siempre que lo necesité y por acompañarme junto con Jime en la noche de mayor delirio, llenando huevos muertos o sin fecundar con antibiótico hasta terminar en un McDonald's. Gracias también por el helado (aunque se me haya caído).

A Ana, una amiga del laboratorio. Gracias por tu colaboración en el proyecto de fluoxetina y por todo el apoyo que brindaste a nuestro laboratorio junto con tus becarios.

A mis amigas de la facultad, que se convirtieron en mi familia. A Nicky, mi primera amiga de la carrera. Gracias por estar siempre ahí para mí. Por entenderme y acompañarme en todas desde el primer día del CBC. A Cami, mi casi vecina. Gracias por todas esas sesiones de terapia en tu auto, por siempre hacer el mismo chiste de ir al museo del automóvil y por cantar musicales juntas a todo pulmón. A Cati, mi roomate. Gracias por darme un lugar en tu casa por tantos meses y hacerlo sentir como mi hogar. Por todos los momentos que vivimos en ese tiempo y todo lo que compartimos. Gracias por enseñarme a cocinar y a amar a las plantas. Sin ustedes no hubiera llegado a este punto de la carrera. Le agradezco a la vida por

haberme dado amigas tan buenas con las que compartí tantas risas y lágrimas. No me alcanzan las palabras para decir cuánto las amo y lo orgullosa que estoy de nosotras por haber llegado hasta acá.

A mi familia, que siempre me apoyó y creyó en mí. A mis papás por siempre decirme lo orgullosos que están de mí y por siempre apoyarme con esta carrera que elegí. Por ayudarme a levantarme en mis momentos más bajos para seguir adelante. A mis hermanas, que creen que voy a encontrar la cura para el cáncer (hay que dejarlas soñar) por siempre creer que iba a lograr todo lo que me propusiera.

A Alan y Julián, mis planetarios. Gracias por todos estos años creciendo juntos. Por esta amistad que sigue sumando décadas. Por estar ahí siempre, en todas las etapas de la vida, creciendo juntos.

A Rucci, que dice que soy su conciencia. Gracias por tu amistad y por acompañarme haciendo home office mientras yo escribía esta tesis. Por creer tanto en mí siempre. Por acompañarme todos estos años y por haber vivido tanto juntas.

A Mica, Coni, Valen, Carre y Solmi, mis vístimas. Gracias por ser mis amigas, por las risas y juntadas a lo largo de todos estos años de amistad.

A la UBA, mi querida universidad pública, que tuvo un año muy complicado, y sigue sufriendo golpes. La defenderé siempre y no dejaré de estar agradecida por la oportunidad que me dió a mí y a muchísimos otros de recibir esta educación de excelencia. Gracias a la FCEN que se convirtió en mi segunda casa, que me dió a tanta gente valiosa en mi vida y que me formó en estos años con los mejores profesores.

Dedico esta tesis a mi abuela, la Beli. La persona más fuerte y resiliente que conozco quien ha superado muchísimas adversidades, incluyendo el cáncer. Kocham cię.

Abreviaturas

9-cis-RA: Ácido retinoico 9-cis	HDI: Inhibidor de histona deacetilasa
13-cis-RA: Ácido retinoico 13-cis	IACUC: Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales
5-AZA: 5-aza-2'-desoxicitidina	IARC: Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
APL: Leucemia promielocítica aguda	IF: Inmunofluorescencia
AR: Ácido retinoico	KD: Knockdown
ATG: Genes relacionados con la autofagia	n: Número de repeticiones
ASCL1: Achaete-scute homolog 1	NB: Neuroblastoma
ATRA: Ácido transretinoico	NIH: Institutos Nacionales de la Salud
CAM: Membrana corioalantoidea	NS: No significativa
CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio	OD: Densidad óptica
CINH₄: Cloruro de amonio	OMS: Organización Mundial de la Salud
CMA: Autofagia mediada por chaperonas	OPRR: Oficina de Protección contra Riesgos de Investigación
CQ: Cloroquina	PARP: Enzima poli ADP ribosa polimerasa
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	PBA: Fenilbutirato
DDP: Diaminodicitróplatino	PBS: Buffer de fosfato salino
DE: Desvío estándar	PDAC: Adenocarcinoma pancreático ductal
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium	PFA: Paraformaldehído
DMSO: Dimetilsulfóxido	PHS: Política del Servicio de Salud Pública
ED: Día embrionario	PVDF: Fluoruro de polivinilideno
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	SAHA: Ácido suberoilanídido hidroxámico
EMT: Transición epitelio-mesenquimal	SFB: Suero fetal bovino
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares	SDS: Dodecilsulfato sódico
FLX: Fluoxetina	TBST: Tris y Tween-20
GABA: Ácido gamma-aminobutírico	TSA: Tricostatina A
GWAS: Estudio de asociación del genoma completo	USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
HAT: Histona acetiltransferasa	VPA: Ácido valproico
HDAC: Histona deacetilasa	

Índice

Resumen	2
Título y resumen en inglés	5
Agradecimientos	7
Abreviaturas.....	9
Introducción	14
1. El cáncer	14
1.1 Características generales.....	14
1.2 La metástasis.....	17
1.3 Terapias oncológicas	18
2. El reposicionamiento de fármacos	19
2.1 El neuroblastoma	20
2.1.1 El ácido trans-retinoico	21
2.1.2 El ácido valproico	23
2.1.2.1 Las histonas deacetilasas y sus inhibidores	23
2.1.2.2 El VPA en NB.....	25
2.1.3 El factor de transcripción ASCL1	26
2.2 El cáncer de páncreas	28
2.2.1 La autofagia.....	29
2.2.1 La fluoxetina	31
3. Modelos para el estudio del cáncer	32
3.1 Modelos <i>in vitro</i>	32
3.2 Modelos <i>in vivo (in ovo)</i>	32
Objetivos e hipótesis	36
Materiales y métodos	38
Aspectos éticos	38
Cultivo celular.....	38
Ensayo de viabilidad celular por exclusión de <i>Trypan Blue</i>	39
Ensayo de viabilidad por MTT	39
Inmunohistoquímica de cultivos celulares.....	40
Ensayo de formación de colonias	41
Ensayo de migración por <i>transwell</i>	42
Ensayo de confluencia	43
Formación de esferoides	43

<i>Western blot</i>	44
Ensayos <i>in ovo</i>	45
Manipulación de los huevos.....	45
Preparación de tejidos para su análisis.....	46
Tinción hematoxilina-eosina.....	46
Análisis estadístico	47
Resultados.....	50
1. Neuroblastoma y VPA	50
1.1 Morfología.....	50
1.1.1 Curva de concentración de VPA.....	50
1.1.2 Análisis del cambio morfológico.....	51
1.2 Viabilidad	52
1.3 Proliferación.....	54
1.3.1 Proliferación en dos dimensiones	54
1.3.1.1 Actividad metabólica	54
1.3.1.2 Confluencia.....	55
1.3.1.3 Clonogenicidad	56
1.3.2 Proliferación en tres dimensiones	58
1.4 Migración	61
1.5 Mecanismo de acción	62
1.5.1 Transición epitelio-mesenquimal	62
1.5.2 <i>Downregulación</i> de ASCL1	64
1.5.2.1 Medición de ASCL1 por inmunofluorescencia	65
1.5.2.2 Medición de ASCL1 por <i>Western blot</i>	66
1.6 Implante de esferoides en la CAM	67
1.7 Tratamiento combinado de VPA + ATRA	69
1.7.1 Morfología	70
1.7.2 Proliferación en tres dimensiones	71
2. Cáncer de páncreas y FLX	75
2.1 Respuesta de las células PANC-1 al tratamiento con FLX.....	75
2.2 Proliferación	75
2.2.1 Proliferación en dos dimensiones	75
2.3 Proliferación en tres dimensiones.....	76
2.4 Curva de concentración de FLX.....	77
2.5 Autofagia.....	78
Discusión y conclusiones	81

1. Neuroblastoma y VPA	81
2. Cáncer de páncreas y FLX	84
Referencias bibliográficas	88

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. El cáncer

1.1 Características generales

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular descontrolada, impulsada por factores genéticos y epigenéticos que alteran los mecanismos normales de regulación celular. El cáncer puede formarse en cualquier parte del cuerpo y, en general, se denomina según el órgano o tejido donde se origina. Los factores de riesgo asociados al cáncer pueden ser extrínsecos o intrínsecos. Los factores extrínsecos incluyen el estilo de vida y la exposición a agentes ambientales o carcinógenos, mientras que los intrínsecos se relacionan principalmente con la predisposición genética individual (Yıldırım-Kahriman, 2021).

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es actualmente la principal causa de muerte a nivel mundial, siendo responsable de aproximadamente el 17% de las muertes totales. En 2022, se reportaron casi 20 millones de nuevos casos de cáncer y cerca de 10 millones de muertes a nivel global, de acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). Entre los tipos de cáncer más frecuentes se encuentran el de pulmón, el de mama, el colorrectal, el de próstata y el de estómago (**figura 1**).

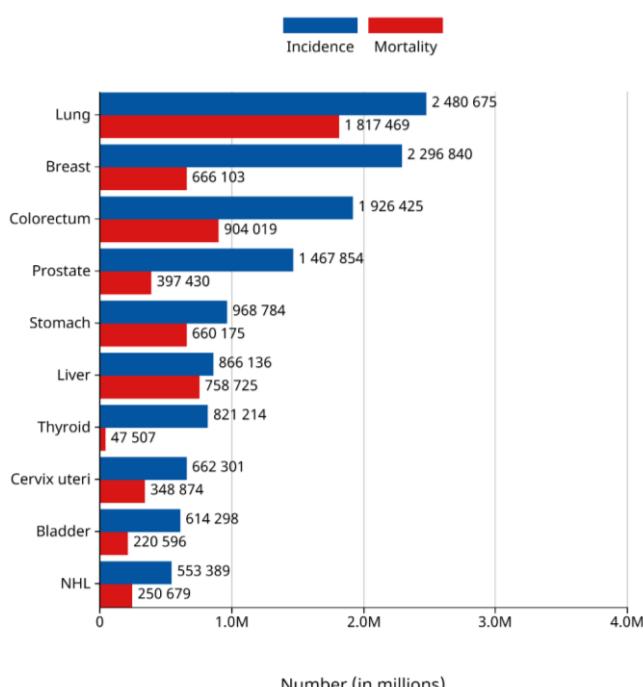


Figura 1. Incidencia y mortalidad mundial absoluta de los tipos de cáncer más frecuentes. Se muestran resultados de incidencia (en azul) y mortalidad (en rojo) para ambos sexos y todas las edades de los 10 tipos de cáncer más frecuentes en 2022 según datos de la IARC.

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron un conjunto de seis capacidades funcionales fundamentales que las células cancerígenas deben adquirir para mantener su capacidad tumorigénica. Estas características incluyen la evasión de supresores de crecimiento, la activación de la invasión y metástasis, la habilitación de la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, la resistencia a la muerte celular y la señalización proliferativa sostenida (**figura 2**) (Hanahan and Weinberg, 2000). Estas capacidades proporcionan a las células cancerígenas las herramientas básicas para crecer y proliferar evitando los controles típicos del tejido sano.

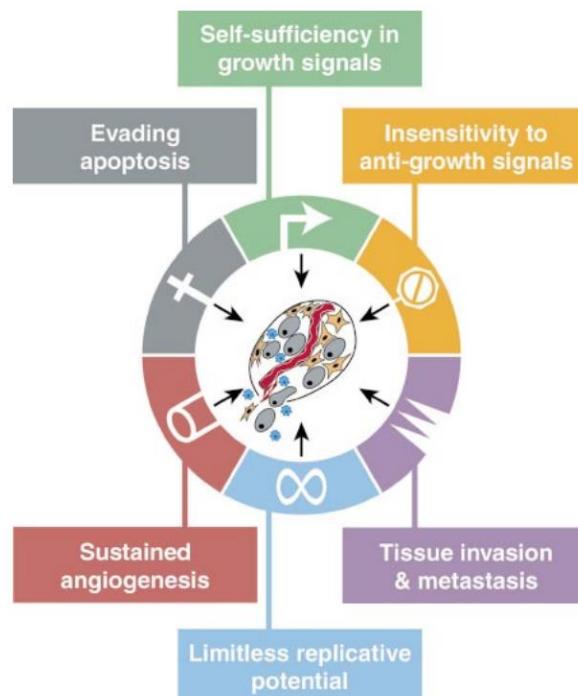


Figura 2. Capacidades funcionales que poseen las células cancerígenas propuestas originalmente en el 2000 (Hanahan and Weinberg, 2000).

En el 2011, estos autores ampliaron su teoría inicial añadiendo dos características emergentes y dos características habilitantes, para un total de diez capacidades funcionales. Las nuevas características emergentes incluyen la evasión de la respuesta inmune y la desregulación del metabolismo energético. Las dos características habilitantes añadidas, que son la inflamación pro-tumoral, y la inestabilidad genómica y mutaciones, describen condiciones que facilitan la aparición y progresión de los rasgos cancerígenos previamente propuestos (**figura 3**) (Hanahan and Weinberg, 2011).

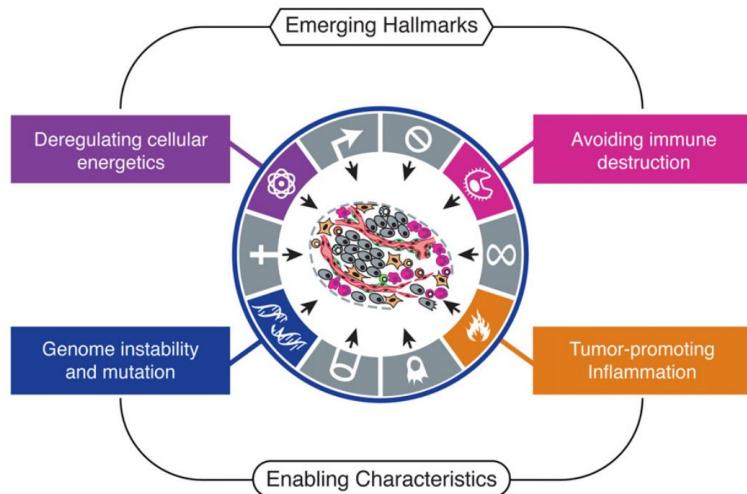


Figura 3. **Características emergentes y habilitantes propuestas en el 2011 a ser consideradas dentro de las capacidades funcionales originales** (Hanahan and Weinberg, 2011).

En el 2022, Hanahan introdujo cuatro posibles nuevas capacidades funcionales que podrían ser esenciales para entender mejor el comportamiento tumorigénico de las células cancerígenas. Estas características son el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, la presencia de microbiomas polimórficos, y la presencia de células senescentes (**figura 4**). Con estas incorporaciones, hoy se reconocen 14 capacidades funcionales en células cancerígenas que son necesarias para mantener su capacidad tumorigénica (Hanahan, 2022).

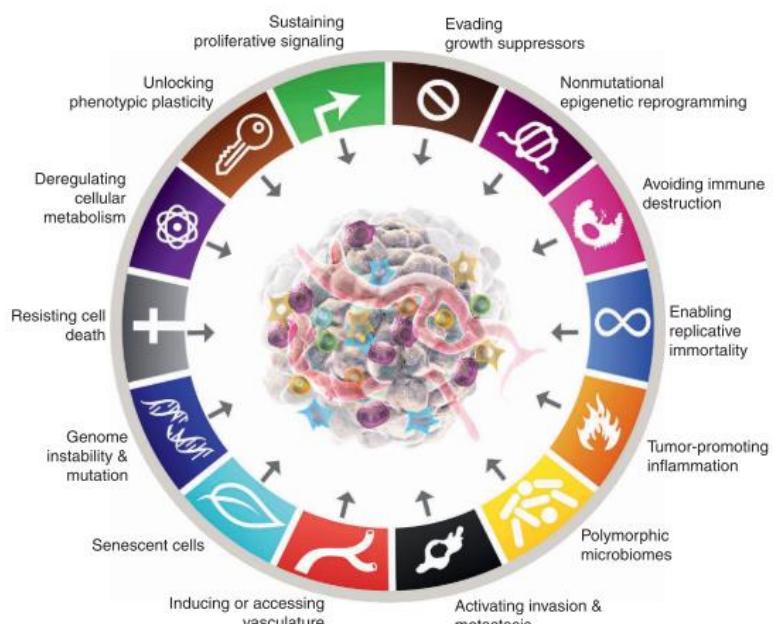


Figura 4. **Capacidades funcionales que poseen las células cancerígenas incluyendo las características emergentes y habilitantes propuestas en el 2022** (Hanahan, 2022).

1.2 La metástasis

Para más del 90% de los pacientes oncológicos, la principal causa de muerte son las consecuencias de la metástasis (Fidler, 2003). La metástasis es un proceso complejo en el que las células de un tumor primario adquieren la capacidad de diseminarse y colonizan nuevos tejidos, formando así tumores secundarios en sitios distantes. Este proceso involucra varias etapas biológicas que pueden dividirse principalmente en invasión, intravasación, circulación y supervivencia en el torrente sanguíneo, extravasación y, finalmente, colonización metastásica (**figura 5**) (Chen and Yan, 2021).

El primer paso en la metástasis es la invasión, durante la cual las células tumorales experimentan cambios en su adhesión a la matriz extracelular, viéndose aumentada la degradación proteolítica del tejido circundante. Este proceso aumenta la motilidad celular, favoreciendo el desplazamiento de las células tumorales a través del tejido hacia los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos. Una vez alcanzados estos vasos, las células se introducen en la circulación en un proceso conocido como intravasación. Una vez en el torrente sanguíneo, las células deben sobrevivir. Estas células pueden adoptar un estado de quiescencia que les permite resistir a las respuestas inmunitarias hasta llegar a su destino. Las células tumorales pueden atravesar la pared de los vasos en un proceso denominado extravasación. Finalmente, el proceso de colonización metastásica implica la formación de micrometástasis, que pueden progresar hacia macrometástasis vascularizadas. La colonización exitosa depende de las interacciones entre las células tumorales y el microambiente del órgano receptor. (Fares et al., 2020; Steeg, 2006).

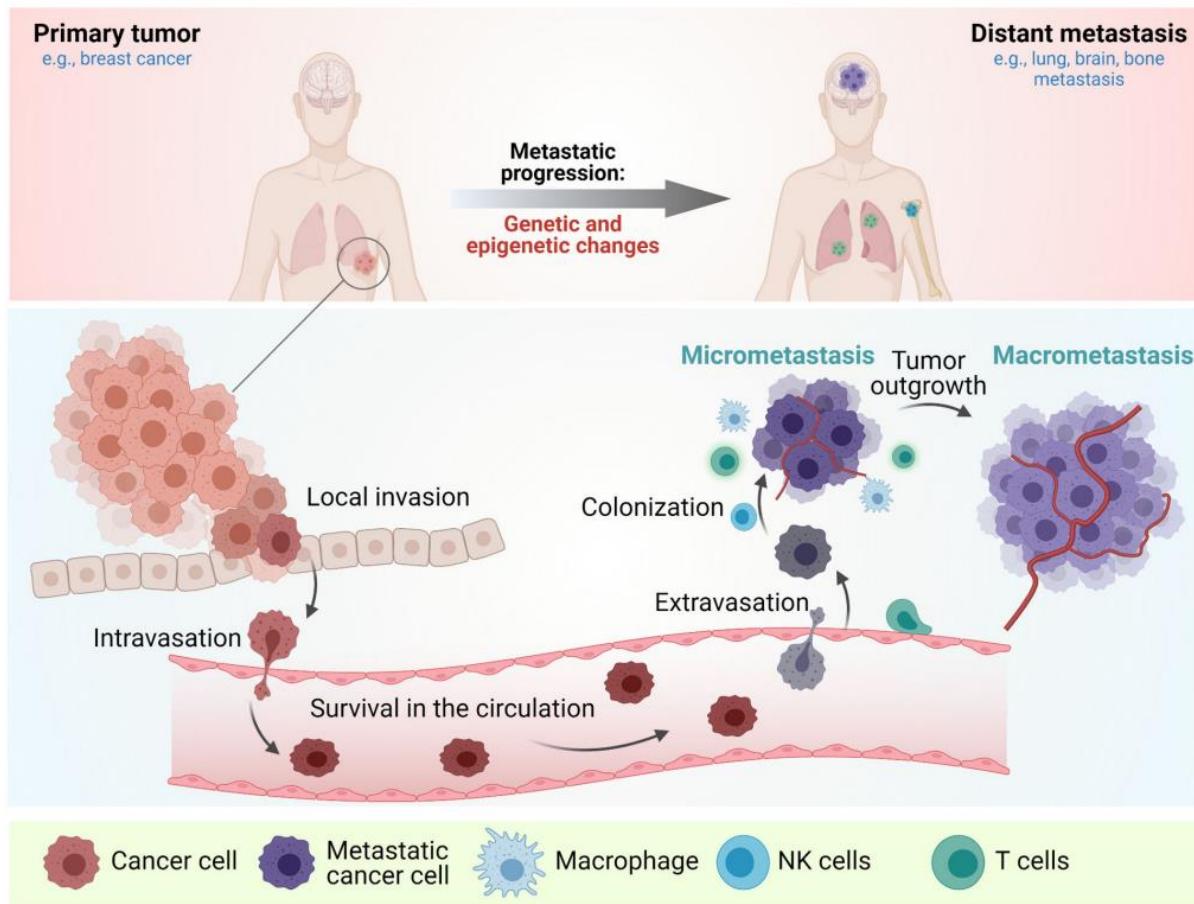


Figura 5. Esquema representativo de los pasos de la cascada metastásica. Este proceso se divide principalmente en invasión local, intravasación, supervivencia en la circulación, extravasación y colonización metastásica para un posterior crecimiento tumoral (Chen and Yan, 2021).

1.3 Terapias oncológicas

Algunas de las estrategias terapéuticas en la lucha contra el cáncer se basan en el arresto del ciclo celular, la inducción de la muerte celular, la regulación de la angiogénesis y la modulación de los puntos de control inmunológicos. Entre ellas se encuentran las terapias tradicionales, como la radioterapia y la quimioterapia, que, aunque ampliamente utilizadas y eficaces en el tratamiento de varios tipos de cáncer, suelen carecer de especificidad. Esta falta de especificidad puede provocar efectos secundarios graves en los pacientes, afectando no solo a las células tumorales sino también a los tejidos sanos, lo cual presenta importantes desafíos clínicos. Además, el uso repetido de estas terapias puede actuar como presión de selección aumentando la proporción de células tumorales resistentes y con un fenotipo más agresivo, dificultando la efectividad del tratamiento a largo plazo (Gil and Rodriguez, 2016). Por estas razones, resulta crucial desarrollar nuevas estrategias terapéuticas específicas que puedan dirigirse a las características particulares de cada tipo tumoral.

2. El reposicionamiento de fármacos

El reposicionamiento de fármacos consiste en el uso de un fármaco existente para un propósito diferente al de su indicación médica original (Pushpakom et al., 2019). Debido a que estos medicamentos ya han sido evaluados en términos de seguridad y eficacia para sus aplicaciones originales, el reposicionamiento ofrece una vía prometedora para reducir los tiempos de desarrollo y los costos asociados al proceso de aprobación de nuevos tratamientos (Sleire et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos oncológicos presentan limitaciones significativas, como efectos secundarios tóxicos para los pacientes y, en algunos casos, baja eficacia debido al desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales (Xia et al., 2024). Además, solo cerca del 7% de las drogas antitumorales que inician la primera fase de ensayos clínicos logran ser aprobadas para su uso clínico. Ante este escenario, el reposicionamiento de fármacos ha cobrado relevancia en los últimos años para tratamientos oncológicos (Schipper et al., 2022). Ejemplos exitosos de medicamentos reposicionados como terapias antitumorales incluyen a la aspirina (analgésico reposicionado para su uso en el cáncer colorrectal) y el raloxifeno (originalmente indicado para el tratamiento de osteoporosis y reposicionado para el tratamiento del cáncer de mama) (Pushpakom et al., 2019).

El proceso de reposicionamiento consiste en tres etapas principales: (1) la identificación de una molécula candidata utilizada para un fin diferente al que se quiere explorar, (2) la evaluación de su eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo*, y (3) el avance a la segunda fase de ensayos clínicos siempre que se cuente con suficiente información (a las concentraciones requeridas) sobre la seguridad de este medicamento en la primera fase de los ensayos que se realizaron para su fin médico original. Para la identificación de compuestos candidatos pueden utilizarse herramientas computacionales como *docking* molecular o estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *Genome Wide Association Study*), análisis clínicos retrospectivos y métodos experimentales como ensayos proteómicos para identificar nuevos blancos de la droga, entre otros (Pushpakom et al., 2019).

El eje central de esta tesis se basa en evaluar el efecto antitumoral de dos drogas (ácido valproico y fluoxetina) utilizadas en psiquiatría y neurología. Para ello, el trabajo está dividido en dos partes, una primera parte donde se evalúa el efecto antitumoral del ácido valproico (VPA) y su relación con la diferenciación de células de neuroblastoma, y una segunda parte donde se evalúa el efecto antitumoral de la fluoxetina (FLX) y su relación con la inhibición del flujo autotáxico en células tumorales derivadas de adenocarcinoma pancreático de origen ductal.

En los siguientes bloques de la introducción se describen las características principales de los tipos de cáncer utilizados y los mecanismos de acción del VPA y de la FLX. Por último, se describen los modelos *in vitro* e *in ovo* utilizados para la biología del cáncer.

2.1 El neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es uno de los tumores sólidos infantiles más comunes, representando aproximadamente el 8% de los tumores malignos pediátricos (Nakagawara et al., 2018). Este tipo de cáncer se diagnostica mayoritariamente en niños menores de 10 años, con una tasa de supervivencia que disminuye con la edad. La tasa de supervivencia es del 88% en menores de 18 meses, cae al 49% para niños de entre 18 meses y 12 años, y llega al 10% en adolescentes mayores de 12 años (Zeineldin et al., 2022). Además, el NB es altamente metastásico, con alrededor de 50% de los casos diagnosticados en etapas metastásicas que suelen involucrar médula ósea, huesos, ganglios linfáticos, piel e hígado (Nakagawara et al., 2018). Las recaídas o la progresión en sitios metastásicos constituye la principal causa de muerte en pacientes con NB (Liu et al., 2023).

En cuanto a su origen, las células de NB derivan de progenitores de la cresta neural que presentan, en algunos casos, alteraciones en el proceso de diferenciación celular (Nakagawara et al., 2018). La cresta neural es una estructura embrionaria transitoria que aparece en las primeras etapas del desarrollo y desaparece a medida que sus células migran hacia diversas regiones, donde se diferencian para formar distintos tejidos, como el esqueleto craneofacial, el sistema nervioso simpático y periférico, las células cromafines y los melanocitos (Le Douarin and Dupin, 2018; Siaw et al., 2020; Tomolonis et al., 2018). Este desplazamiento y diferenciación son posibles gracias al proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT, del inglés *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*), mediante el cual las células de la cresta neural pierden la adherencia a las células neuroepiteliales vecinas y adquieren propiedades mesenquimales, lo que les permite migrar y establecerse en distintos sitios para diferenciarse posteriormente en diferentes tipos celulares (Duband et al., 1995; Hay, 2005; Tomolonis et al., 2018).

En el caso específico del NB, las células tumorales derivan de los precursores del linaje simpatoadrenal que migran desde el tubo neural y se agrupan alrededor de la aorta dorsal. En esta región, estos precursores se diferencian en neuronas y células gliales que forman parte de los ganglios simpáticos, así como en células cromafines, que son parte de la médula adrenal (**figura 6**) (Matthay et al., 2016; Siaw et al., 2020; Tomolonis et al., 2018).

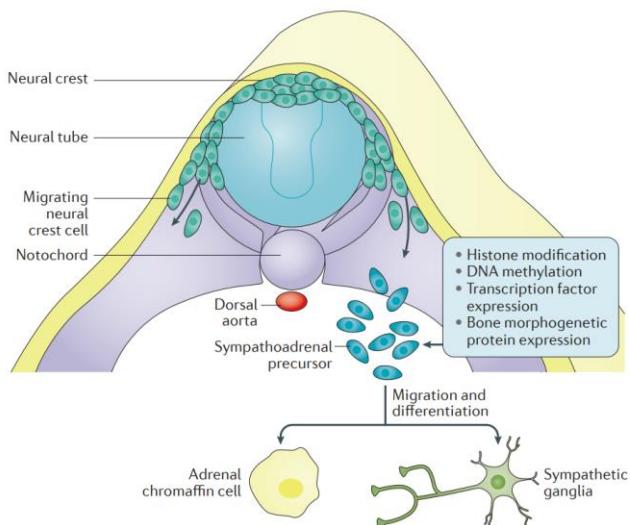


Figura 6. Esquema representativo del proceso de desarrollo que da origen a los progenitores simpatoadrenales a partir de células de la cresta neural. Estos progenitores dan origen a células del sistema nervioso periférico incluyendo aquellas que forman los ganglios simpáticos y la glándula adrenal, que son los principales sitios donde surge el NB (Matthay et al., 2016).

Las terapias actuales para el tratamiento del NB incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno GD2, que se encuentra altamente expresado en las células de NB (Peng et al., 2015). Sin embargo, aún con el empleo de estas terapias, aproximadamente el 50% de los pacientes con NB de alto riesgo fallecen en los primeros cinco años tras el diagnóstico (Masetti et al., 2012; Qiu and Matthay, 2022). Esto pone en evidencia la necesidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas que puedan ser evaluadas en fases clínicas en el mediano plazo.

Se ha demostrado que un menor grado de diferenciación celular en los tumores de NB se asocia con un pronóstico clínico desfavorable (Peng et al., 2015). Por este motivo, comprender los mecanismos que regulan la diferenciación celular del linaje del que derivan las células de NB durante el desarrollo embrionario es crucial para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas. Estas estrategias, orientadas a emular procesos de diferenciación en las células de NB, podrían mejorar significativamente la respuesta a las terapias en pacientes con NB.

2.1.1 El ácido trans-retinoico

En las últimas décadas, además del aumento en la dosis de quimioterápicos (terapia mieloablativa) y trasplantes autólogos de *stem cells*, se han introducido agentes diferenciadores como el Ácido Retinoico (RA). Este está presente en el organismo en varias formas estereoisómeras: ATRA (del inglés *All-Trans Retinoic Acid*), ácido retinoico 13-cis (13cisRA) y ácido retinoico 9-cis (9cisRA), dentro de los cuales el ATRA es el isómero más

Introducción

activo transcripcionalmente (O'Byrne and Blaner, 2013). Este tipo de estrategia terapéutica alternativa tiene como objetivo inducir un estado de diferenciación terminal en células cancerosas asociado con un fenotipo menos agresivo.

El tratamiento con ATRA ya es utilizado con éxito en leucemia promielocítica aguda (APL, del inglés *Acute Promyelocytic Leukemia*) como agente diferenciador de promielocitos leucémicos inmaduros a granulocitos maduros (Warrell et al., 1991). En líneas celulares de NB se ha visto que produce la inhibición de la proliferación celular y de la capacidad de formar colonias, y que promueve la diferenciación celular (Sidell et al., 1983; Thiele et al., 1985; Zimmerman et al., 2021). Además, en ensayos pre-clínicos de pacientes con NB se ha observado la inhibición de la proliferación y/o la apoptosis de células tumorales producto de la inducción de su diferenciación (Reynolds and Lemons, 2001). Este tratamiento ha incrementado la tasa de supervivencia a los 3 años de los pacientes de NB de alto riesgo (Masetti et al., 2012; Qiu and Matthay, 2022). Su acción se debe a la unión del ácido retinoico (AR) a sus receptores, lo cual causa cambios conformacionales que promueven la unión a secuencias específicas del ADN, regulando la transcripción de genes blanco (Reynolds and Lemons, 2001).

De esta manera, el tratamiento con ATRA se constituye como una estrategia terapéutica alternativa que busca llevar a las células tumorales a un estado de diferenciación terminal. Este tipo de terapias se basan en el conocimiento de que el proceso de diferenciación se encuentra alterado en células de diferentes tipos tumorales y es posible, en algunos casos, inducir su diferenciación y reducir su capacidad de formar tumores (Chaudhari et al., 2017; Pierce and Wallace, 1971). En particular, se ha visto que el ATRA altera los factores de transcripción que mantienen el fenotipo poco diferenciado y que son necesarios para la tumorigenidad de las células de NB (Durbin et al., 2018; Zimmerman et al., 2021).

A pesar de los resultados que señalan al ATRA como un tratamiento potencialmente efectivo para pacientes con NB, un importante obstáculo es la resistencia a los retinoides, que limita su eficacia en la mayoría de los pacientes con NB de alto riesgo (Kasim et al., 2016; Reynolds et al., 2003). Esta resistencia podría deberse a diversos mecanismos que aún no se comprenden completamente, ya que la información sobre la regulación de la actividad de los retinoides en células de NB es limitada (Chlapek et al., 2018). Ante esta problemática, se ha planteado la posibilidad de combinar el tratamiento con otras terapias para contrarrestar la resistencia y ampliar los beneficios de los retinoides en estos pacientes. Por este motivo, en esta tesis no se plantea como objetivo evaluar el efecto del tratamiento con ATRA sino evaluar la combinación de ATRA con VPA como posible estrategia combinada. La hipótesis que sustenta la premisa de que el tratamiento combinado es más efectivo será desarrollada más adelante en esta sección e involucra el efecto de VPA en la *downregulación* del factor de transcripción ASCL1.

2.1.2 El ácido valproico

El ácido valproico (VPA) (**figura 7**) es una droga utilizada para el tratamiento de epilepsia y trastornos bipolares. Su mecanismo de acción principal implica potenciar la actividad inhibitoria del neurotransmisor GABA mediante la inhibición de su degradación y el aumento de su síntesis (Kostrouchová et al., 2007). Este medicamento es de bajo costo, posee un perfil de seguridad favorable y puede administrarse por vía oral, siendo bien tolerado a dosis terapéuticas habituales (Göttlicher et al., 2001). Sin embargo, el VPA está contraindicado en mujeres embarazadas debido a los riesgos de que el feto desarrolle el síndrome del ácido valproico fetal, que abarca anomalías congénitas como defectos en el desarrollo del tubo neural (Kostrouchová et al., 2007). Debido a sus efectos teratogénicos, el VPA ha cobrado interés como un posible tratamiento, solo o en combinación con otros agentes, para distintos tipos de cáncer (Wheler et al., 2014). Se postula que el principal mecanismo por el cual el VPA tiene un efecto anti tumoral se debe a su función como inhibidor de la actividad de histonas deacetilasas (HDACs) (Gurvich et al., 2004).

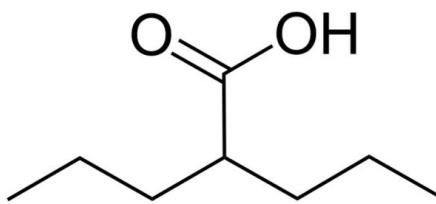


Figura 7. Estructura del VPA (Abualhasan et al., 2020).

2.1.2.1 Las histonas deacetilasas y sus inhibidores

Las histonas juegan un rol fundamental en la expresión génica debido a su participación en el ensamblaje de la cromatina y en la regulación de la accesibilidad a los factores de transcripción a sus secuencias blanco en el ADN. La regulación de la conformación de la cromatina por parte de las histonas está dada por sus modificaciones post-traduccionales llevadas a cabo por distintas enzimas. Entre estas, se destacan las histonas acetiltransferasas (HATs) encargadas de transferir grupos acetilo a las colas de las histonas, neutralizándolas y volviendo a la cromatina más laxa y accesible. De manera contraria, las histonas deacetilasas (HDACs) catalizan la remoción de los grupos acetilo llevando a la condensación de la cromatina y consecuente represión de la actividad transcripcional (**figura 8**) (Wawruszak et al., 2021). Se ha visto que un desbalance en los niveles de acetilación de las histonas por parte de estas enzimas se relaciona con la tumorigénesis en distintos tipos de cáncer, incluido el NB (Phimmachanh et al., 2020).

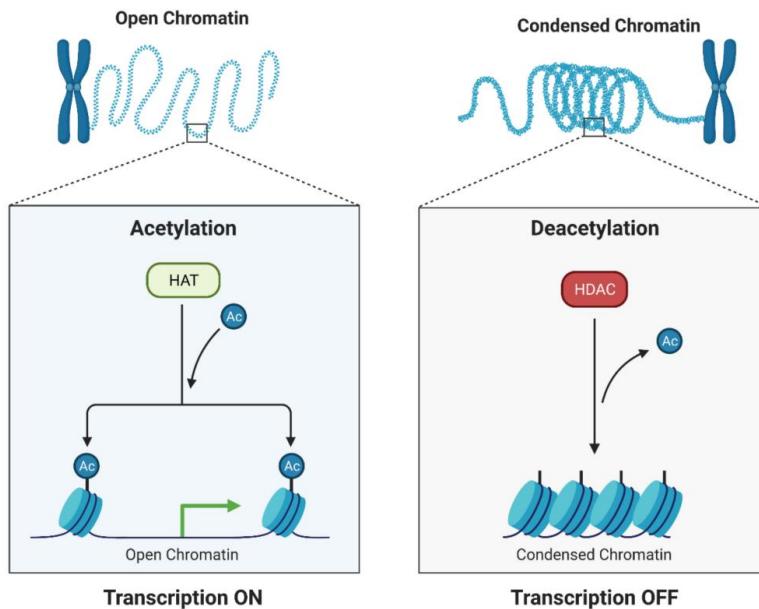


Figura 8. Esquema de la acetilación y deacetilación de histonas por HATs y HDACs respectivamente. Mediante el estado de acetilación de las histonas, estas enzimas controlan los niveles de transcripción debido a su influencia en el estado de condensación de la cromatina (Wawruszak et al., 2021).

Las HDACs humanas son 18 y se clasifican en 4 clases, basándose en su homología con las enzimas correspondientes en levaduras. La clase I está formada por las HDACs 1, 2, 3 y 8; la clase IIa por las HDACs 4, 5, 7 y 9; la IIb por las HDACs 6 y 10; la clase III está formada por las sirtuinas SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7; y la clase IV por la HDAC 11 (Bolden et al., 2006). En el NB se ha visto que ciertas HDACs de la clase I y II están implicadas en la promoción del crecimiento tumoral, movilidad celular y resistencia a terapias. Por ejemplo, se sabe que la amplificación de *MYCN* es un marcador de mal pronóstico en NB y que su potencial oncogénico se debe, en parte, a la participación de HDAC2 en la represión de miR-183, un supresor tumoral en NB. Es por evidencias como esta que comenzaron a cobrar interés inhibidores de HDACs (HDIs) como posibles terapias para distintos tipos de cáncer, como el NB (Frumm et al., 2013; Phimmachanh et al., 2020).

Los HDIs se clasifican en 4 clases (Wawruszak et al., 2021):

1. Ácidos hidroxámicos: esta clase incluye a la tricostatina A (TSA), el vorinostat (SAHA), el belinostat (PDX-101), el panobinostat (LBH-589), y el resminostat (4SC-201).
2. Ácidos grasos de cadena corta: dentro de esta categoría se encuentran el butirato de sodio (NaB), el fenilbutirato (PBA) y el ácido valproico (VPA), que es el foco de interés en este trabajo.
3. Péptidos cílicos: estos incluyen a la apicidina (CAS183506-66-3) y la romidepsina (FK228).

4. Benzamidas: esta clase cuenta con moléculas como el mocetinostat (MGCD103), el entinostat (MS-275) y el domatinostat (4SC-202).

Distintos investigadores presentan a los HDIs como una estrategia terapéutica prometedora debido a su capacidad para modificar la conformación de la cromatina y proponen que esto restauraría la actividad de genes supresores de tumores. Al inhibir la actividad de las HDACs, estos agentes lograrían una reactivación de genes que pueden inducir la diferenciación, reducir la proliferación tumoral y sensibilizar a las células tumorales frente a otros tratamientos (Bolden et al., 2006).

2.1.2.2 El VPA en NB

En NB, el VPA ha mostrado tener efectos prometedores en la reducción de la agresividad tumoral en algunas líneas celulares, disminuyendo la proliferación celular y favoreciendo la diferenciación neuronal. En las líneas celulares de NB UKF-NB-2 y UKF-NB-3, se ha observado que el VPA en concentraciones de 0.5 a 2 mM induce cambios morfológicos característicos, sin afectar su viabilidad, promoviendo el crecimiento de neuritas y estructuras neuronales (Cinatl et al., 1997). Estos efectos se han replicado en células SH-SY5Y, donde el tratamiento con VPA no solo generó morfologías alargadas con ramificaciones, sino también un aumento en la expresión de marcadores neuronales y oligodendrocíticos (Choi et al., 2023).

En las líneas de NB NBL-W-L y LA1_55n, se ha demostrado que el VPA puede ocasionar una reducción significativa de la proliferación y un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Este efecto está asociado con un incremento en la metilación global del ADN, lo cual se corresponde con una reducción en la expresión del oncogén *MYCN* y un aumento en los niveles de genes supresores de tumores (Gu et al., 2012). Además, la acción del VPA sobre la señalización celular en NB ha sido estudiada en células SH-SY5Y, donde se ha visto que activa la quinasa ERK, una molécula clave en las vías de señalización asociadas con la diferenciación y supervivencia neuronal (Yuan et al., 2001).

El efecto antitumoral del VPA también ha sido evaluado *in vivo* en modelos animales. En estudios con ratones portadores de tumores formados a partir de células UNF-NB-3, se observó una reducción en el volumen tumoral en los animales tratados con VPA (Cinatl et al., 1997).

El VPA también se ha evaluado como tratamiento alternativo en células de NB resistentes a diversas quimioterapias. En este contexto, se observó que el VPA puede revertir el incremento de adhesión de estas células a las células endoteliales vasculares, una característica común en células de NB resistentes que favorece su capacidad invasiva (Blaheta et al., 2007).

Sin embargo, los efectos del VPA sobre varios de los fenotipos asociados con agresividad tumoral (capacidad clonogénica, migración celular y ensayos en 3D) no han sido dilucidados. Por este motivo parte de los ensayos de esta tesis intentan abordar estas preguntas.

2.1.3 El factor de transcripción ASCL1

Achaete-Scute Homolog 1 (ASCL1, por su sigla en inglés) es un factor de transcripción regulador de la diferenciación neuronal que se expresa en las células de la cresta neural y en los precursores del linaje simpatoadrenal, entre otros sitios. Es homólogo a los genes achaete-scute de *Drosophila* en mamíferos y pertenece a la familia de factores de transcripción básicos *helix-loop-helix* (Guillemot et al., 1993; Johnson et al., 1990).

La expresión de ASCL1 durante la diferenciación de los progenitores simpáticos está finamente regulada tanto espacial como temporalmente. Este factor de transcripción presenta una expresión restringida a regiones específicas del sistema nervioso en desarrollo, siendo alta en células inmaduras del sistema nervioso simpático, pero luego baja su expresión para generar neuronas olfatorias, entéricas y parasimpáticas, además de ganglios simpáticos (Grynfeld et al., 2000; Ma et al., 1997; Soderholm et al., 1999). Esta regulación de los niveles de expresión de ASCL1 es de suma importancia debido a que es necesario que este factor de transcripción esté activo para permitir la diferenciación celular inicial. Sin embargo, su expresión tardía correlaciona negativamente con la diferenciación neuronal (**figura 9**) (Axelson, 2004; Grynfeld et al., 2000; Wang et al., 2019).

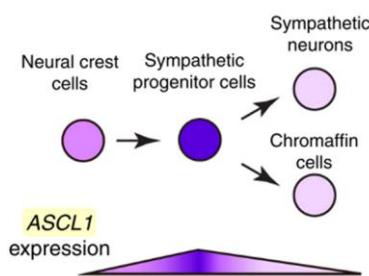


Figura 9. **Expresión de ASCL1 durante la diferenciación de los progenitores simpáticos** (Wang et al., 2019).

En los pacientes con NB se ha visto que la sobreexpresión de ASCL1 se correlaciona con una menor supervivencia y su alta expresión es más frecuente en tumores avanzados, además de ser un factor de mal pronóstico (Ichimiya et al., 2001; Kasim et al., 2016; Kocak et al., 2013; Wang et al., 2019). Además, se ha demostrado que la expresión de este factor de transcripción disminuye en células de NB en proceso de diferenciación siendo esta disminución un prerequisito para su diferenciación (Soderholm et al., 1999).

Introducción

Se ha reportado que en casos de NB donde ASCL1 se encuentra sobreexpresado, el tratamiento con ATRA tiene baja eficacia (Kasim et al., 2016). Un posible mecanismo de resistencia a esta terapia podría basarse en el bloqueo de la diferenciación celular por la sobreexpresión de genes como este. Además, se ha visto que ASCL1 es capaz de inhibir la transcripción de genes inducidos por ATRA, posiblemente llevando a la represión de la señalización por retinoides (Kasim et al., 2016). Teniendo en cuenta esto, se propone que la inhibición de ASCL1 junto con el tratamiento con ATRA podría mejorar la eficacia de la diferenciación neuronal y disminuir la resistencia a esta terapia. Investigaciones previas en nuestro laboratorio mostraron que, en líneas celulares de NB, el tratamiento combinado de ATRA en el contexto *knockdown* (KD) de ASCL1 es más efectivo que el tratamiento de ATRA como terapia individual cuando se analiza la diferenciación celular e inhibición de la migración (Garde, 2022). Además, el KD de ASCL1 induce cambios morfológicos en las células SK-N-SH compatibles con un proceso de diferenciación celular (**figura 10**).

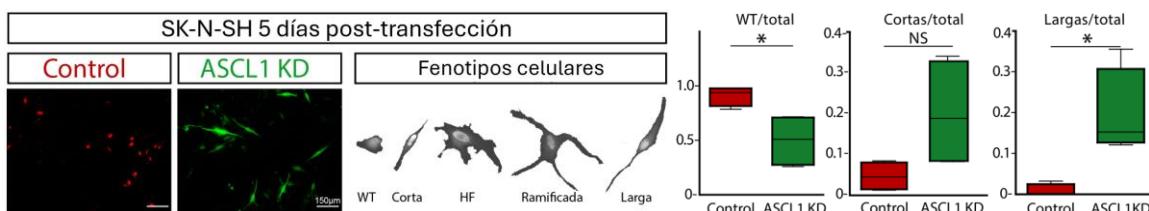


Figura 10. **Fenotipos de las células transfectadas con shcontrol (rojo) y shASCL1 (verdes)**. A la izquierda, imágenes representativas de un well transfectado para cada shRNA, expresando su reporter correspondiente, e indicando morfologías celulares observadas: WT, corta, HF (de mayor tamaño que las WT), ramificadas y larga. A la derecha, cuantificación de la proporción de células de las morfologías para los wells con el shControl (rojo) y shASCL1 (verde).

Por otro lado, las células ASCL1 KD presentaron una menor capacidad proliferativa evidenciada tanto por el marcador de proliferación KI67 como por ensayos clonogénicos (**figura 11**) (Garde, 2022).

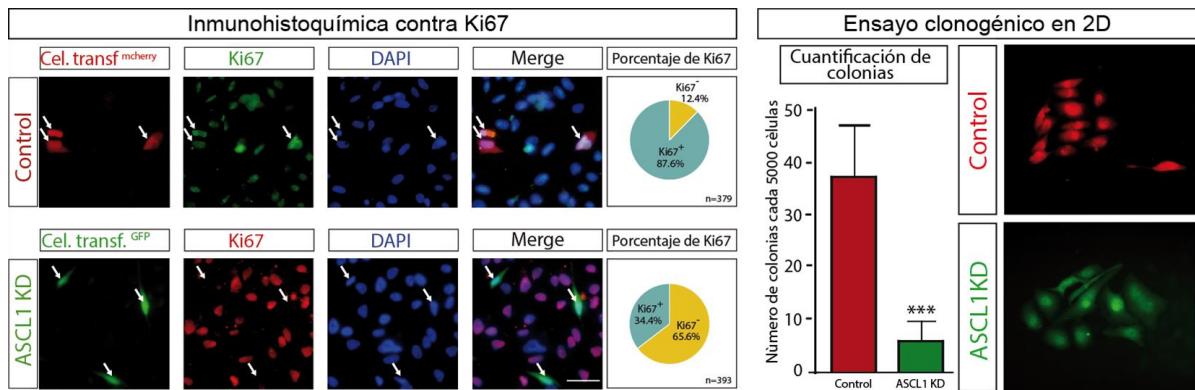


Figura 11. Evaluación de la proliferación por inmunohistoquímica para Ki67 y ensayo de formación de colonias. Se muestra la cuantificación del número de clones obtenidos cada 5000 células.

Adicionalmente, Jacob y colaboradores utilizaron el modelo de pez cebra para investigar cascadas de señalización involucradas en los mecanismos detrás de los defectos en la producción de serotonina en el síndrome del ácido valproico fetal. Los resultados obtenidos mostraron que el VPA inhibe la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas mediante la *downregulación* de *ascl1b*, ortólogo de ASCL1 en mamíferos, mediante la inhibición de la HDAC1 y la participación de la vía de Notch (Jacob et al., 2014).

Teniendo en cuenta las evidencias que asocian altos niveles de ASCL1 con resistencia al ATRA en pacientes con NB, y la posible explicación del VPA como agente diferenciador mediante la downregulación de ASCL1, se planteó el objetivo de utilizar el VPA como inhibidor farmacológico de ASCL1 con el potencial de aumentar la eficacia del ATRA.

2.2 El cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas es el sexto tipo de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial, habiéndose reportado 510.566 nuevos casos y 467.005 muertes en el 2022 (Bray et al., 2024), con una tasa de supervivencia a 5 años de aproximadamente 13% (Siegel et al., 2024). El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC, del inglés *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) es el subtipo de cáncer de páncreas más común, representando entre el 80 y 90% de los casos diagnosticados (Halbrook et al., 2023; Jiang and Sohal, 2023). Posee una tasa de supervivencia de 9% a 5 años (Rawla et al., 2019) y, al no poseer síntomas específicos, suele detectarse en etapas avanzadas (Thomas et al., 2023).

El PDAC es una neoplasia infiltrante que se origina en el árbol ductal pancreático (Luchini et al., 2016) rodeada por un estroma denso que dificulta la penetración de agentes terapéuticos al tumor (Nsingwane et al., 2020). Dependiendo del estadío de la enfermedad las opciones de tratamiento incluyen cirugía en combinación con quimioterapia (Jiang and Sohal, 2023), radioterapia (Jiang and Sohal, 2023; Wu et al., 2022) o terapias dirigidas como inhibidores de

la enzima poli ADP ribosa polimerasa (PARP, del inglés *Poly-ADP Ribose Polymerase*) (Golan et al., 2019; Jiang and Sohal, 2023). Sin embargo, la quimioterapia sistémica, opción utilizada en la mayoría de los pacientes, suele generar resistencia dando lugar a una mayor recurrencia en los pacientes (Halbrook et al., 2023). Por otro lado, la inmunoterapia tampoco es una opción para este tipo de tumores dado que los inhibidores de los puntos de control del sistema inmune no son efectivos en PDAC (Kabacaoglu et al., 2018). Por estas razones, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que aumenten la calidad de vida de los pacientes con PDAC es necesaria.

2.2.1 La autofagia

La autofagia es un proceso altamente conservado, por el cual las células reciclan componentes celulares mediante la degradación lisosomal de organelas y agregados de proteínas, lo cual les permite mantener su homeostasis y renovación de energía (Mizushima and Komatsu, 2011). La autofagia también cumple un rol como fuente de energía en células bajo condiciones de estrés. Dada la relevancia de la autofagia, el descubrimiento de los mecanismos asociados le dieron a Yoshinori Ohsumi el Premio Nobel de medicina en el año 2016.

En células de mamíferos se han descrito diversos tipos de autofagia que incluyen: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés *Chaperone-Mediated Autophagy*), y la macroautofagia. Todos los tipos culminan en la degradación de materiales citosólicos dentro del lisosoma, pero, mientras que en la microautofagia se forman invaginaciones lisosomales para la incorporación de esos materiales y en la CMA intervienen chaperonas que reconocen secuencias peptídicas en las proteínas a ser degradadas, la macroautofagia involucra la formación de unas estructuras denominadas autofagosomas que encierran a las proteínas y organelas para, posteriormente, fusionarse con el lisosoma (Parzych, 2014). Dentro de todos los tipos de autofagia, la macroautofagia es la más estudiada y suele ser a la que se refieren los autores cuando hablan de “autofagia”, por lo que en este trabajo se adoptó esa nomenclatura.

La autofagia consiste de tres principales etapas (**figura 12**):

1. Iniciación: se activa la proteína beclina-1 y se inicia la biogénesis del autofagosoma a partir de lípidos del retículo endoplasmático, mitocondria, Golgi o membrana plasmática.
2. Elongación: se añaden lípidos al autofagosoma y se reclutan proteínas ATG para el clivaje proteolítico y lipidación de la proteína LC3-I. Se obtiene como producto LC3-II, que se inserta en la membrana del autofagosoma en formación y se constituye como un marcador de la autofagia. Durante esta etapa también sucede la unión de p62 a

proteínas ubiquitinadas y a LC3-II, para llevar a cabo una autofagia selectiva de componentes citoplasmáticos.

3. Degradación: consiste en la fusión del autafagosoma con el lisosoma y degradación de los componentes encerrados.

(Glick et al., 2010; Jahanian et al., 2024; Zachari and Ganley, 2017).

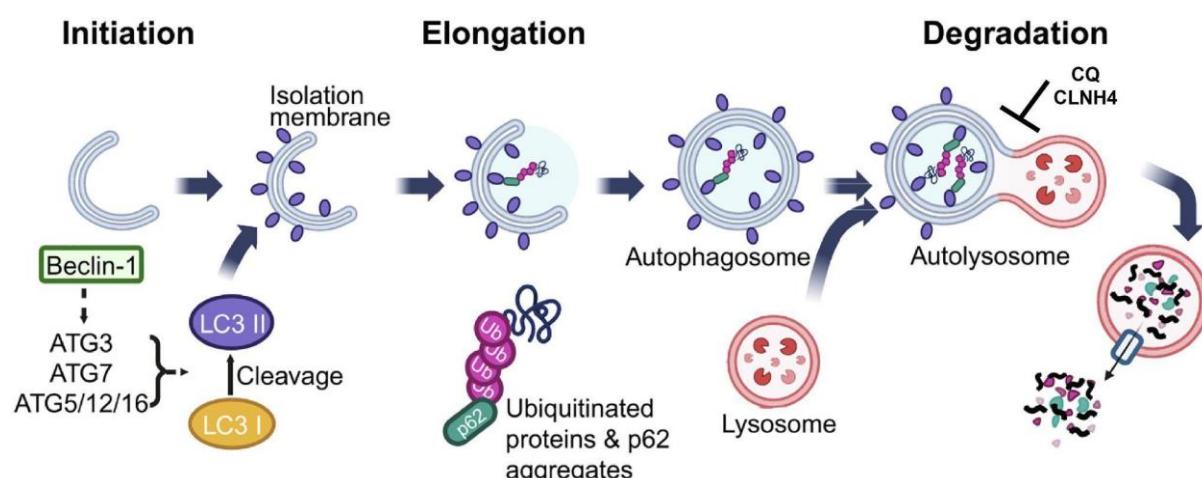


Figura 12. Etapas principales de la autofagia. Se incluyen en el esquema las principales moléculas involucradas en la iniciación, elongación y degradación junto con el blanco de acción de dos bloqueantes del flujo autofágico utilizados en esta tesis: la cloroquina (CQ) y el cloruro de amonio (CINH_4) (adaptación de (Jahanian et al., 2024)).

En cáncer, la autofagia puede cumplir diferentes roles según el estadio y el contexto. Diversos trabajos han reportado que la autofagia puede suprimir la iniciación tumoral, pero, en tumores ya formados, se ha visto que puede favorecer a la proliferación y a las actividades metabólicas de las células cancerígenas, cumpliendo un rol protumoral (Debnath et al., 2023). Si bien la inhibición en cualquier etapa posee la misma consecuencia con respecto al bloqueo del flujo autotágico, trabajos recientes indican que el bloqueo de distintas etapas de la autofagia pueden tener distintos efectos en el fenotipo de las células tumorales (Gillson et al., 2022; Piffoux et al., 2021).

La etapa de iniciación puede ser bloqueada mediante la inhibición farmacológica de las proteínas ULK1 y ULK2 (Egan et al., 2015; Tang et al., 2017), FIP200 (Bae and Guan, 2011), VPS34 (Bago et al., 2014; Dowdle et al., 2014; Pasquier, 2015) y beclina-1 (Liang et al., 1999), la etapa de elongación puede ser bloqueada mediante la inhibición farmacológica de ATG4 y la etapa de degradación puede ser bloqueada por fármacos ya disponibles en la clínica como la cloroquina que inhibe la fusión del autafagosoma con el lisosoma (Mauthe et al., 2018).

Específicamente, en PDAC la autofagia se encuentra sobreactivada y podría contribuir a la resistencia a la quimioterapia en este tipo de cáncer (Gillson et al., 2022; Piffoux et al., 2021).

Adicionalmente, se ha observado que la inhibición de la autofagia realizada farmacológicamente con cloroquina o el KD de ATG5 reduce la tasa de proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* (Yang et al., 2014). En conjunto, estos resultados indican que los inhibidores de la autofagia podrían reducir la supervivencia de los tumores pancreáticos.

Dado que la cloroquina tiene como blanco a los lisosomas, no es un inhibidor específico de la autofagia y, por lo tanto, resulta muy difícil establecer cuál es el aporte de la inhibición de la autofagia mediada por cloroquina al efecto antitumoral de la misma en PDAC. Por este motivo la evaluación de otros inhibidores del flujo autofágico resulta relevante como posible alternativa terapéutica para el cáncer de páncreas. A continuación, se describe el efecto y mecanismo de acción de la fluoxetina (FLX), un compuesto que ha demostrado tener un efecto inhibitorio de la autofagia dependiendo del contexto.

2.2.1 La fluoxetina

La FLX (bajo el nombre comercial Prozac, **figura 13**) es un antidepresivo que se encuentra dentro de los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (Wong et al., 2005). Se trata de una droga eficaz, con un bajo perfil de efectos secundarios, segura en el caso de sobredosis y fácil de usar para los pacientes (Rossi et al., 2004; Wong et al., 2005).

Se han visto efectos antitumorales de esta droga en distintos tipos de cáncer al ser usada como tratamiento único o combinada con quimioterapia. En glioblastoma se observó que la FLX puede llevar a la muerte celular mediante la activación de estrés lisosomal. A su vez, combinado con la temozolomida (tratamiento estándar para este tipo de cáncer), la FLX aumenta su efecto antitumoral pudiendo llevar a una regresión completa del tumor en ratones (Bi et al., 2021). En la leucemia linfocítica se ha visto que la FLX induce apoptosis y arresto del ciclo celular en G2, y, además, sus efectos se ven acentuados en combinación con antagonistas del receptor sigma-1 (una proteína sobreexpresada en este tipo de cáncer) (Chomchoei et al., 2022). En cáncer de ovario se reportaron los efectos de la FLX sobre la muerte celular mediada por cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la formación de especies reactivas de oxígeno (Lee et al., 2010). Adicionalmente, otros tipos de cáncer donde se ha visto un efecto antitumoral de la FLX son el cáncer de mama, colon, neuroblastoma, entre otros (Stepulak et al., 2008).

En cáncer de pulmón también se han reportado los efectos antiproliferativos de la FLX mediante un mecanismo que induce el arresto del ciclo celular y la autofagia, impidiendo de esa manera el crecimiento tumoral (Shao et al., 2022).

En cáncer gástrico y cáncer de pulmón, la FLX induce muerte celular asociada a la formación del autofagosoma y acumulación de LC3-II. Sin embargo, la FLX bloquea la etapa de degradación autofágica (Po et al., 2020; Shao et al., 2022). Este resultado, en conjunto con

otros resultados del rol de FLX en autofagia indican que cumple un rol complejo en la modulación del flujo autofágico aún cuando su rol anticancerígeno está demostrado.

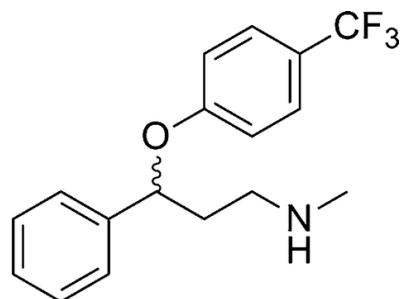


Figura 13. Estructura de la Fluoxetina. (Wentur et al., 2014)

3. Modelos para el estudio del cáncer

3.1 Modelos *in vitro*

Mediante los cultivos celulares *in vitro* es posible analizar procesos como la viabilidad, proliferación y migración de células tumorales y hacer comparaciones entre tratamientos. En esta tesis la mayoría de los ensayos realizados fueron *in vitro* utilizando la línea celular de NB SK-N-SH. Esta proviene de una biopsia de médula ósea de una paciente de cuatro años con NB con metástasis en médula ósea que fue tratada con cirugía, quimioterapia y radioterapia (Biedler et al., 1973). Esta línea celular crece en cultivos adherentes, tiene capacidad de duplicarse cada 44 horas y de ella derivan varias líneas celulares incluidas las SH-SY5Y que también fue utilizada en esta tesis para algunos de los ensayos *in vitro* (Boeva et al., 2017). La línea de PDAC utilizada fue la PANC-1, proveniente del ducto pancreático de un paciente de 56 años con carcinoma epitelioide (Lieber et al., 1975).

3.2 Modelos *in vivo* (*in ovo*)

Debido a las limitaciones que presentan los análisis de células cancerosas en cultivo al no recapitular el entorno fisiológico complejo en el que se encuentran las células tumorales dentro de un tejido, es importante complementar los análisis *in vitro* con modelos *in vivo* (DeBord et al., 2018; Gillies et al., 2008).

Uno de los modelos alternativos para el estudio de la biología del cáncer es el embrión de pollo, el cual presenta varias ventajas frente a otros modelos animales. A diferencia de lo que sucede con implantes tumorales en el ratón, el período necesario para formar tumores en el embrión de pollo es mucho más corto (Ribatti, 2014). Por otro lado, los huevos de gallina fertilizados son mucho menos costosos que los ratones inmunocomprometidos y no requieren de supervisión ética para su uso. Además, el embrión de pollo es autosuficiente y su

desarrollo normal no requiere del agregado de costosos medios de cultivo o requerimientos especiales. El fácil acceso al tumor permite aplicar fármacos de forma sencilla.

El modelo del embrión de pollo es un modelo originalmente utilizado en el campo de la biología del desarrollo desde el siglo IV A.C. cuando Aristóteles hizo uso del mismo para explorar el proceso del desarrollo embrionario (Zagris, 2022). Gracias a la versatilidad de este modelo fue posible el descubrimiento de varios aspectos del desarrollo, como la primera descripción de las tres capas germinales por Pander (Tseng et al., 2017) y de la cresta neural por His (Bronner and LeDouarin, 2012). A lo largo de los años, el embrión de pollo fue incorporado en distintos campos de la biología, incluyendo el cáncer. Esto tiene sus orígenes en los primeros implantes exitosos de tejidos de otras especies en el embrión de pollo llevados a cabo por Murphy y colaboradores en las primeras décadas del siglo XX (Murphy, 1912; Rous, 1911) y posterior implante de tejidos humanos logrado, por primera vez, por Dagg (Dagg et al., 1954). Estos experimentos demostraron que el embrión de pollo resultaba un modelo animal apto para realizar implantes de tumores, y permitieron que investigadores como Knighton pudieran analizar aspectos claves del desarrollo tumoral en este modelo, como lo es la angiogénesis y la cuantificación de parámetros de crecimiento tumoral (Knighton et al., 1977). La posibilidad de realizar implantes exitosos en el embrión de pollo tanto de tumores como de otros tejidos de diferentes especies es posible, en gran parte, por la presencia de un sistema inmune que permanece inmaduro hasta el día 18 del desarrollo embrionario (ED18) (Jankovic et al., 1975).

El huevo amniota posee membranas extraembrionarias que dan origen al saco vitelino, el amnios, el corion y el alantoides, que rodean al embrión y proveen un ambiente óptimo para su desarrollo (Gabrielli and Accili, 2010; Givisiez et al., 2020). El tiempo total de desarrollo embrionario es de 21 días (Hamburger and Hamilton, 1992). Entre los días embrionarios (ED, del inglés *embryonic day*) ED5 y ED6, el alantoides se fusiona con el corion formando la membrana corioalantoidea (CAM) (Deryugina and Quigley, 2008; Melkonian et al., 2002). La función de la CAM es análoga a la de la placenta de los mamíferos ya que provee nutrientes y permite el intercambio de gases con el exterior (Ribatti, 2016; Tamanoi, 2019). Su rápido y alto nivel de vascularización, además de su fácil acceso, posicionan a la CAM como una herramienta útil para análisis de angiogénesis e implantes de biopsias y células tumorales (Deryugina and Quigley, 2008; Li et al., 2015; Ribatti, 2014; Slodownik et al., 2009). En el modelo del embrión de pollo, además de observar la formación de tumores, se puede analizar el proceso de invasión tumoral. Este proceso constituye un paso crucial en la progresión del cáncer y puede culminar en la formación de tumores secundarios (Subauste et al., 2009). Una de las estrategias para estudiar la invasión tumoral en la CAM es a través de cortes histológicos de los implantes tumorales teñidos con hematoxilina y eosina, esta metodología

permite observar las células tumorales invasivas que atraviesan el epitelio y la membrana basal de la CAM (Slekiene et al., 2018).

Es por estos motivos que el embrión de pollo es utilizado actualmente como modelo alternativo de estudio de la biología del cáncer mediante el implante de células tumorales en la CAM (**figura 14**).

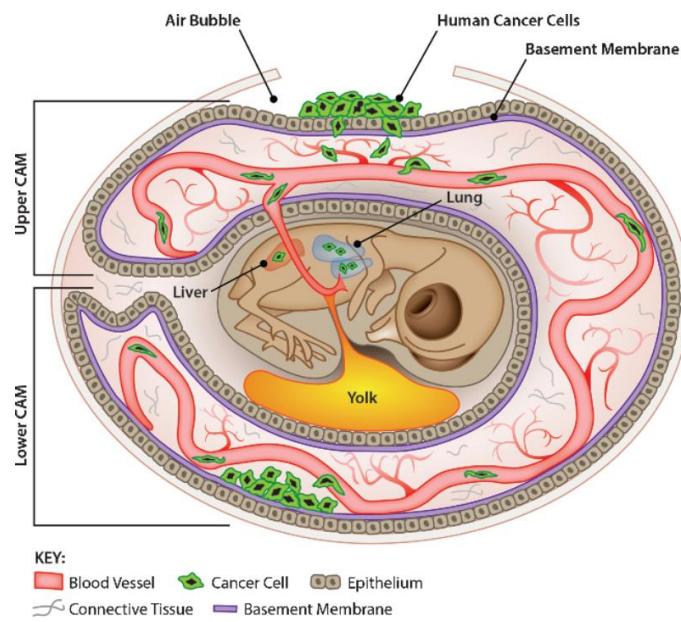


Figura 14. Esquema representativo del uso de la CAM del embrión de pollo para estudiar la progresión tumoral. Las células tumorales pueden invadir el epitelio y la membrana basal de la CAM, atravesar el tejido conectivo y llegar hasta la vasculatura, lo que les permite circular hacia otras regiones (Liu et al., 2013).

En base a lo desarrollado en este apartado introductorio, en esta tesis se exploraron los efectos antitumorales de drogas comúnmente utilizadas en psiquiatría y neurología, con el objetivo de evaluar su potencial reposicionamiento como terapias para el tratamiento del NB en el caso del VPA y PDAC en el caso de la FLX. Para ello, se analizaron *in vitro* las concentraciones óptimas de tratamiento, su impacto en la viabilidad celular, en la morfología celular y en las capacidades proliferativas y migratorias, así como los posibles mecanismos moleculares implicados en sus efectos. Además, se investigó el efecto del VPA utilizando un modelo *in ovo*, permitiendo evaluar su acción en un contexto biológico más complejo.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos e hipótesis

Las **hipótesis** de este trabajo son dos:

- 1) Que el tratamiento con ácido valproico (VPA) en líneas celulares de neuroblastoma (NB) induce la diferenciación neuronal, disminuye la tasa de proliferación celular, la migración, el crecimiento tumoral y la capacidad invasiva; y que aumenta la eficacia del tratamiento con ácido retinoico. Una afirmación que se desprende de esta hipótesis es que la diferenciación de células de neuroblastoma involucra cambios en la expresión de factores que resultan en la disminución de la agresividad celular.
- 2) Que el tratamiento con fluoxetina (FLX) en una línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) disminuye la agresividad tumoral, siendo la inhibición de la autofagia un posible mecanismo que explique este efecto.

El **objetivo general** es analizar los efectos de los tratamientos con VPA y con FLX en las características tumorales del NB y del PDAC, respectivamente.

Del objetivo general y las hipótesis planteadas se desprenden dos objetivos específicos:

- 1) Evaluar el efecto del VPA en células de NB. Estudios de otros laboratorios demuestran el efecto del VPA en distintos modelos y tipos celulares y como agente diferenciador de células de NB. Sin embargo, más allá de efectos en proliferación y viabilidad no se han estudiado las consecuencias de este tratamiento sobre características celulares asociadas al fenotipo tumoral, tales como migración e invasión celular. Por ello, este objetivo se basa en el análisis *in vitro* de proliferación, viabilidad y migración en condiciones de tratamiento con VPA en las líneas celulares de NB SK-N-SH y SH-SY5Y, y su efecto en combinación con el ácido retinoico. Parte de este objetivo es también evaluar *in ovo* el efecto del tratamiento con VPA en tumores de NB implantados en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM). La pregunta central de esta parte es si el comportamiento celular observado *in vitro* es similar al del modelo *in ovo*, donde las células se organizan en tres dimensiones y se encuentran presentes en un sistema *in vivo*. Para ello, se utilizaron células tratadas por 7 días con VPA o su vehículo como control. A partir de dichas células se generaron esferoides que fueron implantados en la CAM.
- 2) Evaluar el efecto de la FLX en PDAC. Estudios de otros laboratorios demuestran el efecto de la FLX en distintos tipos celulares, enfocándose en su rol inhibidor de la autofagia en algunos de ellos. Este objetivo se basa en el análisis de viabilidad y proliferación en condiciones de tratamiento con FLX en la línea celular de PDAC PANC-1 e investigar el efecto que tiene la droga sobre la autofagia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

Aspectos éticos

La Oficina de Protección contra Riesgos de Investigación (OPRR) de los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) es responsable de desarrollar, implementar y supervisar el cumplimiento de la Política del Servicio de Salud Pública (PHS) sobre el cuidado y el uso de animales de laboratorio en Estados Unidos. La Política de PHS, junto con el Reglamento de Bienestar Animal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), son documentos de referencia internacional que establecen los requisitos para el cuidado y el uso de animales de experimentación que deben cumplir las instituciones que los utilizan en investigación, y/o educación. Bajo este marco, la política de PHS es aplicable a las actividades propuestas que involucran animales vertebrados vivos. En el caso del modelo aviar, la PHS interpreta que el término "animal vertebrado vivo" se aplica sólo después de la eclosión. Por este motivo, los protocolos experimentales de este proyecto, que involucran embriones de pollo que se sacrifican a lo sumo en el estadio embrionario ED18, no requieren la revisión del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCEN (CICUAL). No obstante, existen evidencias que indican que los embriones aviares a partir de ED14 pueden experimentar dolor y por este motivo el procedimiento adoptado en los protocolos experimentales consiste en realizar, a los embriones de pollo entre ED14-ED18, eutanasia mediante decapitación. (IACUC, 2012; Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011; Institutional Animal Care and Use Committee, 2005; (Leary et al., 2013).

Cultivo celular

Las líneas celulares SK-N-SH, SH-SY5Y y PANC-1 fueron cultivadas a 37°C en atmósfera de aire con 5% de CO₂, en placas de 100 mm. Las PANC-1 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO), las SH-SY5Y en medio DMEM/F12 (GIBCO) y para las SK-N-SH dependiendo del experimento se usó DMEM o DMEM/F12 garantizando que para un mismo experimento se utilizó el mismo medio de cultivo. En todos los casos, los medios de cultivo se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (Natocor, SFB) 3.7g/L de bicarbonato de sodio y antibiótico-antimicótico (Gibco,1000 unidades/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de anfotericina B) (medio completo).

Para el repique de las células primero se quitó el medio de cultivo de la placa, luego se lavó 2 veces con buffer fosfato salino (PBS 1X: 137 mM NaCl, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM) y se agregó solución de tripsina 0,05% EDTA (GIBCO). Las células se dejaron a 37°C, en atmósfera de aire con 5% de CO₂, hasta que las células se despegaron de la placa. Luego se resuspendieron en medio fresco y dependiendo del número total de células

Materiales y métodos

se realizaron diluciones adecuadas para el mantenimiento de la línea celular y el plaqueo de los experimentos.

Adicionalmente, según la línea celular, se hicieron distintos tratamientos:

- Para las SK-N-SH y las SH-SY5Y se agregó al medio de cultivo VPA 2 mM (Merck, 0.28 mg de VPA sólido por ml de medio) utilizando como control medio sin agregado de droga. Adicionalmente, las SH-SY5Y se trataron con ATRA 10 µM (SIGMA, 3 µl por ml de medio, sólo o en combinación con VPA, utilizando como control DMSO 0.003% (Sintorgan). Para este caso, dado que el VPA se vehiculiza en el propio medio de cultivo, se agregó DMSO al tratamiento con VPA para poder efectuar las comparaciones entre las condiciones experimentales.
- Para las PANC-1 se agregó al medio de cultivo FLX (Sigma) 10 o 20 µM (0.4 o 0.8 µl por ml de medio respectivamente) utilizando como control DMSO 0.0004 o 0.0008%. Para inhibir el flujo autofágico, en estas células, se utilizó cloroquina (CQ) 100 µM (Abcam, 24 µl por ml de medio) o cloruro de amonio (CINH₄) 20 mM (Anedra, 102 µl por ml de medio) en agua.

Ensayo de viabilidad celular por exclusión de *Trypan Blue*

Este ensayo es usado para determinar el número de células viables en una suspensión celular. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos compuestos, como el *Trypan blue*, mientras que las células muertas no. Bajo el microscopio, las células viables presentan un citoplasma claro, mientras que las no viables presentan una tinción azul en su citoplasma (Strober, 2015). Para realizar el ensayo, una alícuota de las células tratadas y de las células control se diluyó al medio con una solución de *Trypan Blue* 0,4% (azul tripán 400 mg, NaCl 810 mg, K₂HPO₄ 60 mg y metil-p-hidroxibenzoato 50 mg a pH 7,4, en PBS). Se incubó 4 minutos a temperatura ambiente y se colocó una alícuota de esta mezcla en una cámara de Neubauer para realizar el recuento celular, utilizando un microscopio de campo claro, en los cuatro cuadrantes de la cámara. El porcentaje de viabilidad se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Número de células blancas}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

Ensayo de viabilidad por MTT

El ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) permite cuantificar el número de células viables a partir de su estado metabólico. Por lo tanto, es utilizado para determinar la citotoxicidad de distintos tratamientos y/o condiciones experimentales. El

Materiales y métodos

principio de este ensayo considera que, para la mayoría de las células viables, la actividad mitocondrial es constante y, por lo tanto, un aumento o disminución en el número de células viables es proporcional a la actividad mitocondrial. La actividad mitocondrial de las células se refleja en la conversión de la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán por medio de las enzimas mitocondriales. Por lo tanto, cualquier aumento o disminución en el número de células viables puede detectarse midiendo la concentración de formazán reflejada en la densidad óptica (OD) por espectrometría a 570 nm (van Meerloo et al., 2011). A partir de una suspensión celular, se cuantificó el número de células y se plaqueó el mismo número de células (entre 1000 y 10.000 por well dependiendo la línea celular y la finalidad del experimento) en una placa de 96 wells, a un volumen final de 150 µl con medio completo. Las células se mantuvieron a 37°C, en atmósfera de aire con 5% de CO₂. Al día siguiente se lavaron los wells con PBS 1X y se agregaron 90 µl del medio de cultivo correspondiente y 10 µl de una solución 5 mg/ml de MTT (MedChemExpress) por well. Se incubó a 37°C, en atmósfera de aire con 5% de CO₂ el tiempo necesario para detectar la formación del formazán por su color. Luego, se removió el medio y se agregó 100 µl de DMSO para disolver el formazán. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm y a 630 nm en un lector de placas (DR 200Bs Diatek) que presenta el resultado como la absorbancia a 570 nm menos la absorbancia a 630 nm. La lectura de 570 nm corresponde al formazán formado por la actividad mitocondrial y asumimos que es proporcional a la viabilidad celular. La lectura a 630 nm corresponde a la lectura de referencia, que es proporcional a los restos celulares con la finalidad de comprobar que no existen diferencias significativas entre muestras. Para el análisis de los datos se calculó el promedio del blanco (correspondiente a wells donde solo se agregó DMSO) el cual se restó a cada dato experimental.

Inmunohistoquímica de cultivos celulares

La inmunofluorescencia (IF) es una técnica ampliamente utilizada en el campo de las ciencias biológicas y médicas. Esta técnica se basa en el principio de interacción antígeno-anticuerpo y se utiliza para la identificación de constituyentes celulares o tisulares, es decir, para la identificación de un antígeno mediante el uso de un anticuerpo específico acoplado a un fluoróforo. La unión del anticuerpo al antígeno puede detectarse directamente mediante el uso de un anticuerpo primario marcado o indirectamente mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado fluorescente. Este segundo método es más sensible en comparación con el primero. Aquí, un anticuerpo primario no marcado se detecta mediante un anticuerpo secundario marcado contra la inmunoglobulina de la especie animal en la que se generó el anticuerpo primario. Tales interacciones brindan información sobre el proceso celular que ocurre dentro de la célula (Birla et al., 2020). En una placa de 24 wells se colocaron

Materiales y métodos

cubreobjetos redondos de 10 mm de diámetro previamente esterilizados con etanol 70% y luz UV por 30 minutos. Sobre los mismos, se sembraron entre 7000 y 10000 células (dependiendo del experimento) y se mantuvieron a 37°C con 5% CO₂ por 24 hs. Al día siguiente, se realizaron los tratamientos correspondientes para cada tipo celular. Al momento de iniciar la tinción se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se fijaron las células con metanol 100% (Sintorgan) por 10 minutos a -20°C y se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS 1X. Posteriormente, las células se permeabilizaron con PBS 0,1% Tritón X-100 por 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 minutos. Posteriormente, los cubreobjetos se incubaron 1 hora y 30 minutos con 25 µl de solución de bloqueo (Roche) invertidos sobre la solución en parafilm. Finalizado el bloqueo, se agregó el anticuerpo primario (en la dilución adecuada) preparado con la misma solución de bloqueo previamente utilizada. En esta tesis se utilizaron los anticuerpos anti-ASCL1 (ab74065, Abcam) y anti-vimentina (D21H3, Cell signalling) generados en conejo. La dilución utilizada fue 1/100 en ambos casos. En todos los casos el anticuerpo primario se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS 0.05% Tween-20 por 10 minutos y se agregaron 25 µl del anticuerpo secundario (dilución 1/250), preparado en la misma solución de bloqueo que el anticuerpo primario, y con los cubreobjetos invertidos sobre el parafilm. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se utilizaron diferentes fluoróforos acoplados al anticuerpo secundario, en estos casos anti-conejo Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Terminadas las incubaciones, los cubreobjetos se incubaron con DAPI por 5 minutos, se lavaron tres veces con PBS-0.05% Tween-20 por 10 minutos y se montaron las muestras con 5 µl de gelvatol (Mowiol) dejándolas a temperatura ambiente toda la noche al resguardo de la luz. Las tinciones fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia ZEISS Axio Scope A1.

Ensayo de formación de colonias

El ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonias es un ensayo *in vitro* que permite analizar la capacidad de una sola célula para formar una colonia (Franken et al., 2006). Suspensiones de células se sembraron en placas de 6 wells en baja confluencia (entre 2000 y 10000 células dependiendo la línea celular) en medio líquido. Las células se incubaron en una atmósfera de aire con 5% de CO₂ el tiempo suficiente hasta observar la formación de colonias (entre 7 y 10 días) y luego se revelaron las colonias mediante una tinción con cristal violeta. Para eso se retiró el medio de cultivo de los wells, se lavó una vez con PBS 1X y se fijó con metanol-acético glacial (3:1) incubando por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación. Luego se lavó con agua, se tiñó con cristal violeta 3% (en agua destilada 20% metanol) por 40 minutos en agitación y se lavó con agua nuevamente hasta eliminar el exceso

del cristal violeta. Se tomaron fotos con un celular acoplado al ocular de la lupa mediante un soporte y se contó el número de colonias. Para medir la absorbancia del cristal violeta (Guzman et al., 2014), se dejaron las placas aproximadamente una hora en agitación con SDS 10% hasta resuspender todo el colorante. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (DR 200Bs Diatek). Para el análisis de los datos a cada dato experimental se le restó el promedio de los *wells* blanco (*wells* con agua).

Ensayo de migración por *transwell*

El ensayo de migración por *transwell* consta de un inserto con un fondo de membrana porosa que se coloca dentro de un *well*, generando dos compartimentos: uno superior y otro inferior (**figura 15**). Las células se siembran en el compartimento superior y migran a través de la membrana al compartimento inferior que contiene usualmente un estímulo quimiotáctico como, por ejemplo, el SFB. Para crear un gradiente quimioatractante, se colocan las células en el compartimento superior con medio de cultivo sin suero y se agrega medio de cultivo con suero en el compartimento inferior (Omar Zaki et al., 2019). Para este ensayo se utilizaron insertos *transwell* con un tamaño de poro de 8 µm (Corning) colocados dentro de los *wells* de una placa de 24 para generar los dos compartimentos mencionados. Se plaquearon 30.000 células SK-N-SH (tratadas previamente por 72 horas con VPA 2 mM y control) en el compartimento superior con 100 µl de medio DMEM sin SFB y se agregaron 750 µl de DMEM con 10% SFB en el compartimento inferior. Las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 24 hs. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo de ambos compartimentos y se usó un hisopo para remover suavemente las células del compartimento superior. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS 1X y se fijaron las células colocando al inserto en un *well* con PFA 4% (Carlo Erba) en PBS 1X durante 15 minutos. Finalizado ese tiempo, se colocó el inserto en un *well* con PBS 0.05% Tween-20 por 15 minutos y se hicieron dos lavados de 5 minutos con PBS 1X. Finalmente, se agregaron 750 µl de solución DAPI durante 5 minutos y se lavó con PBS 1X. Se tomaron fotos en un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX71) y se cuantificó el número de células con capacidad migratoria tanto para las células tratadas como las células control. El análisis se llevó a cabo utilizando el software *ImageJ* (Schindelin et al., 2012).

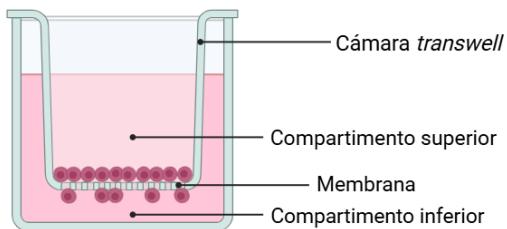


Figura 15. Esquema representativo del dispositivo utilizado para el ensayo de *transwell*.

Se señalan la cámara *transwell*, los compartimentos inferior y superior y la membrana de poros de 8 μm . Los círculos representan células, siendo los que se encuentran en el compartimento superior células que no migraron y en el inferior células que migraron.

Ensayo de confluencia

Una forma sencilla de medir diferencias en la tasa de proliferación es analizando el porcentaje de confluencia a lo largo del tiempo de incubación. Para ello, se sembraron 10.000 células SK-N-SH previamente tratadas por 72 hs en placas de 6 wells y su proliferación fue monitoreada en el microscopio de campo claro (Leica DMi1) a los días 3, 5, 7 y 10 luego de ser plaqueadas. Se sacaron fotos en los días mencionados y se midió el área ocupada por las células utilizando el software *ImageJ* (Schindelin et al., 2012). El procesamiento de las imágenes consistió en convertir las imágenes a blanco y negro, restarles un fondo para facilitar que el software identificara bien los límites de las células, determinar un mismo umbral de intensidad para todas las fotos que permitiera seleccionar únicamente a las células, y crear una máscara binaria a partir del umbral determinado. Una vez obtenida esta máscara, se aplicaron las operaciones *despeckle* para eliminar puntos aislados en la máscara que pudieran interferir con la determinación subsiguiente, y *dilate* para eliminar de la máscara los espacios entre las células que resultaban en subestimación de la confluencia. Finalizadas estas correcciones, se cuantificó la fracción del área de la imagen ocupada por células.

Formación de esferoides

Los cultivos celulares en 2D, aunque ampliamente utilizados, no replican completamente el entorno complejo de los tejidos tumorales. En estas condiciones, las células reciben niveles excesivos de nutrientes, oxígeno a presión atmosférica y un pH fisiológico que no refleja el microambiente tumoral, lo que dificulta la retención de su morfología, heterogeneidad y perfil molecular, limitando la información que se puede obtener de los mismos (DeBord et al., 2018; Gillies et al., 2008). En contraste, las metodologías de cultivo en 3D, como los esferoides, ofrecen una alternativa más representativa. Este modelo simula el núcleo avascular de los

Materiales y métodos

tumores sólidos, reproduciendo gradientes de oxígeno y nutrientes característicos del microambiente tumoral, posicionándolo como una herramienta valiosa para reducir la brecha entre los cultivos *in vitro* y los modelos *in vivo* (Arora et al., 2024).

Para la generación de los esferoides se plaquearon suspensiones de células en medio completo suplementado con colágeno en una placa de 96 wells de baja adherencia.

Las cantidades de células y el porcentaje de colágeno se aclaran en la **tabla 1**:

Línea Celular	Número de células por esferoide	% de colágeno	Volúmen de colágeno (μl)	Volúmen final por esferoide (μl)
SK-N-SH	1×10^5	20	36	180
SH-SY5Y	$4 \text{ o } 6 \times 10^5$	20	36	180
PANC-1	1×10^5	10	18	180

Tabla 1. Número de células y volúmenes requeridos para el armado de esferoides de las líneas celulares SK-N-SH, SH-SY5Y y PANC-1.

Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Dependiendo del caso, al día siguiente del armado de los esferoides se cambió el medio de los mismos por el medio acorde a los distintos tratamientos, el cual se renovó cada tres días. Para caracterizar a los esferoides se tomaron fotos de los mismos con una cámara AmScope FMA050 adosada a una lupa y se midió el área con el software *ImageJ*.

Western blot

Las células se lisaron utilizando *cracking buffer* (TrisHCl 10% 1 M, pH 6.8 (Biopack), SDS 138.7 mM (Sigma), Glicerol 20% (Anedra), EDTA 5% 0,5 M (Anedra), azul de bromofenol 0.59 mM (Merck) y β-mercaptoetanol 0.2% 14.3 M (Sigma-Aldrich)). Previó al sembrado se sonicaron las muestras utilizando un sonicador de punta (Vibracell-SONICS) por 10s a una amplitud del 20%. La proteína total se separó mediante SDS-PAGE (gel concentrador 5% y gel separador 15%) embebido en buffer de corrida (Tris 24.9 mM (Biofroxx), Glicina 191.8 mM (Biofroxx) y SDS 3.46 mM (Molecular Biology)) sometido a un campo eléctrico por 80 minutos a temperatura ambiente con una corriente constante de 20 mA para el gel concentrador y 25 mA para el gel separador (sistema de electroforesis Mini PROTEAN® Tetra Cell, Bio-rad).

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Merck), en el caso de ASCL1, y a una de fluoruro de polivinilideno (PVDF activada con metanol, Merck), en el de LC3, utilizando buffer de transferencia (24,9 mM Tris (Biofroxx), 191,8 mM Glicina (Biofroxx), 20% metanol 100% (Sintorgan)) y aplicando un campo eléctrico de 100 V durante 90 minutos a 4°C. Se verificó la correcta transferencia de proteínas totales mediante

Materiales y métodos

una tinción con 0,1% (p/v) de Rojo Ponceau (Sigma) en ácido acético al 5% (v/v) en agua destilada. Las membranas se bloquearon en leche descremada al 5% (p/v) en solución salina tamponada con Tris y Tween-20 (TBST) (19,95 mM Tris (Biofroxx), 150 mM NaCl (Anedra), 0,1% (v/v) Tween-20 (Biopack)) durante 1 hora y se lavaron 5 veces con TBST durante 5 minutos cada vez. Después de los lavados, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con sus respectivos anticuerpos primarios a la dilución adecuada en TBST: conejo anti-ASCL1 (ab74065, Abcam, 1:1000), conejo anti- α -actina (sc-7210, Santa Cruz, 1:1000), conejo anti-LC3B (2775s, Cell Signaling, 1:1000) y ratón anti-GAPDH (Abcam, 1:10000). Las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con un anticuerpo secundario, dependiendo del origen del anticuerpo primario, anti-conejo (A0545, Sigma Aldrich, 1:1000) o anti-ratón (Bio-Rad, 1:3000), ambos conjugados con peroxidasa de rabanito y diluidos en leche descremada al 5% (p/v) en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las membranas se lavaron 5 veces con TBST durante 5 minutos con agitación suave. Las señales específicas se visualizaron siguiendo las instrucciones del kit Bio-Rad Clarity™ (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad). Se aplicó un protocolo de *harsh-stripping* (Abcam) para evaluar la expresión de α -actina y GAPDH como control de carga. Las imágenes se adquirieron utilizando el detector de quimioluminiscencia Amersham™ Imager 600-FUJI (GE Healthcare Bio-Sciences) y se cuantificaron mediante el software *ImageJ* (Schindelin et al., 2012).

Ensayos *in ovo*

Manipulación de los huevos

Se utilizaron huevos provistos por la Cámara Argentina de Productores Avícolas (cabaña Camila) y la Granja 3 Arroyos. Estos se incubaron a 37°C con 60% de humedad en posición horizontal considerándose ese día como el día de inicio(ED0). Entre los días ED2 y ED3, se realizó una extracción de 3 ml de clara con una jeringa estéril para formar un falso saco de aire y permitir que la CAM se desprenda adecuadamente de la membrana interna de la cáscara. Entre los días ED5 y ED8, se abrió una ventana de 1cm² aproximadamente sobre la cáscara del huevo y se agregó PBS 1X con antibiótico (Gibco, 1000 unidades/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de anfotericina B) sobre la CAM para evitar su desecación. Las ventanas se sellaron con cinta aisladora para permitir la continuación del desarrollo embrionario. Entre el ED8 y ED9, se realizó el implante celular de los esferoides de células SK-N-SH previamente tratados por 96 horas con VPA 2 mM. Para el seguimiento del crecimiento tumoral post-implante, se tomaron fotos con lupa utilizando una cámara AmScope FMA050 hasta el día ED19, momento en que se sacrificaron los embriones por

decapitación. En la **figura 16** se muestra el flujo de trabajo correspondiente para la implantación de los esferoides *in ovo*.

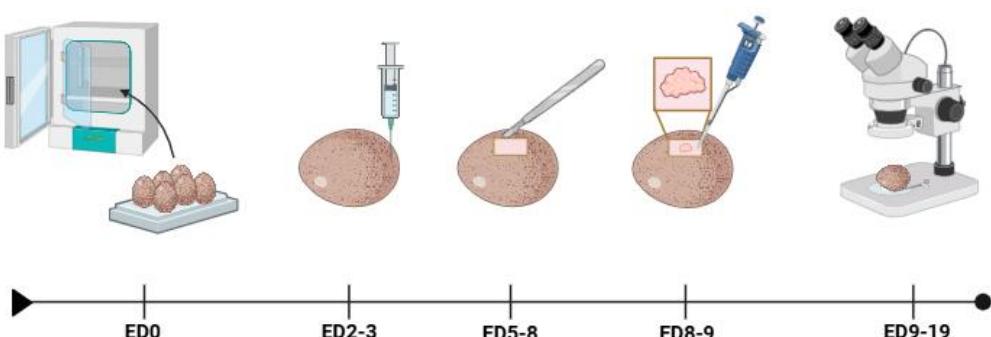


Figura 16. Esquema del flujo de trabajo para la implantación de esferoides *in ovo*.

Preparación de tejidos para su análisis

Al día ED19, los implantes fueron extirpados junto con la CAM mediante el corte de la membrana alrededor de los límites del implante. El tejido extraído se colocó en una placa de 24 wells y se fijó con PFA 4% (Carlo Erba) en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1X por 10 minutos y se incubó en una solución de sacarosa 20% en PBS 1X toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se embebió a los tejidos en medio de montaje CRYOPLAST® (Biopack) en cubetas de aluminio, se realizó el congelamiento mediante el empleo de hielo seco y los bloques se almacenaron en un freezer a -80°C hasta su uso. Mediante el uso de un criostato (Leica CM1520) para cada bloque se cortaron secciones de 30 µm de grosor las cuales se transfirieron a portaobjetos de vidrio cargados (VWR® VistaVision™ HistoBond®).

Tinción hematoxilina-eosina

La mayoría de las células y matrices extracelulares no poseen un color propio, por lo que su observación directa al microscopio óptico no permite observar en detalle sus características morfológicas. Para esto, se emplean diversos colorantes que se unen a determinadas estructuras del tejido. La tinción con hematoxilina-eosina tiñe el núcleo y el citoplasma con colores contrastantes, lo cual permite diferenciar fácilmente los componentes celulares (Feldman and Wolfe, 2014).

Sobre el tejido colectado en el criostato se realizó un primer lavado de 5 minutos con agua destilada. Luego, se incubó durante 20 minutos en Hematoxilina de Carazzi. Una vez pasados los 20 minutos, los tejidos se lavaron con agua corriente para diferenciar la hematoxilina. Se procedió a lavar dos veces con agua destilada por 1 minuto para luego incubar los tejidos con Eosina Amarillenta (Gelblich, MERCK) 0,2% en agua destilada durante 20 segundos. A continuación, se realizó un pasaje por etanol 70% hasta desplazar toda la Eosina, siguiendo

Materiales y métodos

con dos lavados de 3 minutos con etanol 96%, dos lavados de 3 minutos con etanol 100% y dos lavados de 3 minutos con Xileno. Finalmente, los tejidos se montaron con DPX (SIGMA) y las tinciones se visualizaron en un microscopio de campo claro ZEISS Axio Scope A1 y procesadas por el software ZEISS ZEN.

Análisis estadístico

Los valores se expresan como el promedio \pm DE. Se utilizaron las pruebas de *Mann-Whitney*, *Kruskal-Wallis* para identificar diferencias significativas entre las comparaciones dependiendo el caso. P<0,05 fue considerado estadísticamente significativo. El software estadístico utilizado fue el *GraphPad Prism 5.01*.

RESULTADOS

Neuroblastoma y VPA

Resultados

1. Neuroblastoma y VPA

1.1 Morfología

1.1.1 Curva de concentración de VPA

Se realizó una curva de concentración de VPA con el objetivo de evaluar si la concentración previamente reportada en la bibliografía era adecuada para llevar a cabo los experimentos planeados. La concentración de referencia de 2 mM, corresponde a la utilizada experimentalmente para otros tipos celulares en los que se observaron efectos antitumorales (Bhalla, 2005; Giordano et al., 2023). Además, esta concentración es utilizada experimentalmente en líneas celulares de NB (Shah et al., 2013), donde las células son tratadas durante 72 horas (Fang et al., 2019; Stockhausen et al., 2005).

Para realizar este ensayo, se plaquearon 5000 células SK-N-SH en una placa de 24 wells y al día siguiente el medio fue reemplazado por DMEM completo sin VPA o con concentraciones crecientes de la droga (0.5, 1, 2, 4 y 5 mM). Luego de 72 horas, se observó que en la concentración de 0.5 mM no hubo cambios significativos en la morfología celular respecto al control (0 mM). Sin embargo, a partir de 1 mM sí se detectaron alteraciones, específicamente un alargamiento de las células, que se hizo más evidente a 2 mM y, al ser la concentración de referencia, se decidió continuar utilizando esta concentración en los experimentos posteriores (**figura 17**). Este efecto observado sobre la morfología de las células SK-N-SH podría ser indicador de una alteración en el fenotipo tumoral, lo que posteriormente fue explorado en parte de los experimentos que se detallan a continuación.

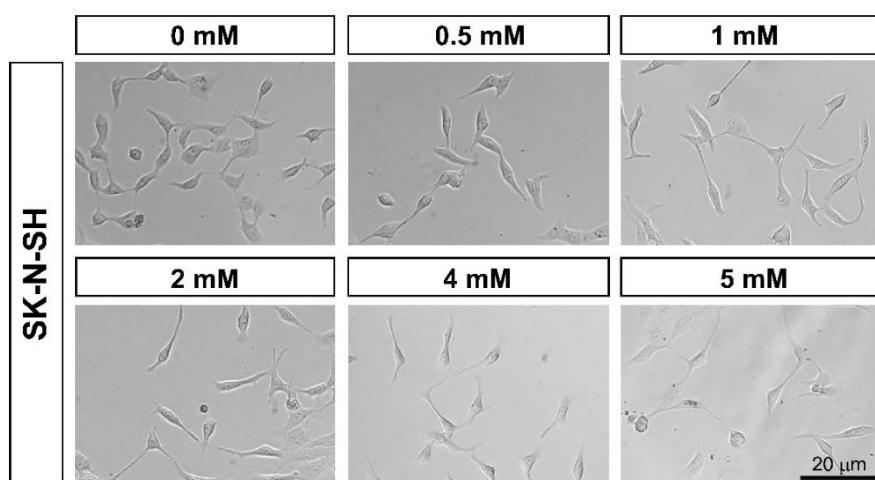


Figura 17. Curva de concentración de VPA. Imágenes representativas de células SK-N-SH para las distintas concentraciones probadas de VPA luego de 72 horas de tratamiento. Número de repeticiones (n)=1.

1.1.2 Análisis del cambio morfológico

Una vez determinada la concentración óptima de VPA, para analizar el cambio observado se clasificó a los fenotipos en 3 categorías basadas en las morfologías observadas: (1) células sin proyecciones, (2) células con una sola proyección y (3) células con dos o más proyecciones. Estas morfologías se cuantificaron con el objetivo de determinar la proporción de cada una (**figura 18**).

A partir de los datos recolectados, se detectó que el VPA: (1) Disminuye la proporción de células sin proyecciones, (2) Incrementa el número de células con una sola proyección (este fenómeno, donde las células adquieren una morfología más parecida a la neuronal sugiere un mayor grado de diferenciación celular) y (3) No afecta la proporción de células con dos o más proyecciones.

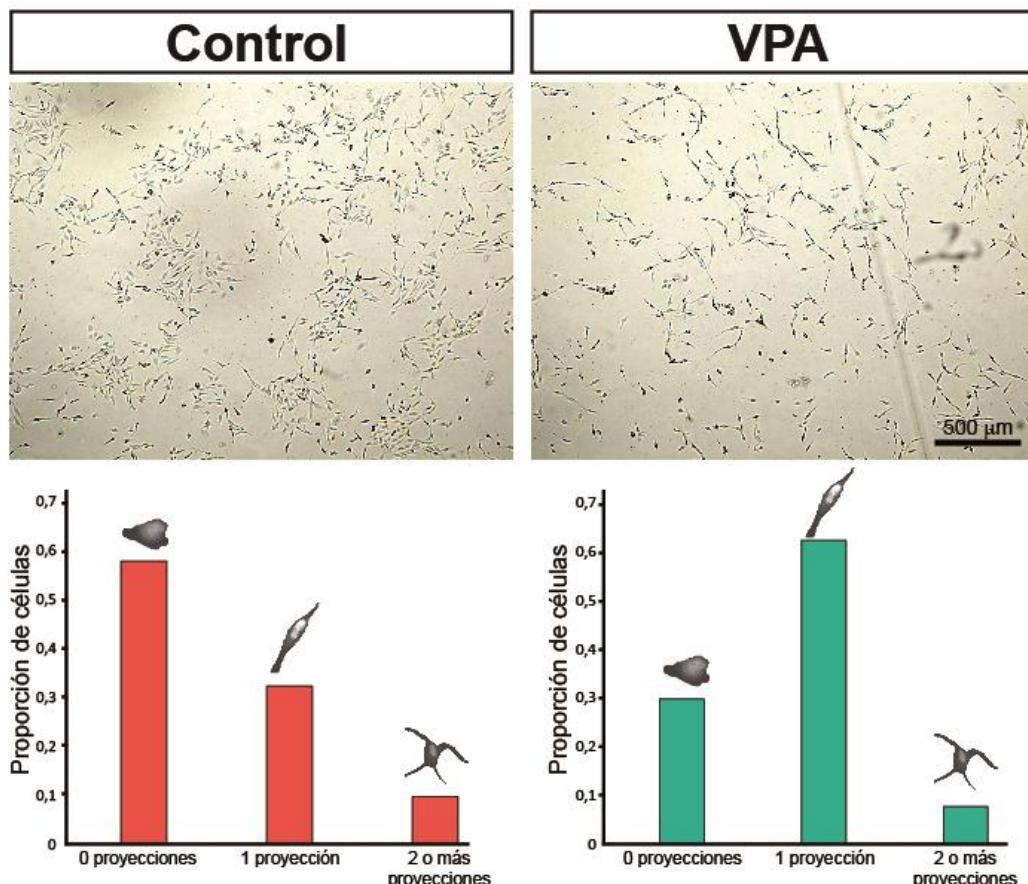


Figura 18. **Morfología de las células SK-N-SH control y tratadas con VPA.** Arriba, imágenes representativas de las células control y tratadas con VPA (2 mM) luego de 72 horas de tratamiento. Abajo, cuantificación de células *wild type*, con una proyección y dos o más proyecciones para ambas condiciones. n=1.

En las células SH-SY5Y también se observó un cambio fenotípico en las células después de tratarlas por 72 horas con VPA en comparación con las células control, reflejado en un alargamiento de las células, aunque mucho más sutil que en las SK-N-SH (**figura 19**). Esto

sugiere que el VPA tiene efectos que no se limitan a una única línea celular de NB, sino que el impacto se encuentra más generalizado en las líneas celulares de este tumor. Este comportamiento consistente en ambas líneas celulares refuerza la hipótesis de que el VPA promueve alteraciones morfológicas potencialmente asociadas con procesos de diferenciación celular en líneas de NB.

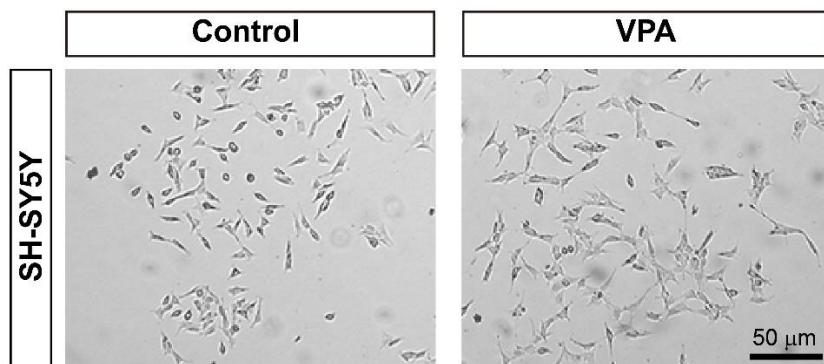


Figura 19. **Morfología de las células SH-SY5Y control y tratadas con VPA (2 mM).** Imágenes representativas de células SH-SY5Y sin tratamiento y tratadas con VPA 2 mM luego de 72 horas de tratamiento. n=1.

1.2 Viabilidad

Tras la caracterización morfológica del impacto del VPA en la morfología de las células tratadas en comparación con las células control, se analizaron distintos parámetros que pudieran caracterizar una posible capacidad antitumoral del VPA. En primer lugar, se evaluó el efecto del tratamiento con VPA sobre la viabilidad de las células SK-N-SH. Este análisis es de suma importancia, ya que evaluar otros parámetros, como la capacidad migratoria o proliferativa, sin antes descartar un efecto sobre la sobrevida podría conducir a conclusiones erróneas. Para ello, la viabilidad se analizó mediante el ensayo de exclusión de *Trypan blue* y el ensayo de MTT.

El ensayo de exclusión de *Trypan blue* permitió identificar el número de células vivas (incoloras) y muertas (azules) tanto en las muestras control como en las tratadas con VPA durante 72 horas para poder calcular la proporción de células viables.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la proporción de células viables entre las dos condiciones (**figura 20**). Esto sugiere que el tratamiento con VPA no afecta la viabilidad de las células SK-N-SH, lo que permite centrar el análisis en otros posibles efectos del VPA, como su impacto en la proliferación o migración celular.

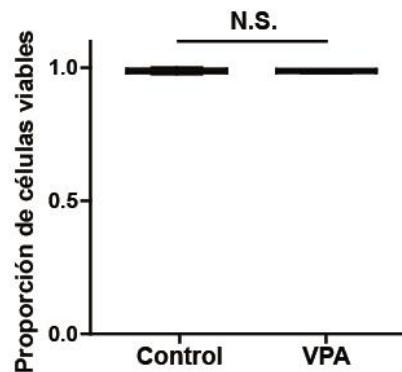


Figura 20. Análisis de viabilidad por exclusión de *Trypan Blue* en células SK-N-SH tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas. Los resultados se expresan como la proporción de células viables \pm DE. Se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* para identificar diferencias significativas. N.S. = no significativo. n=5.

Para el análisis de viabilidad por MTT, el ensayo se realizó al día siguiente de plaquear células pre tratadas con VPA o control por 72 horas (10.000 células por well). Este diseño tenía como objetivo minimizar el impacto de la proliferación, ya que no se esperaría una variación significativa en el número de células en un solo día. Además, permite evaluar la viabilidad de las células a 72 horas que corresponde al tiempo en el cual se realizan los análisis de migración y el tratamiento previo a los ensayos clonogénicos.

Los resultados obtenidos (**figura 21**) indican que la absorbancia relativa y, por tanto, la actividad metabólica de las células pre tratadas con VPA no difiere de las células control, lo que permite descartar un efecto sobre la viabilidad celular del VPA.

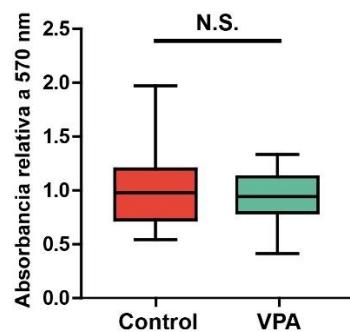


Figura 21. Análisis de actividad metabólica celular por MTT con células SK-N-SH tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas. Los resultados se expresan como la absorbancia relativa \pm DE. Se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* para identificar diferencias significativas. N.S.= no significativo. n=2

Una vez descartado el efecto del VPA sobre la viabilidad de estas células tanto por el ensayo de *Trypan Blue* como por el MTT, se continuó con la caracterización del fenotipo tumoral.

1.3 Proliferación

1.3.1 Proliferación en dos dimensiones

1.3.1.1 Actividad metabólica

Si bien el ensayo de MTT es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la viabilidad celular, también es una herramienta valiosa para medir la proliferación celular (Ghasemi et al., 2021). Esto es posible debido a que el ensayo se basa en la conversión de la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán, reacción catalizada por las enzimas mitocondriales activas en células vivas, lo cual es un indicador directo de la actividad metabólica. En este contexto, una absorbancia baja en un ensayo de MTT podría interpretarse como una disminución en la viabilidad celular, sugiriendo una mayor mortalidad. Sin embargo, una menor absorbancia también podría reflejar una reducción en la actividad proliferativa, lo que llevaría a un menor número de células al momento de la medición.

Teniendo en cuenta esto y con el objetivo de analizar el efecto del VPA sobre la proliferación celular, se realizó una variante del ensayo de MTT mencionado anteriormente, para la cual, se plaquearon 1500 células SK-N-SH en una placa de 96 wells. Al día siguiente, las células se trataron con VPA, y se realizó el ensayo a las 72 horas de tratamiento. De esta forma, los resultados reflejarán tanto diferencias en la viabilidad como de la capacidad proliferativa de las células.

Los resultados mostraron una disminución significativa en la actividad metabólica de las células tratadas con VPA en comparación con las células control (**figura 22**). Dado que previamente se descartó un efecto sobre la viabilidad celular, las diferencias detectadas pueden atribuirse a que el número de células en los wells tratados con VPA es menor y por lo tanto a una disminución en la capacidad proliferativa de las células tratadas con VPA.

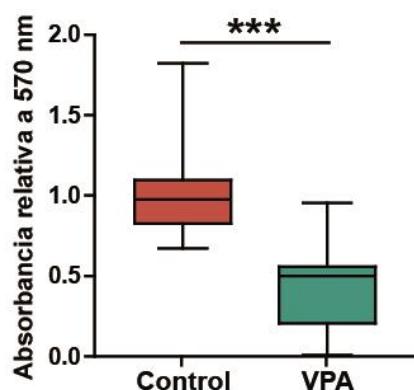


Figura 22. Análisis de actividad metabólica por MTT de las células SK-N-SH tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas después de ser plaqueadas. Los resultados se expresan como la absorbancia relativa \pm DE. Se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* para identificar diferencias significativas (**p<0.001). n=1.

1.3.1.2 Confluencia

Una alternativa para evaluar el impacto de un tratamiento sobre la capacidad proliferativa en dos dimensiones consiste en medir el porcentaje de la superficie de la placa cubierta por las células (confluencia) a lo largo del tiempo para cada condición. De esta forma es posible analizar la tasa de crecimiento celular para cada condición. Para este experimento las células SK-N-SH fueron tratadas con VPA por 72 horas y, luego, sembradas en una placa de 6 wells, con una densidad de 10.000 células por well. Para evaluar los efectos del tratamiento con VPA en la proliferación celular a lo largo del tiempo, se tomaron imágenes de las células a los 3, 5, 7 y 10 días posteriores al plaqueo (**figura 23**), a partir de las cuales se calculó el porcentaje de confluencia. En cada tiempo evaluado, se observó una disminución significativa en el porcentaje de confluencia en las células tratadas con VPA en comparación con las células control (**figura 24**). Estos resultados sugieren que el VPA disminuye la tasa de crecimiento de estas células y, por lo tanto, respaldan la evidencia de que el tratamiento con VPA disminuye la capacidad proliferativa de las SK-N-SH.

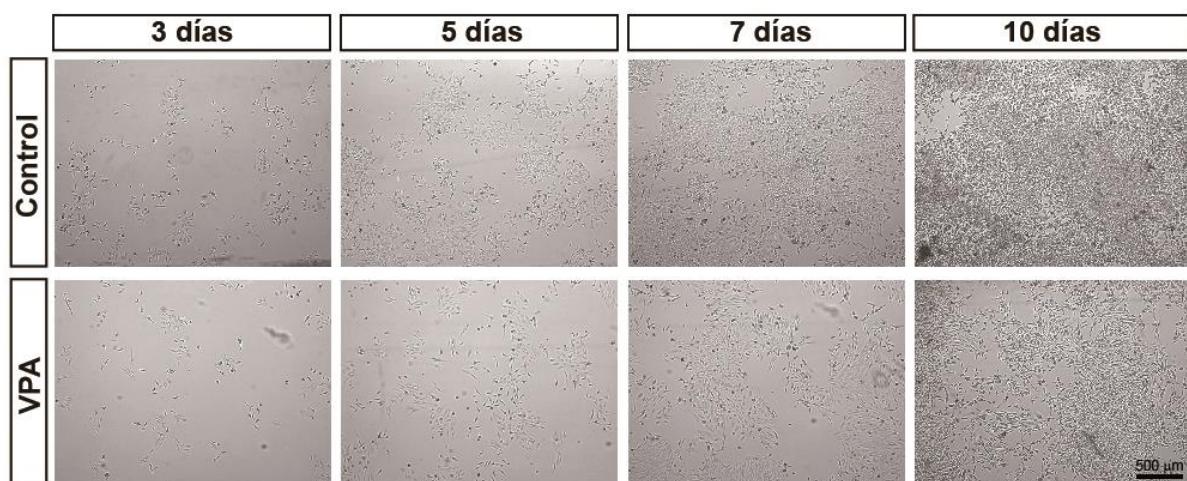


Figura 23. Ensayo de confluencia con células pre-tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas.
Se muestran imágenes representativas para cada condición tomadas a los 3, 5, 7 y 10 días de iniciado el experimento mostrando la progresión de la cobertura de la placa. n=1.

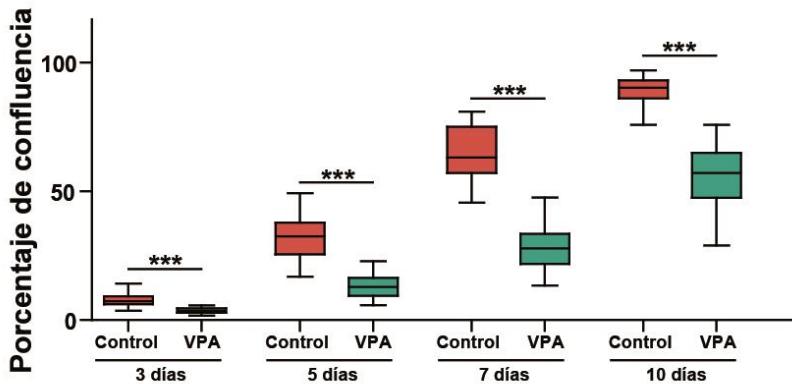


Figura 24. Análisis de confluencia con células pre-tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas. Porcentaje de confluencia \pm DE obtenidos por medición del área de la placa cubierta por células. Se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* para identificar diferencias significativas entre control y tratado para cada día (**p<0.001). n=1.

1.3.1.3 Clonogenicidad

Se evaluó luego la capacidad clonogénica de las células SK-N-SH y SH-SY5Y mediante un ensayo de formación de colonias, el cual permite evaluar la capacidad de una única célula de sobrevivir y formar una colonia. Una disminución en la formación de colonias bajo un tratamiento determinado podría sugerir que la droga afecta propiedades clave de las células tumorales relacionadas con su capacidad de supervivencia en condiciones desfavorables (ya sea una célula resistente a la muerte inducida por un tratamiento y su potencial de regenerar el tumor o una célula que migró del sitio de origen y se encuentra en proceso de colonizar un nuevo ambiente) y su capacidad de proliferación..

Este ensayo se basa en el plaqueo de células en baja densidad (2000, 3000, 4000 o 4500 células para las SK-N-SH y 7000, 8000 o 10.000 células para las SH-SY5Y), de modo que las mismas queden aisladas y, así, asegurar que cada célula desarrolle una única colonia. Aproximadamente una semana después del plaqueo, las colonias fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta. Los resultados se cuantificaron por conteo directo de colonias o mediante la medición de la absorbancia de los cristales violeta resuspendidos (Guzman et al., 2014).

Las células fueron tratadas con VPA por 72 horas antes del plaqueo. Bajo distintas condiciones de número inicial de células y duración del tratamiento, se observó una marcada reducción en la capacidad clonogénica de las células tratadas con VPA, claramente visible en las imágenes obtenidas de los wells. En uno de los experimentos realizados con las células SK-N-SH donde el número de células plaqueadas fue de 3000 células, se realizó un conteo manual de colonias, definiendo como tales a aquellos grupos con 50 o más células, según se ha reportado en estudios similares de distintos autores. Como resultado se obtuvo un

Resultados

promedio de 18 colonias en la condición control, una cantidad notablemente baja para este tipo de análisis, mientras que no se observaron colonias en los wells tratados con VPA. La cuantificación manual se limitó a este experimento específico debido a las dificultades que presentó: la formación de colonias fue prácticamente nula en los wells tratados, lo cual impedía el conteo; además, al plaqueo de un mayor número de células, las colonias comenzaron a solaparse, dificultando la identificación individual de cada una. En algunos casos también resultaba difícil evaluar si las colonias contenían las 50 células necesarias para cumplir con el criterio de cuantificación, lo que afectó la precisión de los conteos. Por esta razón, se resuspendió el cristal violeta hasta retirar todo el colorante de las células, y se midió la absorbancia de este resuspendido como medida indirecta de la cantidad de colonias presentes en cada well (Guzman et al., 2014). Como resultado, se obtuvo que la absorbancia medida para el tratamiento con VPA era significativamente menor que el caso control, coincidiendo con el resultado de conteo manual (**figura 25**).

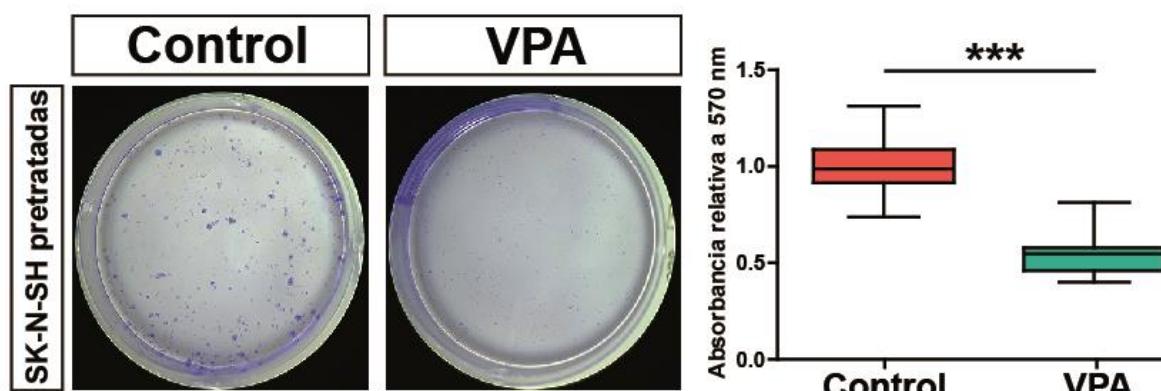


Figura 25. **Ensayo de formación de colonias en células SK-N-SH pre-tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas antes de ser plaqueadas.** A la izquierda, imágenes representativas de los wells teñidos con cristal violeta para el caso control y el tratado con VPA. A la derecha, la absorbancia relativa del resuspendido de cristal violeta para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre control y tratado (** $p<0.001$). n=4.

En el caso de la línea celular SH-SY5Y, se observó también una disminución en el número de colonias en las células tratadas con VPA en comparación con las células control (**figura 26**). Tampoco fue posible realizar un conteo manual de las colonias para estas células, debido a que los límites de las mismas no se encontraban definidos, solapándose unas con otras. Por esta razón, solamente se analizó la absorbancia del resuspendido de cristal violeta, obteniendo como resultado una menor absorción para las células tratadas con respecto a las control. De esta manera, en esta línea celular el tratamiento con VPA también reduce la capacidad clonogénica de las células tratadas con VPA con respecto al control.

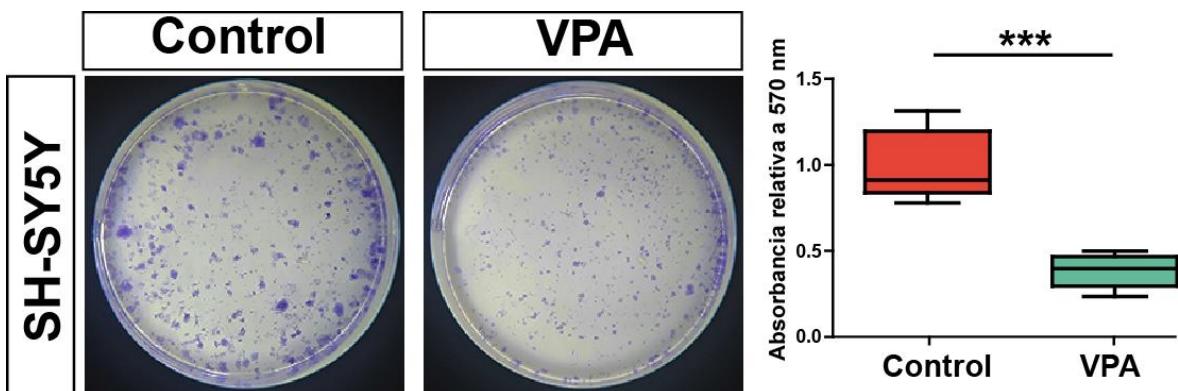


Figura 26. Ensayo de formación de colonias en células SH-SY5Y tratadas con VPA (2 mM) post-plaqueo. A la izquierda, imágenes representativas de los wells teñidos con cristal violeta para el caso control y el tratado con VPA. A la derecha, la absorbancia relativa del resuspendido de cristal violeta para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre control y tratado ($p<0.001^{***}$) n=3.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se demostró que el VPA disminuye la capacidad de las células de NB de formar colonias.

Tomando en conjunto los análisis realizados en las SK-N-SH (MTT, confluencia y clonogénico), que permiten analizar la capacidad proliferativa de estas células es factible afirmar que el tratamiento con VPA reduce la proliferación en dos dimensiones de las SK-N-SH. Asimismo, si bien es necesario a futuro realizar los ensayos de MTT y confluencia, se observa que la capacidad proliferativa de las SH-SY5Y también se ve afectada con el tratamiento, lo que sugiere que el efecto del VPA no es único para las SK-N-SH.

1.3.2 Proliferación en tres dimensiones

Los cultivos en dos dimensiones (2D), aunque ampliamente empleados en investigación, presentan limitaciones importantes para el estudio de procesos fundamentales en el cáncer, como la proliferación, invasión y respuesta a terapias. En 2D, las células crecen en una monocapa que no reproduce las interacciones complejas con otras células ni con la matriz extracelular, lo que resulta en condiciones artificiales que difieren significativamente del microambiente tumoral *in vivo*. Por ejemplo, la proliferación celular en cultivos 2D no refleja los gradientes fisiológicos de oxígeno, nutrientes y factores de señalización, limitando la precisión de los resultados.

En contraste, los modelos tridimensionales (3D), como los esferoides tumorales, ofrecen una representación más fiel del microambiente tumoral. Estos sistemas generan gradientes internos de oxígeno y nutrientes que replican la heterogeneidad funcional y estructural de los tumores sólidos, incluyendo zonas proliferativas, hipóxicas y necróticas. Esta arquitectura permite evaluar con mayor precisión las respuestas celulares a los tratamientos y comprender

Resultados

mejor los mecanismos que subyacen a la progresión tumoral, consolidando a los cultivos 3D como herramientas esenciales en la investigación oncológica preclínica (Arora et al., 2024). Con el objetivo de obtener una aproximación más representativa de un tumor real, se generaron esferoides de células SK-N-SH y SH-SY5Y, que permitieron evaluar el comportamiento proliferativo en un contexto de tres dimensiones.

Para este experimento, se generaron esferoides para las líneas celulares SK-N-SH y SH-SY5Y en placas de 96 wells de baja adherencia con medio completo suplementado con 20% de colágeno. Se utilizaron tanto células pre-tratadas con VPA durante 72 horas como células sin tratar que recibieron el tratamiento el día posterior a la formación de los esferoides. En ambas variantes experimentales y, para ambas líneas celulares, la proliferación celular fue evaluada mediante el análisis del área de los esferoides tras 3, 4 y 5 días de tratamiento.

Los resultados de este experimento dieron lugar a las siguientes observaciones:

1. Las células pre-tratadas fueron capaces de generar esferoides exitosamente. Lo que indica que el tratamiento con VPA no interfiere con la formación de los mismos y que los resultados no fueron influenciados por dificultades en la generación de los esferoides.
2. En todas las condiciones, se observaron diferencias en el color del medio de cultivo entre los tratamientos (**figuras 27, 28 y 29**). En los wells correspondientes a los esferoides control, el medio adquirió un tono amarillento más pronunciado, lo que sugiere un mayor consumo de nutrientes y mayor actividad metabólica. En contraste, el medio asociado a los esferoides tratados con VPA conservó un color rosado, lo que podría reflejar un menor consumo de nutrientes y, por lo tanto, una reducción en la actividad metabólica. Dado que en el ensayo de MTT se observaron diferencias en la actividad metabólica asociadas a la proliferación (**figura 22**) esta diferencia podría explicarse por una menor densidad celular (o una disminución en el metabolismo mitocondrial).
3. En todas las condiciones ensayadas se observó una disminución significativa en el área de los esferoides tratados con VPA en comparación con los control (**figuras 27, 28 y 29**), por lo que es posible afirmar que el VPA también es capaz de reducir la capacidad proliferativa de ambas líneas celulares en 3D.

Resultados

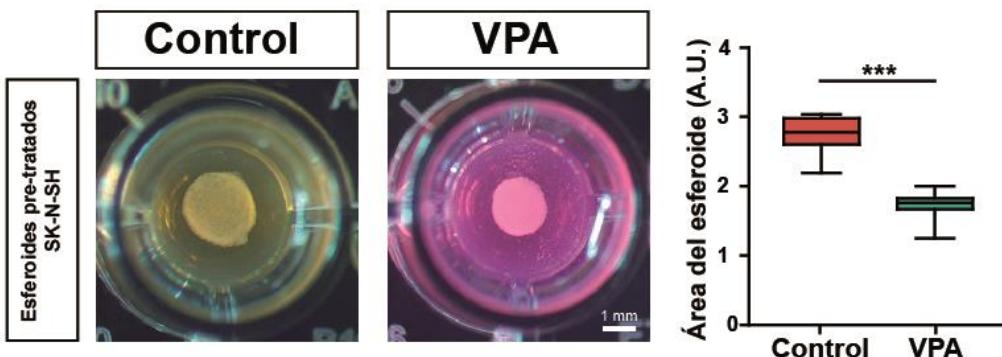


Figura 27. Esferoides de células SK-N-SH pretratadas con VPA (2 mM) durante 72 horas previas al plaqueo. A la izquierda, imágenes representativas de los esferoides a los 7 días post-plaqueo para el caso control y el tratado con VPA. A la derecha, área de los esferoides en unidades arbitrarias para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre control y tratado (**p<0.001). n=1 (18 esferoides control, 16 esferoides tratados con VPA).

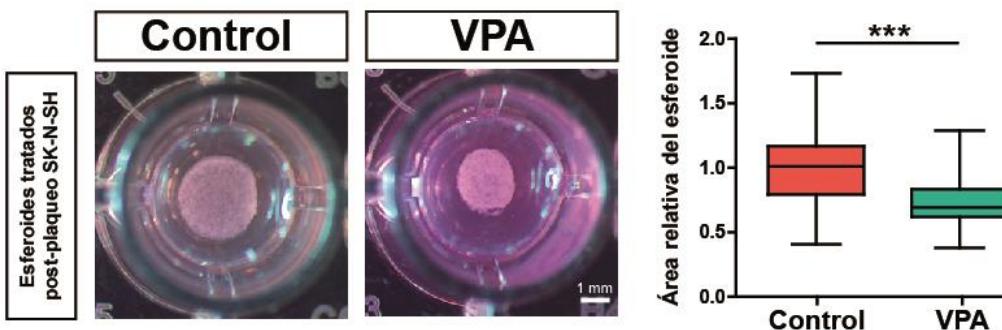


Figura 28. Esferoides de células SK-N-SH tratadas con VPA (2 mM) post-plaqueo. A la izquierda, imágenes representativas de los esferoides a las 72 horas de tratamiento con VPA o control. A la derecha, área relativa de los esferoides en unidades arbitrarias para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre control y tratado (**p<0.001). n=3 (entre 25 y 27 esferoides control, y entre 21 y 25 tratados).

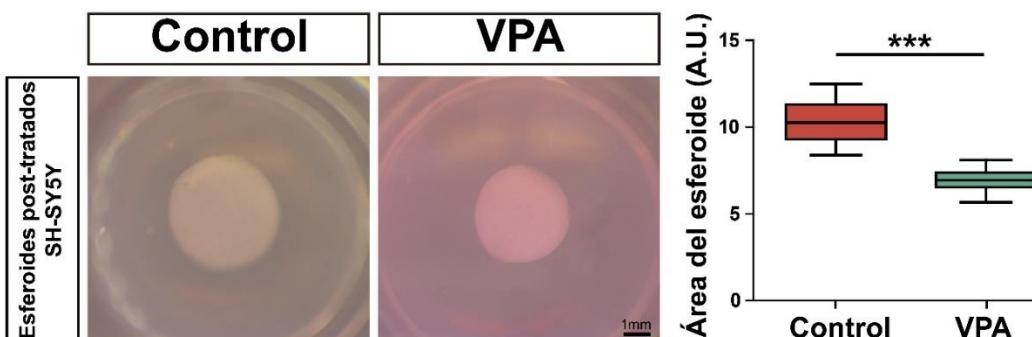


Figura 29. Esferoides de células SH-SY5Y tratadas con VPA (2 mM) post-plaqueo. A la izquierda, imágenes representativas de los esferoides a los 5 días de tratamiento con VPA o control. A la derecha, área de los esferoides en unidades arbitrarias para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre control y tratado (**p<0.001). n=1 (10 esferoides control, 10 tratados).

Este resultado es coherente con los resultados previos realizados en 2D, donde también se evidenció una reducción en la proliferación celular inducida por VPA. La evaluación en un modelo tridimensional es especialmente relevante ya que proporciona un contexto experimental más representativo de la arquitectura tumoral *in vivo*, lo que permite comprender mejor el efecto del tratamiento en condiciones que replican más fielmente la fisiología del tumor.

1.4 Migración

Tras analizar los efectos del VPA en la morfología, viabilidad y proliferación de las células de NB, se evaluó su potencial impacto en la migración celular. Esta desempeña un papel crucial en el proceso de metástasis, principal causa de muerte en pacientes oncológicos. Para ello, el estudio de estrategias terapéuticas capaces de inhibir o reducir la migración celular es de gran importancia para el desarrollo de terapias contra el cáncer. Una forma de analizar la capacidad migratoria de las células es realizando el ensayo de migración por *transwell*. Brevemente, este ensayo permite evaluar la capacidad de un grupo de células de migrar a través de una membrana porosa. Para esto se usa un inserto que genera dos compartimentos divididos por esta membrana: uno superior donde se colocan la suspensión de células, y uno inferior donde se coloca medio de cultivo con un quimioatractante, en este caso SFB, que va a estimular a las células a atravesar la membrana para dirigirse a este compartimiento. Para las células de NB, el ensayo se realizó utilizando insertos con una membrana con poros de 8 μm de diámetro que permiten el paso de estas células. Se colocaron 30000 células SK-N-SH en la parte superior de los insertos en condiciones control y tratadas con VPA durante 72 horas. Luego de 24 horas de incubación, las células que lograron atravesar la membrana y migrar hacia el compartimento inferior fueron fijadas con PFA 4% en PBS 1X, teñidas con DAPI y se cuantificó el número de núcleos a partir de fotos de campos aleatorios.

Los resultados muestran una disminución significativa en el número de células tratadas con VPA que atravesaron la membrana en comparación con las células control (**figura 30**). Esta reducción señala que el VPA es capaz de disminuir la capacidad migratoria de las células SK-N-SH, lo que podría sugerir una reducción en la capacidad metastásica de estas células.

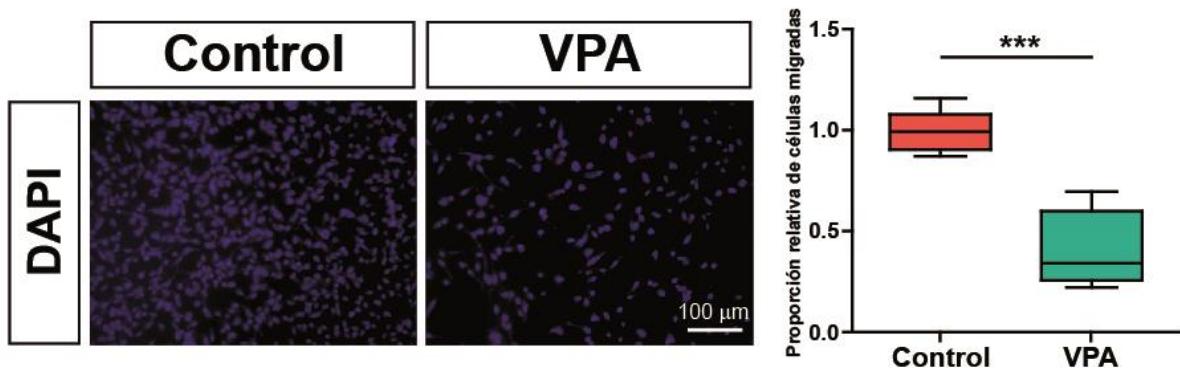


Figura 30. **Ensayo de transwell con células SK-N-SH tratadas con VPA (2 mM).** A la izquierda, imágenes representativas de la tinción con DAPI de los núcleos de las células control y tratadas con VPA que lograron atravesar la membrana. A la derecha, la proporción de células migradas para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* para identificar diferencias significativas entre control y tratado ($^{***}p<0.001$). n=2.

1.5 Mecanismo de acción

Una vez evaluado el impacto del VPA sobre la viabilidad, proliferación y migración celular de NB, se examinó la expresión de proteínas involucradas en los mecanismos moleculares que puedan explicar los cambios fenotípicos observados.

1.5.1 Transición epitelio-mesenquimal

Para determinar si el VPA tiene un efecto en la transición epitelio mesenquimal se evaluó la localización y la expresión de vimentina por inmunofluorescencia. Esta es una técnica que emplea anticuerpos para detectar proteínas específicas en células individuales. La visualización se logra mediante marcadores fluorescentes, lo que permite detectar tanto la localización como la expresión de estas proteínas.

La EMT es un proceso dinámico y reversible en el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal, lo que les permite invadir tejidos circundantes. Este fenómeno es fundamental en procesos fisiológicos, como la embriogénesis (EMT tipo I), pero también ocurre en condiciones patológicas, como la fibrosis (EMT tipo II) y la metástasis tumoral (EMT tipo III) (Usman et al., 2021).

Una proteína importante en el proceso de la EMT es la vimentina, un filamento intermedio de tipo III que participa en funciones clave del citoesqueleto, como el soporte estructural, la adhesión, la migración y la señalización celular. En condiciones normales, la vimentina se expresa predominantemente en células mesenquimales; sin embargo, durante la EMT tipo III, asociada a la metástasis tumoral, su expresión se encuentra notablemente aumentada. Lo que la convierte en un marcador distintivo de este proceso y en un objetivo importante para el estudio de los mecanismos que facilitan la invasión y progresión del cáncer (Usman et al., 2021).

Resultados

Para evaluar si los resultados observados anteriormente del efecto del VPA sobre la capacidad migratoria de las células están relacionados con un cambio en la expresión de esta proteína, se realizó una inmunofluorescencia contra la misma sobre células SK-N-SH en condiciones control o tratadas durante 72 horas con VPA.

Observando la expresión de vimentina en ambas condiciones, parece observarse que las células tratadas con VPA presentan un leve incremento de la señal (**figura 31**). Sin embargo, es importante mencionar que este experimento se realizó en una sola ocasión y el nivel de intensidad de la marca no fue cuantificado por lo que esta observación se basa únicamente en una apreciación visual de las imágenes obtenidas. Este aumento podría sugerir un efecto del tratamiento con VPA en los niveles de vimentina. Sin embargo, es necesario repetir este ensayo y realizar los análisis cuantitativos de intensidad para confirmar esta observación. Para ello, sería necesario el uso de un microscopio confocal en lugar de uno de epifluorescencia para caracterizar con mayor detalle los filamentos de vimentina y obtener imágenes que permitan realizar cuantificaciones de intensidad. Si aún de esta forma no se detectaran diferencias, también es posible analizar la expresión global de vimentina mediante *Western blot*, con el cual se podrían detectar cambios más sutiles a costa de perder el detalle a nivel celular.

Sin embargo, este cambio en los niveles de vimentina por sí solo no permite inferir un aumento en el potencial metastásico de las células tratadas. En la EMT participan otras proteínas de suma importancia que también será necesario evaluar, por ejemplo, la E-cadherina, que funciona como marcador del fenotipo epitelial.

Por otra parte, la EMT es solo una de las etapas de la cascada metastásica. En adición a este proceso, la capacidad de migración es un factor fundamental, y los resultados obtenidos a partir del ensayo de migración por *transwell* mostraron que el VPA disminuye la capacidad migratoria de las células. Esto sugiere que, aunque la vimentina pueda presentar un leve aumento, el tratamiento con VPA sigue limitando la capacidad de migración de las células, lo cual podría contrarrestar un efecto de la EMT sobre el potencial metastásico. Por lo tanto, los resultados deben interpretarse con cautela y en el contexto de otros factores relevantes para el proceso metastásico.

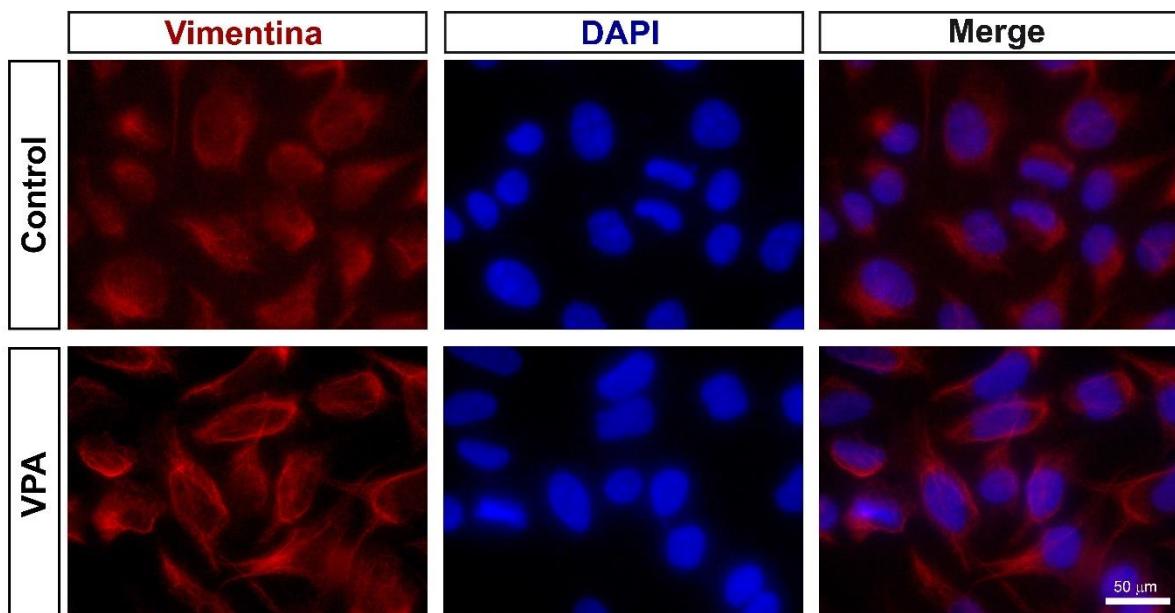


Figura 31. Inmunofluorescencia para vimentina en las células SK-N-SH control y tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas. Arriba, células control. Abajo, células tratadas con VPA por 72 horas. De izquierda a derecha, expresión de vimentina, marcación de los núcleos con DAPI y el merge de los canales. n=1.

1.5.2 Downregulación de ASCL1

Como se mencionó previamente en la introducción, ASCL1 es un factor de transcripción proneural esencial para el desarrollo del linaje simpatoadrenal, del cual surge el NB. Su expresión es embrionaria y transitoria, restringida a estadios progenitores intermedios y su silenciamiento es necesario para permitir el desarrollo terminal de este linaje (Wang et al., 2019). En NB se observó que ASCL1 permanece activo y que los tumores con alta expresión de este factor se asocia con un pronóstico desfavorable y un bajo grado de diferenciación celular (Kocak et al., 2013).

Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que el silenciamiento de ASCL1 en las células SK-N-SH tuvo como consecuencia cambios morfológicos. Las células con niveles reducidos de ASCL1 presentan un fenotipo más alargado y una mayor proporción de células con proyecciones en comparación con las células control. Este cambio morfológico sugiere una posible progresión hacia una mayor diferenciación neuronal, acompañada de una disminución en las capacidades proliferativas y migratorias de las células (Garde, 2022). Estos hallazgos coinciden con la hipótesis de que la reducción de ASCL1 podría contribuir a una menor agresividad tumoral.

Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con VPA en la misma línea celular induce la diferenciación celular. Adicionalmente, durante el desarrollo embrionario en pez cebra, se observó que el VPA es capaz de reducir la expresión de *asc/l* en progenitores neurales

(Jacob et al., 2014). Esto plantea la hipótesis de que los efectos del VPA en NB podrían explicarse, al menos en parte, por su capacidad para disminuir la expresión de ASCL1.

Para evaluar esta posibilidad, con el objetivo de explorar si los efectos del VPA observados son consecuencia de la *downregulación* de ASCL1, se determinaron los niveles de este factor mediante técnicas de inmunofluorescencia y *Western blot*.

1.5.2.1 Medición de ASCL1 por inmunofluorescencia

Para evaluar la expresión de ASCL1 se realizaron inmunofluorescencias usando un anticuerpo contra el mismo sobre células control o tratadas previamente durante 72 horas con VPA (**figura 32**). Tal como se observa en la figura, no se detecta un cambio en la expresión de ASCL1 entre ambas condiciones, si bien este ensayo está repetido dos veces solo se tomaron fotos en una ocasión y no se realizó una cuantificación de intensidades de las mismas.

De manera preliminar estos resultados sugieren que el tratamiento con VPA 2 mM por 72 horas no afecta la expresión de ASCL1, o que el efecto, si existe, es de una magnitud que no puede detectarse con el uso de este anticuerpo para esta técnica. De todos modos, es necesario repetir el experimento.

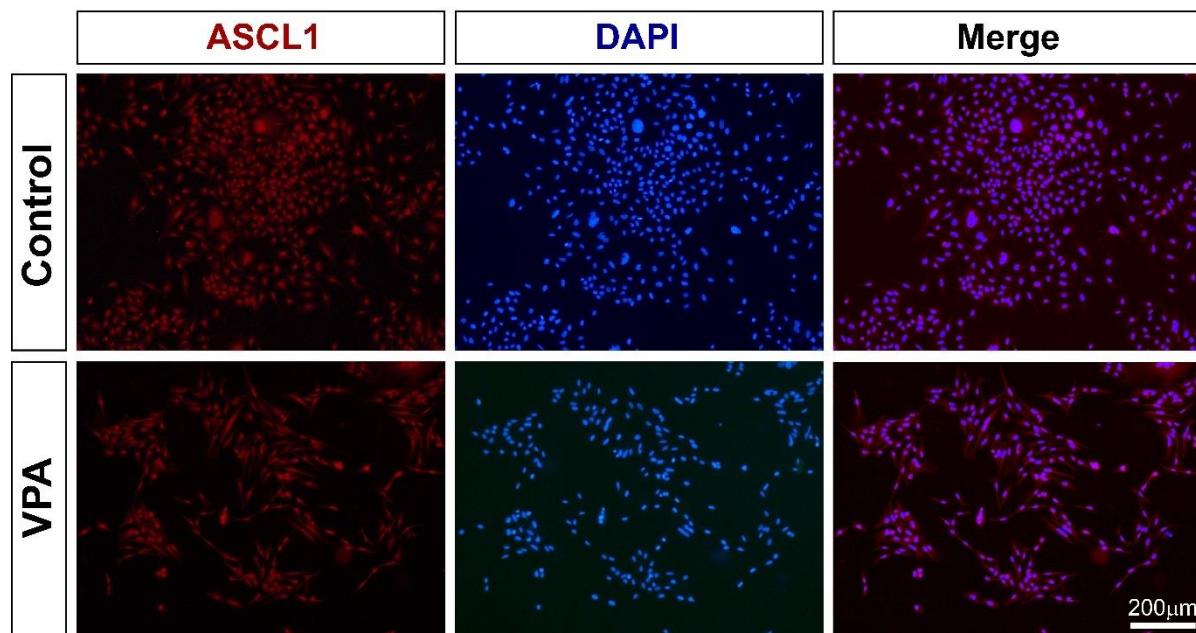


Figura 32. Inmunofluorescencia de ASCL1 en células SK-N-SH control y tratadas con VPA (2 mM) por 72 horas. Arriba, células control. Abajo, células tratadas con VPA por 72 horas. De izquierda a derecha, expresión de ASCL1, marcación de los núcleos con DAPI y el merge de los canales. n=2.

1.5.2.2 Medición de ASCL1 por *Western blot*

Con el objetivo de evaluar con mayor sensibilidad los cambios en los niveles de ASCL1, se realizó un *Western blot* a partir de lisados de células control y tratadas con VPA durante 72 horas.

La detección se realizó empleando un anticuerpo anti-ASCL1 y un anticuerpo α -actina como control de carga. Posteriormente, se cuantificaron los niveles proteicos mediante la medición de la intensidad de las bandas y se calculó el cociente de intensidades entre ASCL1 y el control de carga (**figura 33**). Los resultados obtenidos evidencian una disminución significativa en la expresión de ASCL1 en células tratadas con VPA.

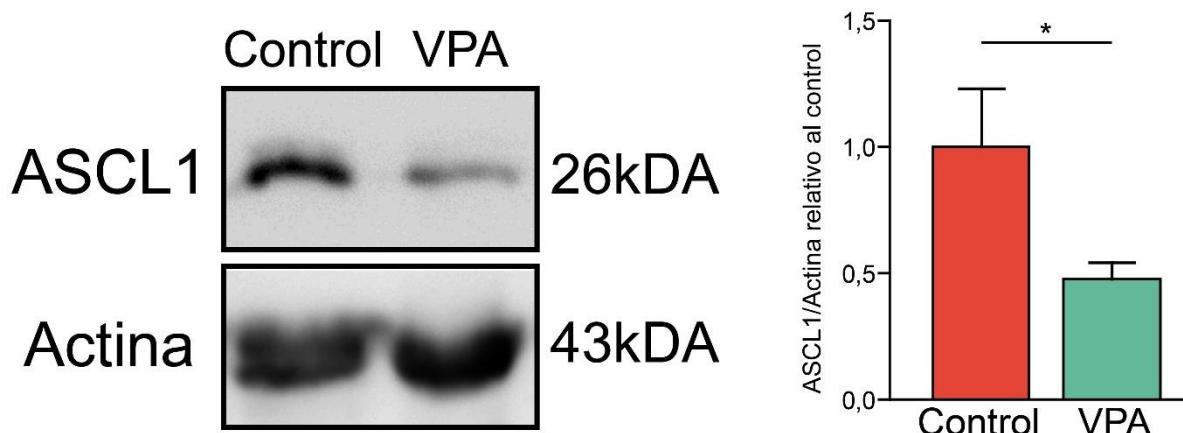


Figura 33. Niveles de ASCL1 para células control y tratadas con VPA (2 mM). A la izquierda imágenes del *Western blot* revelando la proteína presente en lisados celulares de cada grupo experimental. A la derecha, cuantificación del *Western blot* representado por el cociente entre los niveles de ASCL1 y la actina relativo al control. n=3.

Los resultados del *Western blot* a diferencia de los de la IF, permiten confirmar la hipótesis de que el tratamiento con VPA disminuye la expresión de ASCL1. Esta discrepancia podría atribuirse a la sensibilidad del anticuerpo en la IF, donde se pueden ver los cambios a nivel celular. Es posible que la magnitud de la disminución de ASCL1 para cada célula no sea detectable con esta técnica, pero que al analizar por *Western blot* los cambios a nivel poblacional estos puedan detectarse.

De este modo, se puede proponer que el efecto del VPA en NB está al menos parcialmente asociado a la expresión de ASCL1. Sin embargo, para confirmar este mecanismo de acción será necesario poner a prueba si con la sobreexpresión de ASCL1 en células tratadas con VPA es posible recuperar el fenotipo control.

1.6 Implante de esferoides en la CAM

Una vez completados los ensayos *in vitro*, se procedió a realizar una primera aproximación a experimentos *in vivo* para evaluar el comportamiento de las células SK-N-SH en condiciones control y tratadas con VPA, en un entorno más similar al fisiológico. Para esto, se utilizaron esferoides de 100.000 células que fueron tratados con VPA o control durante 4 días después de su plaqueo, antes de ser implantados en la CAM de embriones de pollo a ED9.

A los 10 días post-implante (ED19), se tomaron fotos de los esferoides en la CAM con el fin de medir sus áreas y evaluar el impacto del tratamiento con VPA. A pesar de que los esferoides tratados con VPA eran significativamente más pequeños antes de la implantación., los resultados no mostraron diferencias significativas en sus áreas tras ser implantados (**figura 34**).

Esto puede deberse a varios factores. En primer lugar, es importante considerar que, tras el implante, los esferoides no recibieron ningún tratamiento adicional hasta la finalización del ensayo. Esto podría haber permitido que las células tratadas con VPA sufrieran una reversión fenotípica y recuperaran el comportamiento de las células no tratadas, lo que a su vez podría haber llevado a una mayor tasa de proliferación (situación que no se evaluó *in vitro*). Una posible explicación es que, aunque las áreas de los esferoides control y tratados parecen similares en las imágenes, los esferoides control podrían ser más grandes, ya que parte de su estructura podría haber infiltrado la CAM, lo que dificulta apreciar correctamente su tamaño en tres dimensiones. Esta posibilidad de mayor infiltración de los esferoides control se alinea con los resultados obtenidos en los experimentos de migración previos, donde se demostró que las células no tratadas mostraban una mayor tasa migratoria.

Por lo tanto, aunque los resultados no mostraron diferencias evidentes en las áreas de los esferoides implantados, los datos no fueron concluyentes. Para estudiar con mayor detalle el grado de implante de los esferoides en la CAM, se extrajeron de los embriones para poder estudiarlos.

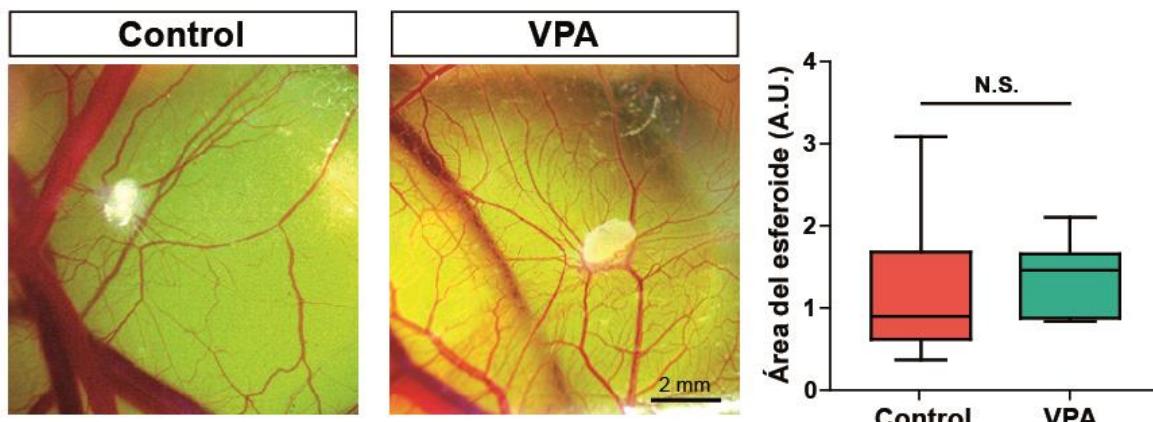


Figura 34. **Implantes de esferoides con células SK-N-SH control y tratados con VPA (2 mM).** A la izquierda, fotos representativas de los esferoides control y tratados con VPA implantados en la CAM (ED19). A la derecha, área de los esferoides en unidades arbitrarias para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre control y tratado. N.S. = no significativo. n=1 (6 esferoides control, 7 tratados).

Para investigar la posible infiltración de los esferoides control en la CAM, se procedió a extraer los implantes de los embriones junto con una porción de la CAM circundante. Este material fue posteriormente fijado, congelado y cortado con un crióstato y los cortes de los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina (**figura 35**). Mientras que para el grupo tratado pudo obtenerse un corte y tinción en donde se puede ver el esferoide completo sobre la CAM, para el grupo control parte del esferoide se perdió con la tinción. Sin embargo, puede apreciarse que para el control el esferoide se encuentra invadiendo la CAM, mientras que para el VPA no. Estos resultados coincidirían con la hipótesis de que la razón por la cual el área de los esferoides control con imágenes tomadas desde la superficie es menor en los esferoides control que en los tratados es porque parte del esferoide se encuentra invadiendo la CAM.

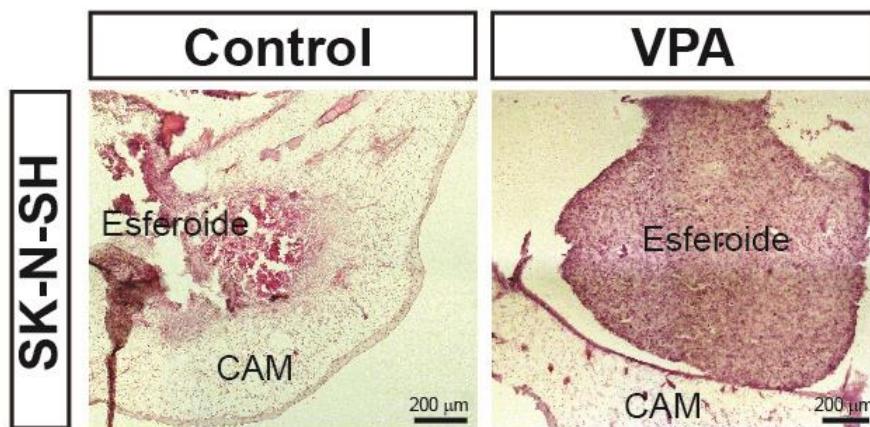


Figura 35. Tinción con hematoxilina y eosina de esferoide tratado con VPA (2 mM) implantado en la CAM. n=1.

Resultados

Por una cuestión de tiempos compatibles con el desarrollo de la tesis no fue posible repetir este ensayo para obtener mejores cortes y tinciones de implantes de esferoides.

En futuros estudios se realizarán análisis adicionales, como inmunotinciones en los cortes para detectar distintas proteínas y profundizar la comprensión de los mecanismos involucrados. Deberían también repetirse implantes en embriones de pollo para poder obtener cortes de esferoides control y evaluar la teoría de una mayor infiltración en la CAM. Sin embargo, se logró implantar adecuadamente los esferoides formados, lo cual permitirá realizar ensayos con VPA a futuro, como distintos tipos de tinciones e inmunohistoquímica y ver marcadores de proliferación, apoptosis, entre otros.

1.7 Tratamiento combinado de VPA + ATRA

El tratamiento con AR en células de NB suele producir cambios morfológicos distintivos típicos de las neuronas diferenciadas, incluyendo un aumento en el largo de las neuritas y generación de ramificaciones. Esta alteración es el resultado de cambios transcripcionales que promueven la expresión de un conjunto de genes promotores de la diferenciación celular (Duffy et al., 2017). A pesar de los beneficios clínicos de la terapia con retinoides, este tratamiento ha resultado poco eficaz en muchos pacientes de alto riesgo debido a la resistencia inducida por *MYCN* (Reynolds et al., 2003). Por ello, resulta fundamental entender los mecanismos de resistencia al AR y desarrollar estrategias o facilitadores que aumenten la eficacia de este tratamiento.

La sinergia entre retinoides e inhibidores de HDACs, previamente reportada en leucemias (Lubbert et al., 2020), también se observó en NB. Por ejemplo: la combinación de ATRA con los inhibidores de HDAC, TSA, butirato sódico o vorinostat también demostraron un efecto sinérgico al inhibir el crecimiento de líneas celulares de NB (De los Santos et al., 2007). Además, la inhibición selectiva de HDAC8 junto con el tratamiento con ATRA provoca el alargamiento de las neuritas tanto en células BE(2)-C como en la línea IMR-32, resistente al tratamiento con retinoides. Este tratamiento también redujo el volumen tumoral de xenoinjertos en ratones, acompañada de un aumento en la expresión de un marcador de diferenciación, como NTRK1, y una disminución de la expresión de *MYCN* (Phimmachanh et al., 2020).

A partir de estas observaciones, surgió la hipótesis de que la combinación de VPA con ATRA podría ofrecer los mismos beneficios en las células de NB, con la capacidad de favorecer aún más tanto la diferenciación celular como la disminución de la agresividad tumoral en comparación con el tratamiento por separado con cada agente.

1.7.1 Morfología

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento combinado de VPA con ATRA se plaquearon células SH-SY5Y en placas de 6 wells y, al día siguiente, se reemplazó el medio de cultivo por medio completo suplementado con: 1. DMSO 0.003% (control), 2. ATRA 10 μ M, dosis elegida en base a la bibliografía preexistente, la cual recomienda tratar con ATRA entre 5 y 10 μ M (Reynolds and Lemons, 2001; Zimmerman et al., 2021), 3. VPA 2 mM o 4. la combinación VPA+ATRA. Posteriormente, se tomaron fotos a los 3 y 5 días de tratamiento (**figura 36**). Al tercer día ya se puede observar que todos los tratamientos son capaces de inducir un cambio en la morfología celular con respecto al control. El cambio máximo se obtuvo al quinto día de tratamiento, a partir del cual ya no se observaron diferencias en el largo de las células. En base a las imágenes obtenidas, se puede proponer que el tratamiento combinado es más efectivo que los tratamientos por separado a los 5 días de tratamiento, lo que apoya la hipótesis presentada anteriormente. Sin embargo, es necesario cuantificar el largo de las células para estimar el efecto morfológico de los tratamientos. Para esto se realizó una cuantificación del mismo en células elegidas aleatoriamente para cada tratamiento. Los resultados se presentan en el gráfico a la derecha en la figura 31 e indican que:

1. Todos los tratamientos aumentan el largo de las células.
2. El efecto del ATRA es menor al del tratamiento combinado, pero no difiere del tratamiento con VPA.
3. El efecto del tratamiento combinado no difiere significativamente del tratamiento con VPA.

Las observaciones 1 y 2 coinciden con lo comentado anteriormente, sin embargo, el hecho de que el tratamiento combinado no presente diferencias con el del VPA cuestiona nuestra hipótesis. No obstante, es necesario tener en cuenta que esta cuantificación es preliminar y de unas pocas células a partir de fotos de campo claro, donde la estructura de estas células no siempre se distingue claramente. Es necesario repetir este ensayo de modo tal que obtener un mayor número de células aisladas y mejor calidad de imágenes, ya sea utilizando un mayor aumento u otro tipo de microscopía como la de contraste de fase, que permita detectar mejor los límites de las células. Adicionalmente, se podrían observar mejor las neuritas realizando una IF contra BIII-tubulina, práctica habitual en células de NB para medir su largo. Considerando la tendencia de los resultados, al optimizar la medición y analizar una mayor cantidad de células es probable que la longitud celular del tratamiento combinado sea significativamente mayor al del VPA.

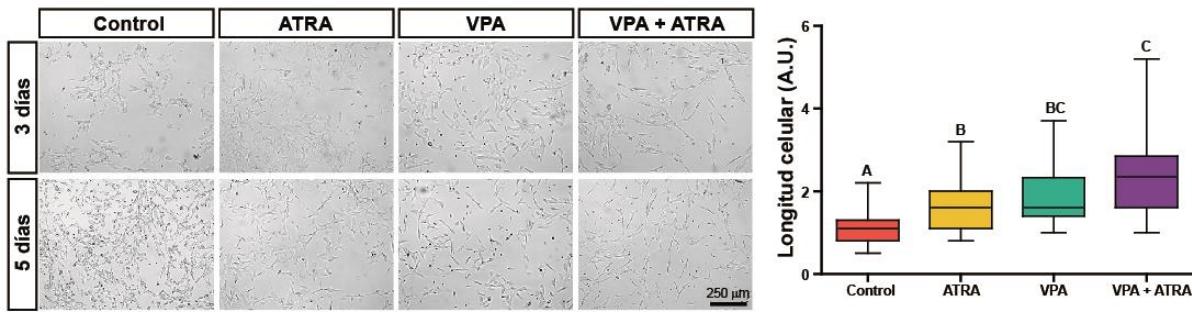


Figura 36. Morfología de las células SH-SY5Y control (DMSO) y tratadas con ATRA (10 μM), VPA (2 mM) o VPA+ATRA. A la izquierda, imágenes representativas de células SH-SY5Y sin tratamiento y tratadas con ATRA 10 μM y/o VPA 2 mM luego de 3 y 5 días de tratamiento. A la derecha, cuantificación de la longitud de células aleatorias para cada grupo experimental a los 5 días de tratamiento, expresada en unidades arbitrarias ± DE. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones de Dunn para comparar los resultados. Los grupos con la misma letra no difieren significativamente entre sí. n=1.

1.7.2 Proliferación en tres dimensiones

Por los mismos motivos desarrollados en el apartado 1.3.2 de esta sección, se generaron esferoides de células SH-SY5Y a partir de 400.000 o 600.000 células para estudiar su comportamiento proliferativo en 3D. Los mismos fueron tratados al día siguiente de su formación con DMSO 0.003% (control), ATRA 10 μM, VPA 2 mM o la combinación VPA+ATRA.

Se tomaron imágenes de los esferoides tras cinco días de tratamiento y se midió el área de cada uno de ellos utilizando el software ImageJ (**figura 37**). Los resultados obtenidos indican que:

1. Todos los tratamientos presentan esferoides con áreas significativamente menores que la condición control.
2. El área de los esferoides tratados con ATRA es mayor a la de los esferoides con el tratamiento combinado, pero no presentó diferencias respecto a los esferoides tratados con VPA
3. El área de los esferoides tratados con la combinación ATRA+VPA no presentó diferencias significativas respecto a los tratados con VPA.

Estos resultados coinciden con lo observado en el largo que las neuritas, en donde el tratamiento combinado mostró mayor efecto que el tratamiento con ATRA, pero no difirió estadísticamente del tratamiento con VPA.

Sin embargo, este experimento requiere de ciertas consideraciones:

- En un primer experimento en el que los esferoides se generaron con 400.000 células no se detectaron diferencias significativas en el área de los esferoides entre los tratamientos, aunque se observaron tendencias. Era posible que la cuantificación del área no fuera lo

Resultados

suficientemente potente para detectar las diferencias de tamaño, por lo que se aumentó el tamaño de los esferoides esperando poder ver así las diferencias entre tratamientos, que finalmente se observaron entre ATRA y VPA+ATRA.

- Analizar el tamaño de los esferoides a través de su área también presenta limitaciones. Si bien se aproxima a que el área representa su tamaño, es posible que haya diferencias estructurales que se pierdan con este enfoque. Por lo que es necesario complementar este análisis con la evaluación de otros parámetros, como por ejemplo el peso. Para esto se pesaron 10 esferoides secos por tratamiento en una balanza de precisión para cada tratamiento y el control. Los resultados preliminares mostraron que los esferoides control pesan más que los tratados, y que los tratados con VPA+ATRA pesan menos que los demás. Sin embargo, esta es una forma muy poco precisa de medir este parámetro y debe optimizarse para obtener resultados confiables.

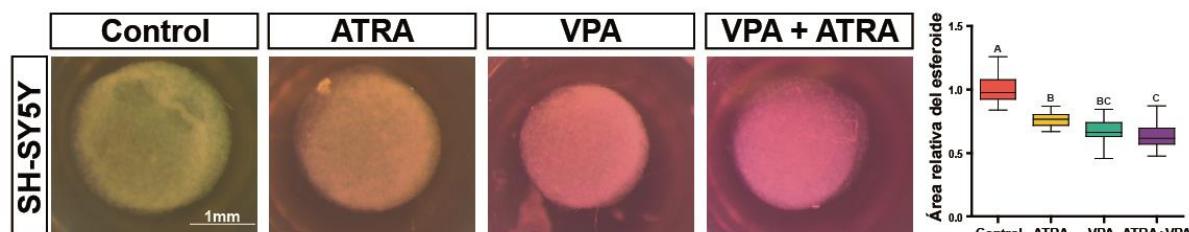


Figura 37. Esferoides de células SH-SY5Y tratados con ATRA (10 μ M), VPA (2 mM) o VPA+ATRA post-plaqueo. A la izquierda, imágenes representativas de los esferoides a los 5 días de tratamiento con ATRA (10 μ M), VPA (2 mM), ATRA+VPA o control (DMSO). A la derecha, área de los esferoides en unidades arbitrarias para cada condición \pm DE. Para comparar se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Los grupos con la misma letra no difieren significativamente entre sí y difieren de los que tienen otra letra. n=2 (10 esferoides control, 10 ATRA, 10 VPA y 10 VPA+ATRA).

De este modo, considerando tanto el largo de las neuritas como el tamaño de los esferoides, no se puede afirmar que el tratamiento combinado sea más exitoso que el tratamiento con VPA, a pesar de que se observe una tendencia. Por ello, es necesario repetir los experimentos, optimizar condiciones de análisis y evaluar otros parámetros tumorales para responder con mayor precisión la hipótesis planteada.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección sugieren que el VPA, un fármaco aprobado por la FDA para otras patologías, es una opción prometedora para ser reposicionado como tratamiento para el NB. Al reducir tanto la proliferación como la migración de las células tumorales de NB y promover su diferenciación, la combinación de los tratamientos actuales junto con VPA podría ofrecer una nueva estrategia terapéutica para mejorar el pronóstico clínico de esta enfermedad. Aunque se requieren más estudios para

Resultados

analizar su efecto con el ATRA, los resultados preliminares sugieren que la combinación de VPA y ATRA es más eficaz que el tratamiento con AR de manera individual, pero no supera la eficacia del VPA por sí solo.

Cáncer de páncreas y fluoxetina

2. Cáncer de páncreas y FLX

2.1 Respuesta de las células PANC-1 al tratamiento con FLX

Con el objetivo de evaluar los efectos de la FLX sobre las células PANC-1, se llevó a cabo un tratamiento con FLX 10 μM . La concentración elegida corresponde a la utilizada por distintos investigadores para evaluar el efecto de la FLX u otros antidepresivos en distintas líneas celulares (Budzinski et al., 2022; Gassen et al., 2014; Zschocke et al., 2011). Para el experimento se plaquearon 5000 células PANC-1 por well en una placa de 96 wells. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con DMEM completo suplementado con FLX 10 μM o el volumen de DMSO correspondiente (control). Se tomaron fotos de las células control y tratadas a los 3 y 5 días de tratamiento (**figura 38**).

Como resultado se observó que los wells tratados presentaban menos células adheridas a la placa y una mayor presencia de células redondeadas que en los wells control. Este resultado preliminar indica que la FLX podría disminuir la tasa de proliferación y/o la viabilidad de la línea celular PANC-1.

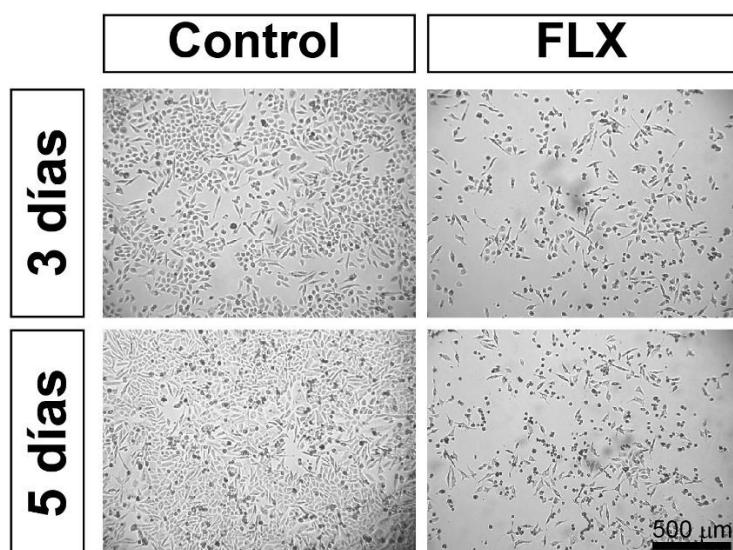


Figura 38. Morfología de las células PANC-1 control y tratadas con FLX (10 μM). Imágenes representativas de células PANC-1 sin tratamiento y tratadas con FLX (10 μM) luego de 3 y 5 días de tratamiento.

2.2 Proliferación

2.2.1 Proliferación en dos dimensiones

Para analizar si la FLX tiene efectos sobre la proliferación celular, se evaluó la capacidad clonogénica de las células PANC-1 mediante un ensayo de formación de colonias en dos dimensiones. Las células fueron tratadas con FLX durante 5 días antes del plaqueo y 8 días

Resultados

Luego del mismo las colonias fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta (**figura 39**).

Se observó una reducción en la capacidad clonogénica de las células tratadas con FLX respecto al control, claramente visible en las imágenes obtenidas de los wells.

Los resultados obtenidos indican que la FLX disminuye la capacidad de las células de PDAC de formar colonias, por lo que el tratamiento podría afectar la capacidad proliferativa de las células.

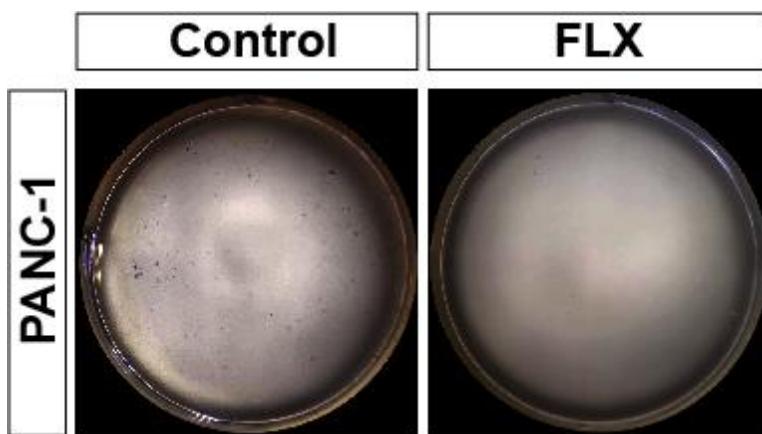


Figura 39. **Ensayo de formación de colonias en células PANC-1 control y tratadas con FLX (10 μ M).** Imágenes representativas de las colonias teñidas con cristal violeta para las células control y tratadas con FLX (10 μ M) después de 8 días. n=4.

2.3 Proliferación en tres dimensiones

Con el objetivo de evaluar el efecto de la FLX en la proliferación de las células PANC-1 en tres dimensiones, desarrollado en el apartado 1.3.2 de esta sección, se formaron esferoides de 100.000 células y se reemplazó el medio de cultivo al día siguiente por DMSO (control) o FLX 10 μ M. A los 7 días de tratamiento se tomaron fotos de los esferoides y se midieron sus áreas para llevar a cabo un análisis comparativo (**figura 40**).

Como resultado no se observaron diferencias significativas entre los esferoides control y los tratados, por lo que parecería que los efectos en la proliferación que se ven en dos dimensiones no se replican en un modelo 3D. Este tipo de contradicción entre resultados en 2D y 3D puede suceder. Sin embargo, entre experimentos similares empezamos a notar que la magnitud de los efectos del tratamiento con FLX 10 μ M con respecto a la viabilidad y la proliferación celular no eran reproducibles. Si bien la dosis de 10 μ M fue elegida inicialmente basándonos en resultados de otros laboratorios en donde se observó que el tratamiento con FLX 10 μ M durante 72 horas disminuye significativamente la tasa de proliferación y la viabilidad de la línea tumoral humana de glioblastoma U87 (Gobbini, 2023), consideramos que antes de proseguir era necesario establecer nuevamente la dosis mínima que tuviera

Resultados

efectos significativos de manera reproducible. Por este motivo, se realizó una curva de concentración de FLX que se describe en la sección siguiente.

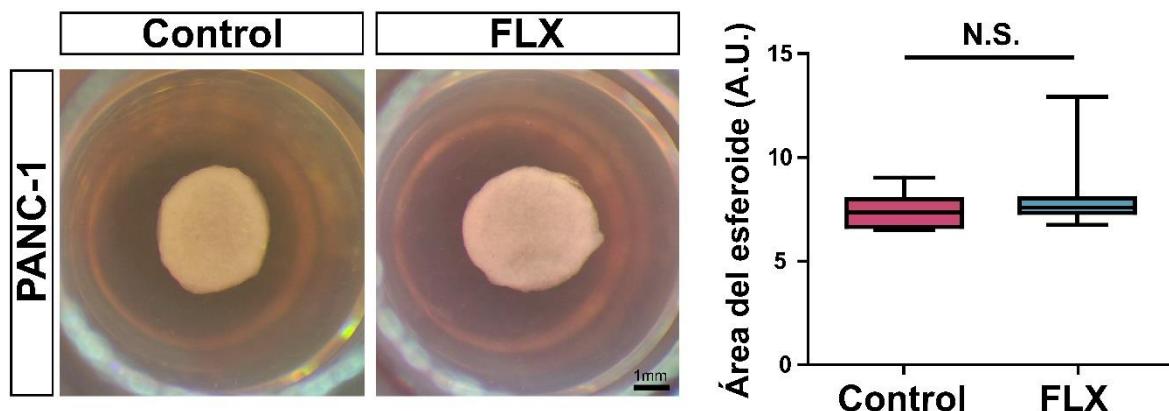


Figura 40. **Esferoides de células PANC-1 control y tratadas con FLX (10 μ M) post-plaqueo.** A la izquierda, imágenes representativas de los esferoides a los 7 días de tratamiento con FLX (10 μ M) o control (DMSO). A la derecha, área de los esferoides en unidades arbitrarias (U.A) para cada condición \pm DE. Se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* para identificar diferencias significativas entre control y tratado. N.S. = no significativo. n=1 (9 esferoides control, 9 tratados).

2.4 Curva de concentración de FLX

Debido a inconsistencias con los resultados de los experimentos con FLX 10 μ M, se realizó una curva de concentraciones de FLX y un posterior ensayo de MTT. Para esto se plaquearon 3000 células PANC-1 que fueron tratadas por 72 horas con DMSO (control) o FLX 10, 15 o 20 μ M. Se tomaron fotos de cada grupo experimental y luego se llevó a cabo un ensayo de MTT para ver el efecto de las distintas concentraciones de la droga en la viabilidad y proliferación celular (**figura 41**).

Los resultados mostraron que la concentración de FLX que presentó valores de absorbancia a 570 nm significativamente diferentes respecto al control fue la de 20 μ M. Por esta razón, a futuro se deberán repetir los ensayos clonogénicos y de formación de esferoides con la concentración de FLX 20 μ M, para verificar si la incongruencia entre los resultados en 2D y 3D pueden explicarse por un tema de concentración o si efectivamente el efecto de FLX depende de en qué situación se encuentran las células.

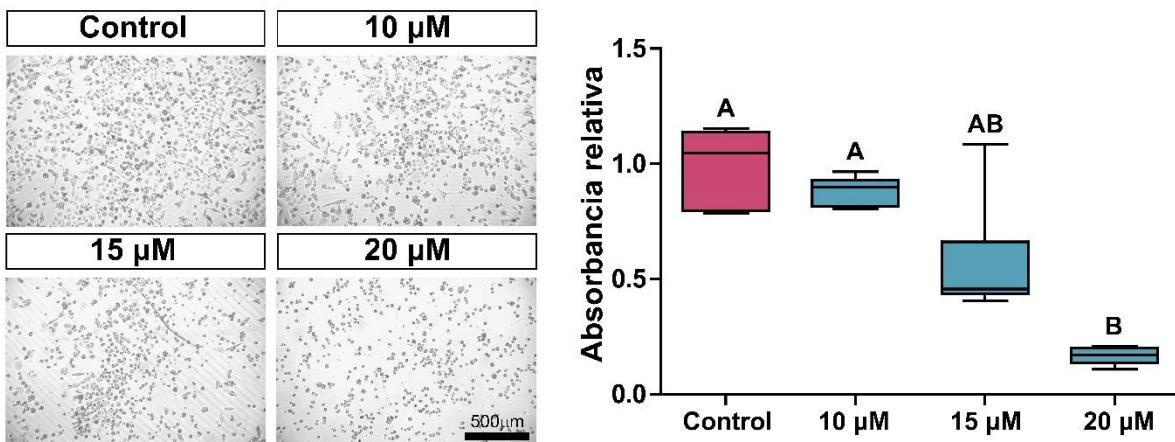


Figura 41. **Curva de concentración de FLX.** A la izquierda imágenes representativas de células PANC-1 para las distintas concentraciones probadas de FLX (10 μM , 15 μM y 20 μM) luego de 72 horas de tratamiento. A la derecha análisis de actividad metabólica celular por MTT de las mismas células. Los resultados se expresan como la proporción de células viables \pm DE. Para comparar se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Los grupos con la misma letra no difieren significativamente entre sí y difieren de los que tienen otra letra. n=2.

2.5 Autofagia

Una vez establecida la nueva concentración para los tratamientos y con el objetivo de entender el mecanismo detrás de los cambios observados de las células tratadas con FLX y los antecedentes mencionados en la introducción sobre el rol de esta droga en la autofagia, se llevó a cabo un experimento utilizando inhibidores del flujo autofágico: cloroquina (CQ) y cloruro de amonio (CINH_4), con los cuales se acumula el intermediario autofágico LC3-II.

Se plaquearon 200.000 células por well en una placa de 6 wells y a las 72 horas se reemplazó su medio por uno de seis tratamientos: 1. DMSO (control), 2. FLX 20 μM , 3. CQ 100 μM , 4. FLX 20 μM + CQ 100 μM , 5. CINH_4 20 mM, o 6. FLX 20 μM + CINH_4 20 mM. Luego de 4 horas de tratamiento, se extrajeron y lisaron las células para luego hacer un *Western blot* revelando en cada grupo experimental los niveles de LC3-II. Se tomaron imágenes del *Western blot* y se realizaron cuantificaciones de los niveles proteicos para cada tratamiento de manera tal de calcular un cociente LC3-II/GAPDH (control de carga) en cada caso (**figura 42**).

Como se esperaba, tanto en el tratamiento con CQ como con CINH_4 se observó un aumento en los niveles de LC3-II con respecto al control, debido a la acumulación de este intermediario en la interrupción del flujo autofágico. Como resultado del tratamiento con FLX se vio una disminución en los niveles de esta proteína con respecto al control, y en las combinaciones con los inhibidores esta diferencia es aún más pronunciada. Esto indicaría una disminución de la autofagia bajo el tratamiento con FLX 20 μM que se detecta con mayor sensibilidad cuando se la combina con CQ o CINH_4 .

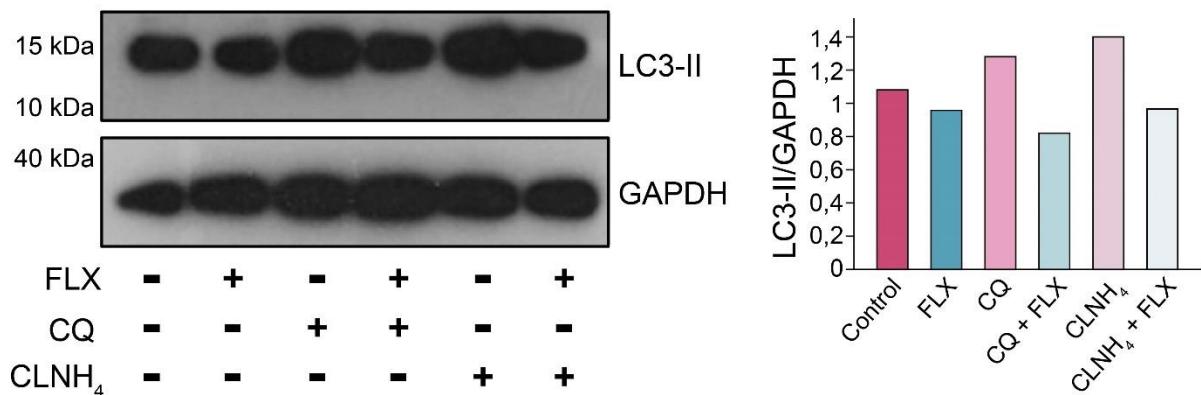


Figura 42. Niveles de LC3-II para células control y tratadas con FLX y/o CQ o CLNH₄. A la izquierda imágenes del *Western blot* revelando la proteína LC3-II presente en lisados celulares de cada grupo experimental junto con el contenido de GAPDH como control de carga. A la derecha, cuantificación del *Western blot* representado por el cociente entre los niveles de LC3-II y GAPDH relativo al control. n=1.

En resumen, los resultados obtenidos sobre efecto de FLX en células PDAC indican que este compuesto reduce la viabilidad y la capacidad clonogénica en dos dimensiones. Sin embargo, a futuro deberán repetirse los experimentos en tres dimensiones utilizando concentraciones más altas para evaluar si también se observa una disminución de la proliferación en experimentos en 3D. Adicionalmente, se observó que la FLX inhibe la autofagia sugiriendo un posible mecanismo de acción. Sin embargo, se requerirán experimentos adicionales que incluyan el uso combinado de FLX con otros inhibidores específicos para demostrar si los efectos de FLX están mediados por la inhibición de la autofagia.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión y conclusiones

1. Neuroblastoma y VPA

Se ha demostrado que el VPA reduce la capacidad proliferativa y promueve la diferenciación en diversos tipos tumorales. En glioblastoma, por ejemplo, se ha observado que el VPA sensibiliza diferentes líneas celulares a los efectos citotóxicos del etopósido, un agente quimioterapéutico (Das et al., 2007). Además, en este tipo tumoral, el VPA disminuye la densidad de los vasos sanguíneos y el crecimiento tumoral *in vivo*, tanto al administrarse solo como en combinación con CPT-11, otro agente quimioterapéutico (Osuka et al., 2012).

En cáncer de tiroides, se ha demostrado que el VPA induce re-diferenciación y apoptosis en células poco diferenciadas, además de aumentar la eficacia de la doxorubicina como tratamiento contra este tipo de cáncer (Catalano et al., 2006).

En cáncer urotelial, estudios con VPA han demostrado una reducción en la proliferación de distintas líneas celulares y cambios morfológicos consistentes con la diferenciación de las células uroteliales “paraguas” (Byler et al., 2012).

En cáncer de ovario, se ha demostrado que el VPA inhibe *in vitro* el crecimiento celular, mientras que en estudios *in vivo* ha mostrado reducir el tamaño tumoral e incrementar la apoptosis cuando se usa en combinación con diaminodicloro platino (DDP) (Shan et al., 2012).

Para el caso de la leucemia, pruebas con una combinación de VPA, 5-Aza-2'-desoxicitidina (5-AZA) y ATRA han demostrado ser seguras y activas clínicamente en pacientes (Soriano et al., 2007).

En cáncer de mama, se ha demostrado que el VPA induce apoptosis (Arakawa et al., 2009; Mawatari et al., 2015), regula el ciclo celular (Su et al., 2021) e induce la expresión del receptor de estrógenos (Fortunati et al., 2010). Sin embargo, los resultados sobre su efecto en la tasa de migración de células de cáncer de mama han sido contradictorios, con algunos estudios que reportan un aumento en la migración (Ozman et al., 2021; Zhang et al., 2019) y otros una reducción (Li et al., 2012; Wawruszak et al., 2019). El VPA también ha sido evaluado en combinación con distintos tipos de quimioterapias en ensayos clínicos, demostrando resultados alentadores en el tratamiento del cáncer de mama, como es el caso de su combinación con FEC100 (5-fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida) o con doxorrubícina, ciclofosfamida e hidralazina, un vasodilatador (Wawruszak et al., 2021).

A pesar de los efectos antitumorales del VPA observados en diferentes tipos de cáncer, el mecanismo exacto detrás de estos aún no se ha dilucidado por completo. Sin embargo, se cree que sus efectos antiproliferativos están principalmente relacionados con su actividad como inhibidor de HDACs, ya que los niveles de estas enzimas suelen estar desregulados en cáncer (Gurvich et al., 2004). Se sugiere que el VPA podría reactivar la transcripción de genes

Discusión y conclusiones

supresores de tumores silenciados por la condensación de la cromatina debido al desequilibrio en la acetilación de histonas (Pellegrino et al., 2022). Sin embargo, una función tan amplia como “abridor de cromatina” podría conllevar *off-targets* y no necesariamente limitarse a la activación de supresores tumorales, lo que introduce cierta incertidumbre sobre el alcance real del VPA como fármaco terapéutico. No obstante, al ser un fármaco aprobado para el tratamiento de epilepsia y trastornos bipolares, se cuenta con un perfil de seguridad establecido. En muchos casos, se propone utilizar el VPA en combinación con otras terapias contra el cáncer para potenciar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios, observándose resultados prometedores en estudios *in vitro* y ensayos clínicos (Meschi et al., 2023; Minegaki et al., 2018; Münster et al., 2007).

En esta tesis, se ha analizado el efecto del tratamiento con VPA en células de NB, evaluando distintos aspectos de la biología tumoral que influyen en la agresividad del cáncer. Los resultados indican que, el tratamiento con VPA (2 mM) en las células SK-N-SH y SH-SY5Y aumenta la proporción de células alargadas y con morfología neuronal en comparación con el control, además de observarse una disminución en el número de células WT. Mediante análisis de viabilidad a través de ensayos de *Trypan blue* y MTT, se demostró que el VPA no afecta la viabilidad de las células SK-N-SH a esa concentración.

En cuanto a la capacidad proliferativa en dos dimensiones, ensayos de confluencia y MTT en células pretratadas mostraron una disminución en la tasa de proliferación de las células SK-N-SH tratadas con VPA. Adicionalmente, se evaluó la capacidad clonogénica de ambas líneas celulares bajo el tratamiento, observándose una disminución significativa en formación de colonias en comparación con el control. Para evaluar el impacto del VPA en la capacidad migratoria de las células de NB, se realizaron ensayos de *transwell* con células SK-N-SH tratadas con VPA (2 mM) durante 72 horas. Una menor cantidad de células atravesaron la membrana respecto al control, lo que sugiere una reducción en la capacidad migratoria. En estudios futuros, estos ensayos de *transwell* podrían realizarse con una capa de matrigel sobre la membrana para evaluar la capacidad invasiva de las células.

Con el fin de entender los mecanismos de acción involucrados en los efectos del VPA sobre las células de NB, se realizaron inmunotinciones con anticuerpos anti-vimentina, un marcador del fenotipo mesenquimal comúnmente asociado a una mayor agresividad tumoral. En un análisis cualitativo preliminar, se observó un leve aumento de la señal en las células tratadas con VPA. Sin embargo, para confirmar este efecto se requeriría un análisis cuantitativo mediante cuantificación de la intensidad de señal en un microscopio confocal o mediante técnicas como *Western blot* o RT-qPCR para medir los niveles de expresión del marcador.

El VPA también ha demostrado incrementar la señalización de la vía de Notch en varios sistemas (Greenblatt et al., 2007; Jacob et al., 2014; Stockhausen et al., 2005), promoviendo cambios similares en la cascada de señalización mediada por Notch a los que genera la

Discusión y conclusiones

diferenciación inducida por el ATRA (Grynfeld et al., 2000). Se ha observado además que el aumento de la expresión del péptido Y (NPY) inducido por VPA es parcialmente suprimido con inhibidores de gamma-secretasa, un componente clave de la vía de Notch, lo que sugiere que al menos parte del efecto diferenciador del VPA se debe a la activación de esta vía (Stockhausen et al., 2005). En la señalización mediada por Notch, uno de los blancos transcripcionales más relevantes es el factor de transcripción Hes-1 (Iso et al., 2003) que a su vez actúa como un represor transcripcional de ASCL1 (Grynfeld et al., 2000). Basado en estos resultados, se puede decir que la regulación de la vía de Notch es relevante en el proceso de diferenciación de las células de NB (Stockhausen et al., 2005). Aunque estos resultados no establecen una conexión directa entre el tratamiento con VPA y el silenciamiento de ASCL1, existe un trabajo realizado en *pez cebra* que han demostrado que el VPA reduce la expresión de *asc1* en progenitores serotoninérgicos, y que esta represión depende de la activación de la vía de Notch (Jacob et al., 2014). Estas observaciones indican que el VPA podría regular el fenotipo de las células de NB y facilitar su diferenciación mediante la represión de ASCL1.

Para investigar esta posibilidad, se realizó una inmunotinción en células SK-N-SH control y tratadas con VPA durante 72 horas para evaluar los niveles de ASCL1. Aunque no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones a simple vista, realizar análisis cuantitativos detallados, al igual que con la vimentina, podría determinar si el VPA produce algún efecto en la expresión de ASCL1 o en otros marcadores asociados con la diferenciación neuronal. Dado que fue necesario, en primer lugar, poner a punto un protocolo de inmunotinciones, únicamente fue posible obtener imágenes preliminares durante el tiempo de desarrollo de esta tesis. En un futuro, deberían realizarse ensayos cuantitativos adicionales para evaluar el impacto del VPA en las células de NB, tanto en ASCL1 como otros marcadores de diferenciación neuronal y en proteínas como la vimentina, para profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. Para el caso de ASCL1 se llevó a cabo un *Western blot* para medir los niveles de este factor de transcripción presentes en células control y tratadas con VPA y se observó una disminución significativa de ASCL1 en el grupo tratado.

En esta tesis también se exploró la formación de esferoides con células SK-N-SH y SH-SY5Y para obtener una aproximación a un entorno tridimensional más cercano al de un tumor. Los resultados indicaron que los esferoides tratados con VPA presentan un área menor en comparación con los esferoides control, lo que sugiere una menor capacidad proliferativa en un contexto 3D. Además, se realizaron implantes de esferoides control y tratados con VPA en la CAM del embrión de pollo. Aunque no se lograron realizar comparaciones cuantitativas de cortes histológicos entre esferoides control y tratados, en un futuro podrían repetirse estos experimentos y llevarse a cabo análisis adicionales además de tinciones con hematoxilina y

Discusión y conclusiones

eosina, para entender mejor los efectos del VPA en un contexto de desarrollo tumoral tridimensional.

Por último, se evaluaron los cambios en la morfología y en la proliferación en tres dimensiones de las células SH-SY5Y bajo el tratamiento combinado de VPA con ATRA. El objetivo de esto fue determinar si era posible aumentar la eficacia del ATRA como tratamiento para el NB, debido a que este agente diferenciador no suele tener resultados en los pacientes más graves porque presentan resistencia al mismo. Como resultado se obtuvo que las células adquirían una morfología más alargada y una menor capacidad proliferativa en tres dimensiones en el tratamiento combinado con respecto al ATRA solo, lo que podría llevar a pensar que el VPA efectivamente aumenta la eficacia del ATRA. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en estos aspectos entre la combinación de drogas y el VPA solo. Podría ser, entonces, que los efectos observados en el tratamiento combinado se deban únicamente a la acción del VPA y que este no lleve a un aumento de la eficacia del ATRA, aunque también puede ser que no se hayan detectado diferencias significativas debido a la poca potencia, por lo que debería aumentarse el número de ensayos.

En resumen, bajo el tratamiento con VPA se observaron cambios en la morfología de células de NB indicativos de un mayor grado de diferenciación celular y una disminución significativa de las capacidades migratorias y proliferativas en dos y tres dimensiones, sin afectar la viabilidad celular. Estos resultados sugieren que el VPA, un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de epilepsia y desórdenes bipolares, tiene potencial para ser repositionado como tratamiento para el NB. Además, al optimizar un modelo de implantes de esferoides de NB en la CAM del embrión de pollo, se presenta la posibilidad de llevar a cabo más ensayos que aporten nueva evidencia de este potencial al ser un modelo *in vivo*. También se plantea la posibilidad de combinar esta droga con otros tratamientos ya aprobados con el objetivo de constituir una estrategia terapéutica para mejorar el pronóstico clínico de este tipo de cáncer.

2. Cáncer de páncreas y FLX

En este trabajo se evaluó el efecto de la FLX sobre células de PDAC, el tipo de cáncer de páncreas más frecuente. Para esto, se realizaron ensayos de proliferación en dos dimensiones como el ensayo clonogénico, dando como resultado una disminución en la capacidad de formar colonias en las células tratadas con FLX respecto a las células control. También, se llevó a cabo un ensayo de proliferación en tres dimensiones mediante la formación de esferoides tratados con FLX, aunque en este caso no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los mismos.

Discusión y conclusiones

Debido a inconsistencias en los resultados iniciales, se realizó una curva de concentración de FLX para evaluar si los efectos observados en las PANC-1 con 10 µM de FLX se mantenían constantes a lo largo del desarrollo de la tesis. Efectivamente, se observó por ensayos de MTT que a partir de 20 µM se veían diferencias significativas con respecto al grupo control, mientras que la concentración de 10 µM no presentaba diferencias significativas (concentración a la que encontramos diferencias inicialmente). Esto puede deberse a diferencias tanto en los lotes de la droga utilizada, como al estado de las células PANC-1 en los distintos momentos en los que se llevaron a cabo los experimentos. Teniendo en cuenta los resultados del MTT, la concentración de 20 µM FLX parece tener un efecto negativo sobre la proliferación y/o la viabilidad de las células. Para corroborar de cuál de los dos casos se trata, sería necesario llevar a cabo un ensayo de exclusión de *Trypan blue* o un MTT con células pre-tratadas como fue el caso de los tratamientos con VPA.

Por último, para explorar un posible mecanismo que explicara los efectos de la FLX sobre este tipo celular, se midieron los niveles del intermediario autofágico LC3-II bajo el tratamiento con el antidepresivo y en su combinación con inhibidores del flujo autofágico. Como resultado se observó que la FLX parece disminuir la autofagia en células PANC-1, lo cual podría explicar parte de su efecto antitumoral.

Aunque estos experimentos permitieron comenzar a estudiar de manera preliminar el efecto de la FLX sobre una línea celular de PDAC, a futuro será necesario realizar análisis adicionales. Entre ellos, repetir los ensayos de esferoides, pero a una mayor concentración de la droga y evaluar la viabilidad de las células tratadas con respecto a los controles.

En caso de confirmarse los resultados obtenidos, se establecería que el tratamiento con FLX disminuye el fenotipo agresivo de las células PDAC y la autofagia. Sin embargo, los datos actuales no permiten concluir que el efecto antitumoral de FLX esté mediado por la inhibición de la autofagia. Para validar esta hipótesis, se deberán realizar estudios con otros inhibidores específicos de la autofagia o utilizar técnicas de silenciamiento génico dirigidas a genes clave de la vía autofágica y analizar su impacto en el fenotipo celular.

Adicionalmente, deben explorarse otros mecanismos de acción de la FLX. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que FLX inhibe la SUMOylation de FKBP51 y la sumoilación global (Gobbini, 2023). Por este motivo, sería relevante investigar estos procesos en el contexto de PDAC para identificar posibles mecanismos de acción de la FLX.

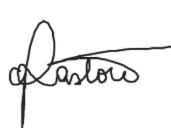
Por otro lado, aún demostrando que el efecto de la FLX sobre PDAC está mediado por la inhibición de la autofagia, debe considerarse que el rol de esta vía en cáncer de páncreas es controversial. Estudios previos han reportado resultados contradictorios, sugiriendo que la autofagia podría actuar como un supresor tumoral en algunos contextos, mientras que en otros casos su activación es necesaria para la progresión de tumores malignos (Raufi et al., 2021).

Discusión y conclusiones

A pesar de estas incertidumbres, los resultados obtenidos, aún cuando el mecanismo de acción de la FLX no está definido, respaldan el potencial que posee esta droga para ser reposicionada como tratamiento antitumoral, específicamente para el cáncer de páncreas. Sería interesante también evaluar su efecto en combinación con terapias ya aprobadas para este tipo de cáncer, o en líneas tumorales resistentes a las terapias convencionales, ampliando así su posible aplicación terapéutica.

Como conclusión, durante el desarrollo de esta tesis se cumplieron los objetivos propuestos de evaluar mediante diferentes ensayos las propiedades antitumorales de dos medicamentos utilizados en la psiquiatría y neurología. También se exploraron algunos mecanismos que podrían estar involucrados en estos efectos. Si bien muchos resultados son preliminares y requieren de más repeticiones y otros experimentos complementarios, continúan demostrando el potencial que estas drogas tienen para su reposicionamiento como terapias oncológicas.

Tesista



Candela Diva Pastore

Director



Abel Luis Carcagno

Director asistente



Federico Julián Garde

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Abualhasan, M., Odeh, N.W., Younis, G.N., and Zeidan, O.F. (2020). Analytical Method Development for Sodium Valproate through Chemical Derivatization. *Int J Anal Chem* 2020, 5672183.
- Arakawa, Y., Saito, S., Yamada, H., and Aiba, K. (2009). Simultaneous treatment with camptothecin and valproic acid suppresses induction of Bcl-XL and promotes apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 14, 1076-1085.
- Arora, S., Singh, S., Mittal, A., Desai, N., Khatri, D.K., Gugulothu, D., Lather, V., Pandita, D., and Vora, L.K. (2024). Spheroids in cancer research: Recent advances and opportunities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 100, 106033.
- Axelson, H. (2004). The Notch signaling cascade in neuroblastoma: role of the basic helix-loop-helix proteins HASH-1 and HES-1. *Cancer Lett* 204, 171-178.
- Bae, H., and Guan, J.L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anticancer agents. *Mol Cancer Res* 9, 1232-1241.
- Bago, R., Malik, N., Munson, M.J., Prescott, A.R., Davies, P., Sommer, E., Shpiro, N., Ward, R., Cross, D., Ganley, I.G., et al. (2014). Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 463, 413-427.
- Bhalla, K.N. (2005). Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 23, 3971-3993.
- Bi, J., Khan, A., Tang, J., Armando, A.M., Wu, S., Zhang, W., Gimple, R.C., Reed, A., Jing, H., Koga, T., et al. (2021). Targeting glioblastoma signaling and metabolism with a re-purposed brain-penetrant drug. *Cell Rep* 37, 109957.
- Biedler, J.L., Nelson, L., and Spengler, B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* 33, 2643-2652.
- Birla, H., Rai, S.N., Singh, S.S., Medicine, J.H., and Zahra, W. (2020). Immunohistochemistry as an Important Technique in Experimental and Clinical Practices. *Protocols used in Molecular Biology*, 44-59.
- Blaheta, R.A., Michaelis, M., Natsheh, I., Hasenberg, C., Weich, E., Relja, B., Jonas, D., Doerr, H.W., and Cinatl, J. (2007). Valproic acid inhibits adhesion of vincristine- and cisplatin-resistant neuroblastoma tumour cells to endothelium. *British Journal of Cancer* 96, 1699-1706.
- Boeva, V., Louis-Brennetot, C., Peltier, A., Durand, S., Pierre-Eugène, C., Raynal, V., Etchevers, H.C., Thomas, S., Lermine, A., Daudigeos-Dubus, E., et al. (2017). Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries. *Nature Genetics* 49, 1408-1413.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 769-784.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 74, 229-263.
- Bronner, M.E., and LeDouarin, N.M. (2012). Development and evolution of the neural crest: An overview. In *Developmental Biology* (Academic Press Inc.), pp. 2-9.
- Budzinski, M.L., Sokn, C., Gobbini, R., Ugo, B., Antunica-Noguerol, M., Senin, S., Bajaj, T., Gassen, N.C., Rein, T., Schmidt, M.V., et al. (2022). Tricyclic antidepressants target FKBP51 SUMOylation to restore glucocorticoid receptor activity. *Mol Psychiatry* 27, 2533-2545.

Referencias bibliográficas

- Byler, T.K., Leocadio, D., Shapiro, O., Bratslavsky, G., Stodgell, C.J., Wood, R.W., Messing, E.M., and Reeder, J.E. (2012). Valproic acid decreases urothelial cancer cell proliferation and induces thrombospondin-1 expression. *BMC Urology* 12.
- Catalano, M.G., Fortunati, N., Pugliese, M., Poli, R., Bosco, O., Mastrocoda, R., Aragno, M., and Bocuzzi, G. (2006). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances sensitivity to doxorubicin in anaplastic thyroid cancer cells. *Journal of Endocrinology* 191, 465-472.
- Chaudhari, N., Talwar, P., Lefebvre D'hellencourt, C., and Ravanan, P. (2017). CDDO and ATRA Instigate Differentiation of IMR32 Human Neuroblastoma Cells. *Front Mol Neurosci* 10, 310.
- Chen, J.F., and Yan, Q. (2021). The roles of epigenetics in cancer progression and metastasis. In *Biochemical Journal* (Portland Press Ltd), pp. 3373-3393.
- Chlapek, P., Slavikova, V., Mazanek, P., Sterba, J., and Veselska, R. (2018). Why Differentiation Therapy Sometimes Fails: Molecular Mechanisms of Resistance to Retinoids. *Int J Mol Sci* 19.
- Choi, J., Hwang, J., Ramalingam, M., Jeong, H.S., and Jang, S. (2023). Effects of HDAC inhibitors on neuroblastoma SH-SY5Y cell differentiation into mature neurons via the Wnt signaling pathway. *BMC Neuroscience* 24, 1-10.
- Chomchoei, C., Brimson, J.M., and Brimson, S. (2022). Repurposing fluoxetine to treat lymphocytic leukemia: Apoptosis induction, sigma-1 receptor upregulation, inhibition of IL-2 cytokine production, and autophagy induction. *Expert Opin Ther Targets* 26, 1087-1097.
- Cinatl, J., Cinatl, J., Hernáiz Driever, P., Kotchetkov, R., Pouckova, P., Kornhuber, B., and Schwabe, D. (1997). Sodium valproate inhibits *in vivo* growth of human neuroblastoma cells. In *Anti-Cancer Drugs*, pp. 958-963.
- Dagg, C.P., Karnofsky, D.A., Wallace Toolan, H., and Roddy, J. (1954). Serial Passage of Human Tumors in Chick Embryo: Growth Inhibition by Nitrogen Mustard. In *Technical Informaticon Division (McGraw-Hill)*, pp. 87-87.
- Das, C.M., Aguilera, D., Vasquez, H., Prasad, P., Zhang, M., Wolff, J.E., and Gopalakrishnan, V. (2007). Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (α/β) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology* 85, 159-170.
- De los Santos, M., Zambrano, A., Sanchez-Pacheco, A., and Aranda, A. (2007). Histone deacetylase inhibitors regulate retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma cells by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Mol Endocrinol* 21, 2416-2426.
- Debnath, J., Gammon, N., and Ryan, K.M. (2023). Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 560-575.
- DeBord, L.C., Pathak, R.R., Villaneuva, M., Liu, H.C., Harrington, D.A., Yu, W., Lewis, M.T., and Sikora, A.G. (2018). The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res* 8, 1642-1660.
- Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology* 130, 1119-1130.
- Dowdle, W.E., Nyfeler, B., Nagel, J., Elling, R.A., Liu, S., Triantafellow, E., Menon, S., Wang, Z., Honda, A., Pardee, G., et al. (2014). Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis *in vivo*. *Nat Cell Biol* 16, 1069-1079.
- Duband, J.L., Monier, F., Delannet, M., and Newgreen, D. (1995). Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta anatomica* 154, 63-78.
- Duffy, D.J., Krstic, A., Halasz, M., Schwarzl, T., Konietzny, A., Iljin, K., Higgins, D.G., and Kolch, W. (2017). Retinoic acid and TGF-beta signalling cooperate to overcome MYCN-induced retinoid resistance. *Genome Med* 9, 15.

Referencias bibliográficas

- Durbin, A.D., Zimmerman, M.W., Dharia, N.V., Abraham, B.J., Iniguez, A.B., Weichert-Leahy, N., He, S., Krill-Burger, J.M., Root, D.E., Vazquez, F., *et al.* (2018). Selective gene dependencies in MYCN-amplified neuroblastoma include the core transcriptional regulatory circuitry. *Nat Genet* 50, 1240-1246.
- Egan, D.F., Chun, M.G., Vamos, M., Zou, H., Rong, J., Miller, C.J., Lou, H.J., Raveendra-Panickar, D., Yang, C.C., Sheffler, D.J., *et al.* (2015). Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol Cell* 59, 285-297.
- Fang, E., Wang, J., Hong, M., Zheng, L., and Tong, Q. (2019). Valproic acid suppresses Warburg effect and tumor progression in neuroblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 508, 9-16.
- Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A., and Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Springer Nature).
- Feldman, A.T., and Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol* 1180, 31-43.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 453-458.
- Fortunati, N., Bertino, S., Costantino, L., De Bortoli, M., Compagnone, A., Bandino, A., Catalano, M.G., and Bocuzzi, G. (2010). Valproic acid restores ER α and antiestrogen sensitivity to ER α -negative breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 314, 17-22.
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 2006 1:5 1, 2315-2319.
- Frumm, S.M., Fan, Z.P., Ross, K.N., Duvall, J.R., Gupta, S., VerPlank, L., Suh, B.C., Holson, E., Wagner, F.F., Smith, W.B., *et al.* (2013). Selective HDAC1/HDAC2 inhibitors induce neuroblastoma differentiation. *Chem Biol* 20, 713-725.
- Gabrielli, M.G., and Accili, D. (2010). The chick chorioallantoic membrane: A model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.
- Garde, F.J. (2022). Rol de Ascl1 en el proceso de diferenciación mediado por ácido retinoico en células de Neuroblastoma. In IQUIBICEN-CONICET, FCEyN-UBA, CABA, Argentina (Universidad de Buenos Aires), pp. 104.
- Gassen, N.C., Hartmann, J., Zschocke, J., Stepan, J., Hafner, K., Zellner, A., Kirmeier, T., Kollmannsberger, L., Wagner, K.V., Dedic, N., *et al.* (2014). Association of FKBP51 with priming of autophagy pathways and mediation of antidepressant treatment response: evidence in cells, mice, and humans. *PLoS Med* 11, e1001755.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., and Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 22.
- Gil, J., and Rodriguez, T. (2016). Cancer: The transforming power of cell competition. In *Current Biology* (Cell Press), pp. R164-R166.
- Gillies, R.J., Robey, I., and Gatenby, R.A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* 49 Suppl 2, 24S-42S.
- Gillson, J., Abd El-Aziz, Y.S., Leck, L.Y.W., Jansson, P.J., Pavlakis, N., Samra, J.S., Mittal, A., and Sahni, S. (2022). Autophagy: A Key Player in Pancreatic Cancer Progression and a Potential Drug Target. *Cancers (Basel)* 14.
- Giordano, F., Paoli, A., Forastiero, M., Marsico, S., De Amicis, F., Marrelli, M., Naimo, G.D., Mauro, L., and Panno, M.L. (2023). Valproic acid inhibits cell growth in both MCF-7 and MDA-MB231 cells by triggering different responses in a cell type-specific manner. *J Transl Med* 21, 165.
- Givisiez, P.E.N., Moreira Filho, A.L.B., Santos, M.R.B., Oliveira, H.B., Ferket, P.R., Oliveira, C.J.B., and Malheiros, R.D. (2020). Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult Sci* 99, 6774-6782.

Referencias bibliográficas

- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221, 3-12.
- Gobbini, R. (2023). Estudio de la regulación de la SUMOIlación mediada por drogas antidepresivas: su impacto en la actividad de la co-chaperona FKBP51 y la SUMOIlación proteica global. In Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) - CONICET - Instituto Partner de la Sociedad Max Planck (Universidad de Buenos Aires), pp. 147.
- Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M.J., Park, J.O., Hochhauser, D., Arnold, D., Oh, D.Y., et al. (2019). Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 381, 317-327.
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO Journal* 20, 6969-6078.
- Greenblatt, D.Y., Vaccaro, A.M., Jaskula-Sztul, R., Ning, L., Haymart, M., Kunnilalaiyaan, M., and Chen, H. (2007). Valproic Acid Activates Notch-1 Signaling and Regulates the Neuroendocrine Phenotype in Carcinoid Cancer Cells. *The Oncologist* 12, 942-951.
- Gynfeld, A., Pählman, S., and Axelson, H. (2000). Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *International journal of cancer* 88, 401-410.
- Gu, S., Tian, Y., Chlenski, A., Salwen, H.R., Lu, Z., Raj, J.U., and Yang, Q. (2012). Valproic acid shows a potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. *Anti-Cancer Drugs* 23, 1054-1066.
- Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., and Joyner, A.L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.
- Gurvich, N., Tsygankova, O.M., Meinkoth, J.L., and Klein, P.S. (2004). Histone Deacetylase Is a Target of Valproic Acid-Mediated Cellular Differentiation. *Cancer Research* 64, 1079-1086.
- Guzman, C., Bagga, M., Kaur, A., Westermark, J., and Abankwa, D. (2014). ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS One* 9, e92444.
- Halbrook, C.J., Lyssiotis, C.A., Pasca di Magliano, M., and Maitra, A. (2023). Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell* 186, 1729-1754.
- Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* 195, 231-272.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. In *Cancer Discovery* (American Association for Cancer Research Inc.), pp. 31-46.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell*, pp. 646-674.
- Hay, E.D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. In *Developmental Dynamics*, pp. 706-720.
- Ichimiya, S., Nimura, Y., Seki, N., Ozaki, T., Nagase, T., and Nakagawara, A. (2001). Downregulation of hASH1 is associated with the retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Med Pediatr Oncol* 36, 132-134.
- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway. In *Journal of Cellular Physiology*, pp. 237-255.
- Jacob, J., Ribes, V., Moore, S., Constable, S.C., Sasai, N., Gerety, S.S., Martin, D.J., Sergeant, C.P., Wilkinson, D.G., and Briscoe, J. (2014). Valproic acid silencing of *ascl1b/Ascl1* results in the failure of serotonergic differentiation in a zebrafish model of fetal valproate syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms* 7, 107-117.

Referencias bibliográficas

- Jahanian, S., Pareja-Cajiao, M., Gransee, H.M., Sieck, G.C., and Mantilla, C.B. (2024). Autophagy markers LC3 and p62 in aging lumbar motor neurons. *Exp Gerontol* 194, 112483.
- Jankovic, B.D., Isakovic, K., Lukic, M.L., Vujanovic, N.L., Petrovic, S., and Markovic, B.M. (1975). Immunological Capacity of the Chicken Embryo I. Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated immunity in the developing chicken embryo. In *Immunology*, pp. 497-497.
- Jiang, Y., and Sohal, D.P.S. (2023). Pancreatic Adenocarcinoma Management. *JCO Oncol Pract* 19, 19-32.
- Johnson, J.E., Birren, S.J., and Anderson, D.J. (1990). Two rat homologues of *Drosophila achaete-scute* specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346, 858-861.
- Kabacaoglu, D., Ciecielski, K.J., Ruess, D.A., and Algul, H. (2018). Immune Checkpoint Inhibition for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Limitations and Future Options. *Front Immunol* 9, 1878.
- Kasim, M., Hess, V., Scholz, H., Persson, P.B., and Fahling, M. (2016). Achaete-Scute Homolog 1 Expression Controls Cellular Differentiation of Neuroblastoma. *Front Mol Neurosci* 9, 156.
- Knighton, D., Ausprunk, D., Tapper, D., and Folkman, J. (1977). Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *British Journal of Cancer* 35, 347-356.
- Kocak, H., Ackermann, S., Hero, B., Kahlert, Y., Oberthuer, A., Juraeva, D., Roels, F., Theissen, J., Westermann, F., Deubzer, H., et al. (2013). Hox-C9 activates the intrinsic pathway of apoptosis and is associated with spontaneous regression in neuroblastoma. *Cell Death Dis* 4, e586.
- Kostrouchová, M., Kostrouch, Z., and Kostrouchová, M. (2007). Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia biologica* 53, 37-49.
- Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (2018). The “beginnings” of the neural crest. In *Developmental Biology* (Elsevier Inc.), pp. S3-S13.
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., and Cartner, S. (2013). AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 Edition (American Veterinary Medical Association).
- Lee, C.S., Kim, Y.J., Jang, E.R., Kim, W., and Myung, S.C. (2010). Fluoxetine induces apoptosis in ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 through reactive oxygen species-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106, 446-453.
- Li, G.F., Qian, T.L., Li, G.S., Yang, C.X., Qin, M., Huang, J., Sun, M., and Han, Y.Q. (2012). Sodium valproate inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell migration by upregulating NM23H1 expression. *Genetics and molecular research : GMR* 11, 77-86.
- Li, M., Pathak, R.R., Lopez-Rivera, E., Friedman, S.L., Aguirre-Ghiso, J.A., and Sikora, A.G. (2015). The in ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an efficient xenograft model of hepatocellular carcinoma. *Journal of Visualized Experiments* 2015.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
- Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., and Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15, 741-747.
- Liu, M., Scanlon, C.S., Banerjee, R., Russo, N., Inglehart, R.C., Willis, A.L., Weiss, S.J., and D'Silva, N.J. (2013). The Histone Methyltransferase EZH2 Mediates Tumor Progression on the Chick Chorioallantoic Membrane Assay, a Novel Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma 1. *Translational Oncology* 6, 273-281.
- Liu, S., Yin, W., Lin, Y., Huang, S., Xue, S., Sun, G., and Wang, C. (2023). Metastasis pattern and prognosis in children with neuroblastoma. *World Journal of Surgical Oncology* 21.

Referencias bibliográficas

- Lubbert, M., Grishina, O., Schmoor, C., Schlenk, R.F., Jost, E., Crysandt, M., Heuser, M., Thol, F., Salih, H.R., Schittenhelm, M.M., et al. (2020). Valproate and Retinoic Acid in Combination With Decitabine in Elderly Nonfit Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results of a Multicenter, Randomized, 2 x 2, Phase II Trial. *J Clin Oncol* 38, 257-270.
- Luchini, C., Capelli, P., and Scarpa, A. (2016). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surg Pathol Clin* 9, 547-560.
- Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P., and Anderson, D.J. (1997). Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci* 17, 3644-3652.
- Masetti, R., Biagi, C., Zama, D., Vendemini, F., Martoni, A., Morello, W., Gasperini, P., and Pession, A. (2012). Retinoids in pediatric onco-hematology: The model of acute promyelocytic leukemia and neuroblastoma. *Advances in Therapy* 29, 747-762.
- Matthay, K.K., Maris, J.M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C.L., Diller, L., and Weiss, W.A. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., and Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435-1455.
- Mawatari, T., Ninomiya, I., Inokuchi, M., Harada, S., Hayashi, H., Oyama, K., Makino, I., Nakagawara, H., Miyashita, T., Tajima, H., et al. (2015). Valproic acid inhibits proliferation of HER2-expressing breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis through Hsp70 acetylation. *International Journal of Oncology* 47, 2073-2081.
- Melkonian, G., Munoz, N., Chung, J., Tong, C., Marr, R., and Talbot, P. (2002). Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *Journal of Experimental Zoology* 292, 241-254.
- Meschi, M., Khorsandi, K., and Kianmehr, Z. (2023). The Effect of Berberine Follow by Blue Light Irradiation and Valproic Acid on the Growth Inhibition of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 195, 6752-6767.
- Minegaki, T., Suzuki, A., Mori, M., Tsuji, S., Yamamoto, S., Watanabe, A., Tsuzuki, T., Tsunoda, T., Yamamoto, A., Tsujimoto, M., et al. (2018). Histone deacetylase inhibitors sensitize 5-fluorouracil-resistant MDA-MB-468 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Oncology Letters* 16, 6202-6208.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728-741.
- Münter, P., Marchion, D., Bicaku, E., Schmitt, M., Ji, H.L., DeConti, R., Simon, G., Fishman, M., Minton, S., Garrett, C., et al. (2007). Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: A clinical and translational study. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1979-1985.
- Murphy, J.B. (1912). Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. *Journal of the American Medical Association* LIX, 874-875.
- Nakagawara, A., Li, Y., Izumi, H., Muramori, K., Inada, H., and Nishi, M. (2018). Neuroblastoma. In *Japanese Journal of Clinical Oncology* (Oxford University Press), pp. 214-241.
- Nsingwane, Z., Candy, G., Devar, J., Omosoro-Jones, J., Smith, M., and Nweke, E. (2020). Immunotherapeutic strategies in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): current perspectives and future prospects. *Mol Biol Rep* 47, 6269-6280.
- O'Byrne, S.M., and Blaner, W.S. (2013). Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res* 54, 1731-1743.
- Omar Zaki, S.S., Kanesan, L., Leong, M.Y.D., and Vidyadaran, S. (2019). The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. *Cell Biology International* 43, 1201-1204.

Referencias bibliográficas

- Osuka, S., Takano, S., Watanabe, S., Ishikawa, E., Yamamoto, T., and Matsumura, A. (2012). Valproic Acid Inhibits Angiogenesis In Vitro and Glioma Angiogenesis In Vivo in the Brain. In *Neurol Med Chir (Tokyo)*.
- Ozman, Z., Ozbek Iptec, B., Sahin, E., Guney Eskiler, G., Deveci Ozkan, A., and Kaleli, S. (2021). Regulation of valproic acid induced EMT by AKT/GSK3 β /β-catenin signaling pathway in triple negative breast cancer. *Molecular Biology Reports* 48, 1335-1343.
- Pasquier, B. (2015). SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells. *Autophagy* 11, 725-726.
- Pellegrino, M., Ricci, E., Ceraldì, R., Nigro, A., Bonofigliò, D., Lanzino, M., and Morelli, C. (2022). From HDAC to Voltage-Gated Ion Channels: What's Next? The Long Road of Antiepileptic Drugs Repositioning in Cancer. *Cancers* 14.
- Peng, H., Ke, X.X., Hu, R., Yang, L., Cui, H., and Wei, Y. (2015). Essential role of GATA3 in regulation of differentiation and cell proliferation in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Molecular Medicine Reports* 11, 881-886.
- Phimmachanh, M., Han, J.Z.R., O'Donnell, Y.E.I., Latham, S.L., and Croucher, D.R. (2020). Histone Deacetylases and Histone Deacetylase Inhibitors in Neuroblastoma. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Frontiers Media S.A.).
- Pierce, G.B., and Wallace, C. (1971). Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res* 31, 127-134.
- Piffoux, M., Eriaü, E., and Cassier, P.A. (2021). Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 124, 333-344.
- Po, W.W., Thein, W., Khin, P.P., Khing, T.M., Han, K.W.W., Park, C.H., and Sohn, U.D. (2020). Fluoxetine Simultaneously Induces Both Apoptosis and Autophagy in Human Gastric Adenocarcinoma Cells. *Biomol Ther (Seoul)* 28, 202-210.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Evers, P.A., Escott, K.J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., et al. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 18, 41-58.
- Qiu, B., and Matthay, K.K. (2022). Advancing therapy for neuroblastoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 19, 515-533.
- Raufi, A.G., Liguori, N.R., Carlsen, L., Parker, C., Hernandez Borrero, L., Zhang, S., Tian, X., Louie, A., Zhou, L., Seyhan, A.A., et al. (2021). Therapeutic Targeting of Autophagy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Pharmacol* 12, 751568.
- Rawla, P., Sunkara, T., and Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol* 10, 10-27.
- Reynolds, C.P., and Lemons, R.S. (2001). Retinoid therapy of childhood cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 15, 867-910.
- Reynolds, C.P., Matthay, K.K., Villablanca, J.G., and Maurer, B.J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197, 185-192.
- Ribatti, D. (2014). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Experimental Cell Research* 328, 314-324.
- Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of Development* 141, 70-77.
- Rossi, A., Barraco, A., and Donda, P. (2004). Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Ann Gen Hosp Psychiatry* 3, 2.
- Rous, P. (1911). Tumor implantations in the developing embryo. *Journal of the American Medical Association* LVI, 741-742.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods*, pp. 676-682.
- Schipper, L.J., Zeverijn, L.J., Garnett, M.J., and Voest, E.E. (2022). Can Drug Repurposing Accelerate Precision Oncology? *Cancer Discov* 12, 1634-1641.
- Shah, R.D., Jagtap, J.C., Mruthyunjaya, S., Shelke, G.V., Pujari, R., Das, G., and Shastry, P. (2013). Sodium valproate potentiates staurosporine-induced apoptosis in neuroblastoma cells via Akt/survivin independently of HDAC inhibition. *J Cell Biochem* 114, 854-863.

Referencias bibliográficas

- Shan, Z., Feng-Nian, R., Jie, G., and Ting, Z. (2012). Effects of valproic acid on proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis of ovarian cancer in vitro and in vivo. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13, 3977-3982.
- Shao, S., Zhuang, X., Zhang, L., and Qiao, T. (2022). Antidepressants Fluoxetine Mediates Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy of Non-Small Cell Lung Cancer Cells Through the ATF4-AKT-mTOR Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 13, 904701.
- Siaw, J.T., Javanmardi, N., Van den Eynden, J., Lind, D.E., Fransson, S., Martinez-Monleon, A., Djos, A., Sjöberg, R.M., Östensson, M., Carén, H., et al. (2020). 11q Deletion or ALK Activity Curbs DLG2 Expression to Maintain an Undifferentiated State in Neuroblastoma. *Cell Reports* 32.
- Sidell, N., Altman, A., Haussler, M.R., and Seeger, R.C. (1983). Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 148, 21-30.
- Siegel, R.L., Giaquinto, A.N., and Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* 74, 12-49.
- Sleire, L., Førde-Tislevoll, H.E., Netland, I.A., Leiss, L., Skeie, B.S., and Enger, P.Ø. (2017). Drug repurposing in cancer. *Pharmacological Research* 124, 74-91.
- Slekienė, L., Stakisaitis, D., Balnyte, I., and Valanciute, A. (2018). Sodium Valproate Inhibits Small Cell Lung Cancer Tumor Growth on the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and Reduces the p53 and EZH2 Expression. *Dose Response* 16, 1559325818772486.
- Slodownik, D., Grinberg, I., Spira, R.M., Skornik, Y., and Goldstein, R.S. (2009). The human skin/chick chorioallantoic membrane model accurately predicts the potency of cosmetic allergens. *Experimental Dermatology* 18, 409-413.
- Soderholm, H., Ortoft, E., Johansson, I., Ljungberg, J., Larsson, C., Axelson, H., and Pahlman, S. (1999). Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 557-563.
- Soriano, A.O., Yang, H., Faderl, S., Estrov, Z., Giles, F., Ravandi, F., Cortes, J., Wierda, W.G., Ouzounian, S., Quezada, A., et al. (2007). Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 110, 2302-2308.
- Steeg, P.S. (2006). Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. In *Nature Medicine*, pp. 895-904.
- Stepulak, A., Rzeski, W., Siflinger, M., Brocke, K., Gratopp, A., Kupisz, K., Turski, L., and Ikonomidou, C. (2008). Fluoxetine inhibits the extracellular signal regulated kinase pathway and suppresses growth of cancer cells. *Cancer Biol Ther* 7, 1685-1693.
- Stockhausen, M.T., Sjölund, J., Manetopoulos, C., and Axelson, H. (2005). Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells. *British Journal of Cancer* 92, 751-759.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Current protocols in immunology 111, A3.B.1-A3.B.1.
- Su, B., Lim, D., Tian, Z., Liu, G., Ding, C., Cai, Z., Chen, C., Zhang, F., and Feng, Z. (2021). Valproic Acid Regulates HR and Cell Cycle Through MUS81-pRPA2 Pathway in Response to Hydroxyurea. *Frontiers in Oncology* 11, 1-16.
- Subauste, M.C., Kupriyanova, T.A., Conn, E.M., Ardi, V.C., Quigley, J.P., and Deryugina, E.I. (2009). Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. *Clin Exp Metastasis* 26, 1033-1047.
- Tamanoi, F. (2019). Recent excitements in the study of the CAM assay. In *Enzymes* (Academic Press), pp. 1-9.
- Tang, F., Hu, P., Yang, Z., Xue, C., Gong, J., Sun, S., Shi, L., Zhang, S., Li, Z., Yang, C., et al. (2017). SBI0206965, a novel inhibitor of Ulk1, suppresses non-small cell lung cancer cell growth by modulating both autophagy and apoptosis pathways. *Oncol Rep* 37, 3449-3458.

Referencias bibliográficas

- Thiele, C.J., Reynolds, C.P., and Israel, M.A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404-406.
- Thomas, S.K., Wattenberg, M.M., Choi-Bose, S., Uhlik, M., Harrison, B., Coho, H., Cassella, C.R., Stone, M.L., Patel, D., Markowitz, K., et al. (2023). Kupffer cells prevent pancreatic ductal adenocarcinoma metastasis to the liver in mice. *Nat Commun* 14, 6330.
- Tomolonis, J.A., Agarwal, S., and Shohet, J.M. (2018). Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. In *Cell and Tissue Research* (Springer Verlag), pp. 245-262.
- Tseng, W.C., Munisha, M., Gutierrez, J.B., and Dougan, S.T. (2017). Establishment of the vertebrate germ layers. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Springer New York LLC), pp. 307-381.
- Usman, S., Waseem, N.H., Nguyen, T.K.N., Mohsin, S., Jamal, A., Teh, M.T., and Waseem, A. (2021). Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers (Basel)* 13.
- van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L., and Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. 237-245.
- Wang, L., Tan, T.K., Durbin, A.D., Zimmerman, M.W., Abraham, B.J., Tan, S.H., Ngoc, P.C.T., Weichert-Leahy, N., Akahane, K., Lawton, L.N., et al. (2019). ASCL1 is a MYCN- and LMO1-dependent member of the adrenergic neuroblastoma core regulatory circuitry. *Nat Commun* 10, 5622.
- Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Miller, W.H., Jr., Scheinberg, D.A., Itri, L.M., Hittelman, W.N., Vyas, R., Andreeff, M., Tafuri, A., Jakubowski, A., et al. (1991). Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 324, 1385-1393.
- Wawruszak, A., Gumbarewicz, E., Okon, E., Jeleniewicz, W., Czapinski, J., Halasa, M., Okla, K., Smok-Kalwat, J., Bocian, A., Rivero-Muller, A., et al. (2019). Histone deacetylase inhibitors reinforce the phenotypical markers of breast epithelial or mesenchymal cancer cells but inhibit their migratory properties. *Cancer Management and Research* 11, 8345-8358.
- Wawruszak, A., Halasa, M., Okon, E., Kukula-Koch, W., and Stepulak, A. (2021). Valproic acid and breast cancer: State of the art in 2021. *Cancers* 13, 1-23.
- Wentur, C.J., Bennett, M.R., and Lindsley, C.W. (2014). Classics in Chemical Neuroscience: Fluoxetine (Prozac). *ACS Chemical Neuroscience* 5, 14-23.
- Wheler, J.J., Janku, F., Falchook, G.S., Jackson, T.L., Fu, S., Naing, A., Tsimberidou, A.M., Moulder, S.L., Hong, D.S., Yang, H., et al. (2014). Phase I study of anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab and histone deacetylase inhibitor valproic acid in patients with advanced cancers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73, 495-501.
- Wong, D.T., Perry, K.W., and Bymaster, F.P. (2005). Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov* 4, 764-774.
- Wu, L., Lu, Y., Chen, L., Yue, X., Cen, C., Zheng, C., and Han, P. (2022). The Effects of Radiotherapy on Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Patients with Liver Metastases. *Curr Oncol* 29, 7912-7924.
- Xia, Y., Sun, M., Huang, H., and Jin, W.L. (2024). Drug repurposing for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* 9, 92.
- Yang, A., Rajeshkumar, N.V., Wang, X., Yabuuchi, S., Alexander, B.M., Chu, G.C., Von Hoff, D.D., Maitra, A., and Kimmelman, A.C. (2014). Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov* 4, 905-913.
- Yıldırım-Kahriman, S. (2021). NON-INTRINSIC CANCER RISK FACTORS. *Experimental Oncology* 43, 290-297.

Referencias bibliográficas

- Yuan, P.X., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Gutkind, J.S., Manji, H.K., and Chen, G. (2001). The Mood Stabilizer Valproic Acid Activates Mitogen-activated Protein Kinases and Promotes Neurite Growth. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31674-31683.
- Zachari, M., and Ganley, I.G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem* 61, 585-596.
- Zagrís, N. (2022). Aristotle (384-322 BC): The beginnings of Embryology. *International Journal of Developmental Biology* 66, 5-8.
- Zeineldin, M., Patel, A.G., and Dyer, M.A. (2022). Neuroblastoma: When differentiation goes awry. In *Neuron* (Cell Press), pp. 2916-2928.
- Zhang, S., Tang, Z., Qing, B., Tang, R., Duan, Q., Ding, S., and Deng, D. (2019). Valproic acid promotes the epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells through stabilization of Snail and transcriptional upregulation of Zeb1. *European Journal of Pharmacology* 865, 172745-172745.
- Zimmerman, M.W., Durbin, A.D., He, S., Oppel, F., Shi, H., Tao, T., Li, Z., Berezovskaya, A., Liu, Y., Zhang, J., et al. (2021). Retinoic acid rewires the adrenergic core regulatory circuitry of childhood neuroblastoma. *Sci Adv* 7, eabe0834.
- Zschocke, J., Zimmermann, N., Berning, B., Ganal, V., Holsboer, F., and Rein, T. (2011). Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons--dissociation from cholesterol homeostasis. *Neuropsychopharmacology* 36, 1754-1768.