



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ANÁLISIS DE VÍAS DE RESISTENCIA A QUIMIOTERAPÉUTICOS EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO CON RESISTENCIA  
ADQUIRIDA A PACLITAXEL O DOCETAXEL**

**Presentado por:**

Yumeily Lisbeth De Hoyos Hansell

Trabajo de graduación  
presentado a la Escuela de  
Biología para optar por el título  
de Licenciado en Biología con  
orientación en Genética y  
Biología Molecular.

**CIUDAD DE PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2025**



---

TRIBUNAL EXAMINADOR

---

Título:

**“Análisis de vías de resistencia a quimioterapéuticos en células de cáncer de mama triple negativo con resistencia adquirida a Paclitaxel o Docetaxel”**

Por:

**Yumeily Lisbeth De Hoyos Hansell**  
**3-747-894**

---

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Genética y Biología Molecular.

**Dra. Erika Guerrero**  
**Asesor (Externo)**

---

**Dr. Ariel Magallón**  
**Asesor**

---

**Mgter. Yamilka Díaz**  
**Co-Asesor**

---

**Dra. Leyda Ábrego**  
**Co-Asesor**

---

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado, con todo mi corazón, a mi madre, quien ha sido mi sostén en cada momento y mi voz de aliento cuando más lo necesitaba. Su apoyo constante, por recordarme que soy capaz incluso cuando yo no lo creía, y por enseñarme con tu ejemplo que la perseverancia transforma sueños en realidad. Cada logro de mi vida lleva un pedacito de ti, y esta tesis no es la excepción.

A la Dra. Erika Guerrero, gracias por abrirme las puertas del mundo científico y confiar en mí. Desde niña sentía curiosidad por entender el cáncer, y usted me dio la oportunidad de vivir esa inquietud como una realidad. Su apoyo y paciencia marcaron una etapa que siempre llevaré conmigo.

Dedico también este esfuerzo a todas las personas que, con una palabra, un consejo, un gesto o un rato compartido, hicieron más llevadero este camino. A familiares, colegas, profesores, y amistades que estuvieron ahí, sumando su granito de arena. Cada uno aportó algo que dio forma a este trabajo y a la persona en la que me estoy convirtiendo.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a **Dios**, fuente de fortaleza, sabiduría y guía constante, por haberme brindado la oportunidad y la capacidad de culminar este importante logro académico.

A mis **padres**, quienes, con su amor, sacrificio y apoyo incondicional, me han acompañado en cada etapa de mi vida, inculcándome los valores de la perseverancia y la dedicación, que hoy me permiten alcanzar esta meta.

Deseo expresar un especial agradecimiento a la **Dra. Erika Guerrero**, quien con su paciencia, orientación y compromiso desempeñó el papel de **asesora científica principal** de este proyecto de tesis. Su guía ha sido fundamental para el desarrollo de esta investigación.

Extiendo mi gratitud al **Instituto Conmemorativo Gorgas**, que me brindó el espacio, los recursos y el entorno científico adecuados para llevar a cabo este trabajo.

A **SENACYT**, por confiar en mi propuesta y otorgarme el financiamiento necesario para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Asimismo, agradezco a **APANAC** por su valioso apoyo en la administración de los fondos, contribuyendo así al éxito de este proceso.

A todos ellos, mi más profundo reconocimiento y gratitud, pues gracias a su apoyo y confianza este trabajo ha sido posible.

# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE IMÁGENES</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>Objetivo general:</b>	<b>4</b>
<b>Objetivos específicos:</b>	<b>4</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
<b>1 El Cáncer de Mama</b>	<b>6</b>
<b>2 Epidemiología</b>	<b>6</b>
2.1 Epidemiología Global	6
2.2 Epidemiología América Latina, el Caribe y Panamá	7
<b>3 Clasificación Molecular en el cáncer de mama</b>	<b>8</b>
<b>4 Subtipos Moleculares Intrínsecos</b>	<b>9</b>
4.1 Subtipo Luminal:	9
4.1.1 Luminal A:	9
4.1.2 Luminal B:	9
4.2 Subtipo HER2 positivo:	10
4.3 Subtipo Triple Negativo/ Basal-like:	11
<b>5 El Cáncer de Mama Triple Negativo</b>	<b>11</b>

5.1	Biología molecular	12
5.2	Subtipos transcriptómicos del TNBC	12
<b>6</b>	<b>Taxanos como Agentes Quimioterapéuticos</b>	<b>13</b>
6.1	Paclitaxel	13
6.2	Docetaxel	13
6.3	Comparación estructural y funcional	14
<b>7</b>	<b>Mecanismos de Resistencia a Taxanos</b>	<b>14</b>
7.1	Mecanismos dependientes del fármaco	14
7.1.1	Bombas de eflujo (ABCB1 y familia ABC)	14
7.2	Mecanismos dependientes de señalización	15
7.3	Mecanismos dependientes del daño en ADN	15
7.4	Plasticidad tumoral y EMT	15
7.5	Heterogeneidad intratumoral	16
<b>8</b>	<b>Líneas celulares</b>	<b>16</b>
8.1	Línea celular MDA-MB-231	16
8.2	Propiedades funcionales y moleculares relevantes para resistencia	16
8.3	Línea celular BJ	17
8.4	Uso complementario de MDA-MB-231 y BJ	17
	<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
<b>1</b>	<b>Cultivo de células</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>Desarrollo De Resistencia Adquirida A Paclitaxel y Docetaxel</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Proliferación Celular</b>	<b>20</b>
3.1	Curva de crecimiento	20
<b>4</b>	<b>Análisis De La Viabilidad Celular</b>	<b>20</b>
4.1	Ensayo de formación de Colonias	21
4.2	Ensayos de MTT	21
<b>5</b>	<b>Análisis Molecular</b>	<b>22</b>
5.1	PCR en matriz (microarrays)	22
5.2	Western blot	24
<b>6</b>	<b>Análisis Estadístico</b>	<b>26</b>
	<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>

<b>A. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>1 Inducción de la Resistencia a Paclitaxel y Docetaxel en Células MDA-MB-231: Patrones Morfológicos y Supervivencia Celular</b>	<b>28</b>
<b>2 Crecimiento y Supervivencia: Células Normales vs Células Cancerígenas tratadas y no tratadas.</b>	<b>28</b>
2.1 Comportamiento proliferativo de las células MDA-MB-231 no tratadas y Células BJ	28
2.2 Efecto de la resistencia adquirida a Docetaxel Y Paclitaxel	29
2.3 Comparación entre las líneas MDA	30
<b>3 Ensayo de formación de colonias: evaluación del potencial clonogénico.</b>	<b>31</b>
<b>4 Impacto de los tiempos de preincubación en la eficacia antiproliferativa y citotóxica de docetaxel y paclitaxel en células mda-mb-231: análisis comparativo en función del tiempo y concentración</b>	<b>33</b>
4.1 Tratamiento con Docetaxel	33
4.1.1 24 h de preincubación	33
4.1.2 72 h de preincubación	34
4.2 Tratamiento con Paclitaxel	35
4.2.1 24 h de preincubación	35
4.2.2 72 h de preincubación	35
<b>5 Análisis de expresión génica en células MDA-MB-231 tratadas con Paclitaxel y Docetaxel: Identificación de genes diferencialmente expresados asociados a resistencia</b>	<b>38</b>
5.1 Análisis de diferencias en la expresión génica	39
5.2 Expresión génica organizada por categorías visuales: gráficas A–F	39
<b>6 Expresión proteica de RELB en células MDA-MB-231 control y tratadas con Paclitaxel y Docetaxel</b>	<b>45</b>
6.1 Patrón de bandas y peso molecular	45
6.2 Control de carga (GAPDH)	45
<b>B. DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>1 Adaptación morfológica y primeros indicios de resistencia frente a taxanos</b>	<b>46</b>

<b>2</b>	<b>Comparación del comportamiento del crecimiento entre células normales, tumorales y resistentes a taxanos en cáncer de mama triple negativo</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>Potencial clonogénico diferencial entre MDA-MB-231 y BJ</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>Influencia del Tiempo de Preincubación y Exposición en la Respuesta de Células MDA-MB-231 a Docetaxel y Paclitaxel</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>Mecanismos Moleculares Diferenciales Inducidos por Taxanos en Cáncer de Mama Triple Negativo</b>	<b>49</b>
5.1	Biomarcador de Resistencia Emergente	49
5.2	Genes con Expresión Novedosa en TNBC	49
5.3	Isoenzimas del Citocromos P450	50
5.4	vía NF- $\kappa$ B	51
5.5	Genes de Reparación del ADN	51
5.6	Genes de resistencia farmacológica	51
5.7	Genes del Ciclo Celular	52
5.8	Genes de Receptores Hormonales y Factores de Crecimiento	52
<b>6</b>	<b>Validación Proteica de RELB y su Contribución a la Resistencia</b>	<b>52</b>
<b>C.</b>	<b>LIMITACIONES</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>		<b>54</b>
<b>A.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>B.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>57</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		<b>58</b>
<b>ANEXOS</b>		<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones Utilizadas por los Agentes Quimioterapéuticos	19
Tabla 2. Lista de genes para el microarrays	23
Tabla 3. Resultado del microarreglo	68

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráficas 1. Dinámica proliferativa de células normales vs. células cancerígenas tratadas y no tratadas.	30
Gráficas 2. Comparación del potencial clonogénico entre MDA-MB-231 y BJ.	32
Gráficas 3. Viabilidad en células MDA-MB-231 tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.	37
Gráficas 4. Citotoxicidad en células MDA-MB-231 tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.	38
Gráficas 5. Genes con mayor diferencia en expresión entre las células MDA-MB-321 Control y las tratadas.	44

## **ÍNDICE DE IMÁGENES**

Ilustración 1. Concentraciones de Paclitaxel y Docetaxel	65
Ilustración 2. Perfil transcriptómico comparativo de genes asociados a resistencia	69

## RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) constituye uno de los subtipos moleculares más agresivos del cáncer de mama, debido a su alta tasa de recurrencia, rápida capacidad de diseminación y marcada tendencia a desarrollar resistencia a quimioterapias como el Paclitaxel (PTX) y el Docetaxel (DOC). Esta problemática representa un reto significativo en América Latina y el Caribe, especialmente en Panamá, donde las estadísticas generales del cáncer de mama reportan una incidencia de 58.2 y una mortalidad de 12.3 por cada 100 000 mujeres, afectando principalmente a mujeres en edades productivas.

Este estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar las vías moleculares asociadas con la resistencia adquirida a taxanos en células de TNBC mediante un modelo *in vitro*. Para ello, se utilizaron células MDA-MB-231 expuestas de manera escalonada a concentraciones crecientes de PTX y DOC hasta alcanzar 130 nM. Una vez establecidas las líneas resistentes, se evaluaron la proliferación, la viabilidad y la citotoxicidad celular, junto con el análisis de la expresión génica mediante un panel de 84 genes y su validación proteica por Western blot.

Los resultados mostraron una proliferación reducida en las células resistentes, siendo este efecto más evidente en las resistentes a DOC. Los ensayos de viabilidad y citotoxicidad revelaron respuestas dependientes de la concentración y del tiempo de preincubación, con patrones no lineales. El análisis molecular evidenció la sobreexpresión de 36 genes relacionados con el metabolismo de taxanos, el transporte de fármacos, la señalización PI3K/Akt y MAPK, y la regulación transcripcional, destacándose ELK1, CYP2C8, AR, ABCB1 y RELB, este último confirmado a nivel proteico.

En conclusión, la exposición prolongada a taxanos induce modificaciones moleculares que promueven la resistencia en células TNBC, aportando una base para estudios orientados a la validación de biomarcadores y al desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas y personalizadas.

## **ABSTRACT**

Triple-negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive subtypes of breast cancer, characterized by high recurrence, metastasis, and the frequent acquisition of resistance to chemotherapeutic agents such as Paclitaxel (PTX) and Docetaxel (DOC). This clinical challenge is particularly relevant in Latin America and the Caribbean, including Panama, where breast cancer incidence and mortality rates remain high, affecting women at younger ages compared to other regions.

This study aimed to identify and characterize the molecular pathways associated with taxane-acquired resistance in TNBC cells using an *in vitro* model. For this purpose, MDA-MB-231 cells were progressively exposed to increasing concentrations of PTX and DOC until resistant sublines were established. Subsequently, cell proliferation, viability, and cytotoxicity were evaluated, along with differential gene expression using a panel of 84 genes and protein validation by Western blot.

The results revealed that PTX- and DOC-resistant cells displayed reduced proliferative capacity compared with control cells, with a more pronounced effect observed in DOC-resistant cells. Viability and cytotoxicity assays indicated concentration- and incubation-dependent responses, showing non-linear patterns. Gene expression analysis identified 36 upregulated genes, with ELK1, CYP2C8, and AR emerging as potential biomarkers of differential resistance to PTX and DOC.

In conclusion, prolonged exposure to taxanes induces molecular alterations that enhance resistance in TNBC cells. These findings provide a solid foundation for future *in vivo* studies and clinical trials aimed at validating the identified biomarkers and developing more effective, personalized therapeutic strategies against triple-negative breast cancer.

## INTRODUCCIÓN

Las limitaciones terapéuticas y la resistencia adaptativa que desarrollan las células tumorales frente a agentes quimioterapéuticos, especialmente los taxanos como el Paclitaxel (PTX) y el Docetaxel (DOC), representan uno de los retos más relevantes de la oncología moderna. A pesar de los avances en biología molecular y del establecimiento de terapias más precisas, el cáncer de mama triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés) continúa siendo un subtipo altamente agresivo, caracterizado por la aparición de resistencia adquirida, lo que conlleva tasas elevadas de recurrencia y metástasis, así como un pronóstico desfavorable (Bray et al., 2018; Sung et al., 2021). Ante este panorama, se vuelve esencial comprender los mecanismos moleculares que sustentan la resistencia, con el fin de fortalecer las estrategias terapéuticas disponibles y promover el desarrollo de tratamientos más eficaces.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y multifactorial, caracterizada por el crecimiento anormal de células epiteliales en el tejido mamario (Harbeck & Gnant, 2017). De acuerdo con los datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2023), constituye la neoplasia más frecuente en mujeres y la segunda neoplasia más frecuente a nivel mundial, después del cáncer de pulmón. En 2022, se estimaron aproximadamente 2.31 millones de nuevos casos y más de 670,000 muertes relacionadas con esta enfermedad. Este panorama epidemiológico refleja la necesidad de desarrollar terapias más efectivas, especialmente frente a subtipos que presentan baja respuesta a los tratamientos convencionales, como es el caso del TNBC.

Dentro de la clasificación molecular del cáncer de mama, el subtipo triple negativo destaca por su comportamiento biológico particularmente agresivo, asociado con elevadas tasas de recurrencia, rápida progresión metastásica y un desfavorable pronóstico en comparación con otros subtipos. La base de esta agresividad radica en la ausencia de expresión de los receptores hormonales de estrógeno (ER) y progesterona (PR), así como en la falta de amplificación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Marra et al., 2020), lo cual limita considerablemente el uso de terapias hormonales o dirigidas contra

dichos receptores. Por esta razón, los tratamientos basados en taxanos como PTX y DOC constituyen uno de los pilares fundamentales de la quimioterapia en TNBC.

La línea celular MDA-MB-231 es un modelo experimental ampliamente utilizado en estudios del TNBC debido a su fenotipo triple negativo (ER-/PR-/HER2-), su alta capacidad invasiva y su comportamiento proliferativo sostenido, que reflejan fielmente las propiedades biológicas y clínicas de este subtipo tumoral. La ausencia de receptores ER y PR explica su falta de respuesta a terapias hormonales como el tamoxifeno, mientras que la carencia de HER2 refleja su falta de respuesta a tratamientos dirigidos con anticuerpos monoclonales como el trastuzumab (Neve et al., 2006; Mohammed et al., 2020). Por lo tanto, la línea MDA-MB-231 representa un modelo ideal para explorar rutas de señalización y mecanismos de resistencia inducidos por taxanos.

Con el propósito de profundizar en la comprensión de la resistencia inducida por taxanos, la presente investigación desarrolló un modelo in vitro mediante la generación y el análisis comparativo de líneas celulares MDA-MB-231 resistentes y no resistentes, utilizando células no tumorales BJ como control biológico. Este enfoque permitió analizar comparativamente los efectos de Paclitaxel y Docetaxel sobre la proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular. A nivel molecular, se emplearon microarreglos RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array enfocados en rutas de resistencia farmacológica, reparación del ADN, ciclo celular, metabolismo y regulación transcripcional. Adicionalmente, se realizó la validación proteica mediante Western blot, empleando GAPDH como control endógeno y RELB como gen diana, con el fin de corroborar los resultados transcriptómicos.

La alta prevalencia del cáncer de mama en Panamá y la ausencia de información detallada sobre el subtipo triple negativo hacen necesario el estudio de los mecanismos que determinan su agresividad y su limitada respuesta a los taxanos, especialmente si se considera que la resistencia adquirida al Paclitaxel y al Docetaxel continúa representando un desafío científico en América Latina y el Caribe. En este contexto, abordar el problema desde un enfoque molecular constituye un avance significativo para la región, ya que la caracterización de las rutas de resistencia en líneas celulares MDA-MB-231 sensibles y resistentes permite generar evidencia experimental sobre las adaptaciones celulares que sustentan estos fenómenos.

Este proyecto se justifica por la necesidad de identificar biomarcadores, proteínas y vías de señalización implicadas en la resistencia a ambos taxanos, lo cual permitirá no solo validar hallazgos moleculares, sino también comprender los mecanismos adaptativos asociados a estos procesos. Dado el impacto del cáncer de mama en la salud pública panameña, los resultados derivados de este modelo experimental contribuirán a reducir la brecha de conocimiento regional sobre el TNBC y a sentar bases científicas para el diseño de estrategias experimentales orientadas al estudio de la respuesta celular al Paclitaxel y al Docetaxel.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de la investigación se describen a continuación:

### **Objetivo general:**

Identificar las vías moleculares asociadas a la resistencia adquirida al Paclitaxel y Docetaxel en el cáncer de mama triple negativo.

### **Objetivos específicos:**

1. Desarrollar líneas celulares resistentes a Paclitaxel y Docetaxel a partir de células MDA-MB-231.
2. Evaluar la proliferación, viabilidad y sensibilidad a de las células a los agentes quimioterapéuticos Paclitaxel y Docetaxel.
3. Identificar y validar las vías moleculares y celulares implicadas en la resistencia a Paclitaxel y Docetaxel.

## **HIPÓTESIS**

La exposición prolongada al Paclitaxel y Docetaxel induce alteraciones en la expresión génica, activando vías de resistencia a taxanos en células de cáncer de mama triple negativo.

# **CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO**

## **1 El Cáncer de Mama**

El cáncer de mama constituye una de las patologías más complejas en oncología, no solo por su elevada incidencia global, sino también por su profunda heterogeneidad biológica y por la influencia de factores genéticos, epigenéticos y microambientales en su desarrollo y progresión, afectando tanto a países desarrollados como a regiones en vías de desarrollo (Bray et al., 2018; Ginsburg, 2021).

Biológicamente, el cáncer de mama representa una enfermedad heterogénea y multifactorial que surge a partir de la transformación maligna de células epiteliales mamarias, inducida por mutaciones genéticas, alteraciones epigenéticas y la activación o inhibición anómala de vías de señalización asociadas con la proliferación, la apoptosis y la reparación del ADN (Polyak, 2011). Su comportamiento clínico altamente variable depende del subtipo molecular, lo que resalta la importancia de una caracterización biológica precisa para orientar el diagnóstico, el pronóstico y las decisiones terapéuticas.

## **2 Epidemiología**

### **2.1 Epidemiología Global**

En 2020 se reportaron aproximadamente 2.26 millones de nuevos casos de cáncer de mama y más de 685 000 muertes; para 2022, la incidencia estimada superó los 2.31 millones de nuevos casos, con alrededor de 670 000 defunciones, lo que lo convirtió en el segundo tipo de cáncer más frecuente después del cáncer de pulmón (IARC, 2023). Las proyecciones indican que una de cada 20 mujeres será diagnosticada con cáncer de mama a lo largo de su vida y que una de cada 70 morirá a causa de esta enfermedad.

Aunque la mayor carga recae en mujeres de 50 años o más, quienes representan el 71 % de los diagnósticos y el 79 % de las muertes, la epidemiología presenta importantes variaciones regionales. En África subsahariana, el 47 % de los casos se diagnostican antes de los 50 años, frente al 18 % en América del Norte y el 19 % en Europa. Estas diferencias reflejan desigualdades asociadas a factores biológicos, ambientales y socioeconómicos, así como a la

limitada disponibilidad de programas de detección temprana y al acceso a tratamientos oportunos (Bray et al., 2018; GBD, 2024).

## 2.2 Epidemiología América Latina, el Caribe y Panamá

En América Latina y el Caribe, el cáncer de mama constituye una carga epidemiológica compleja marcada por un aumento sostenido en la incidencia y una mortalidad que permanece desproporcionadamente elevada. En 2022, la región registró una cuarta parte de los nuevos casos de cáncer en las Américas, con más de 220,000 nuevos casos y cerca de 60,000 muertes, en el contexto de un total de más de 525,000 diagnósticos en las Américas (OPS, 2024).

Uno de los aspectos epidemiológicos más relevantes en la región es la elevada proporción de casos en mujeres menores de 50 años: el 31 % de los diagnósticos ocurre en este grupo etario, en comparación con el 21 % en América del Norte. Esta tendencia se asocia tanto con factores demográficos como con la mayor frecuencia de subtipos tumorales agresivos, particularmente el subtipo triple negativo, el cual presenta una frecuencia elevada en mujeres afrodescendientes, indígenas y mestizas. Este patrón sugiere una interacción entre predisposición genética poblacional, exposiciones ambientales y determinantes estructurales (Anderson et al., 2021; Carey et al., 2006).

Si no se implementan estrategias efectivas de prevención, detección temprana y tratamiento oportuno, se prevé un aumento continuo en la incidencia y mortalidad (OPS, 2021). Además, persisten marcadas desigualdades entre áreas urbanas y rurales, influenciando negativamente los resultados clínicos, especialmente en pacientes con TNBC, cuyo pronóstico tiende a ser más desfavorable (Anderson et al., 2021).

En Panamá, la epidemiología del cáncer de mama refleja un escenario complejo donde interactúan determinantes clínicos, moleculares, socioeconómicos y estructurales. En 2022, el país registró una tasa de mortalidad de 12.3 por cada 100 000 mujeres (MINSa, 2023). Aunque el país cuenta con centros especializados, persisten brechas importantes en la cobertura del tamizaje mamográfico, así como en el acceso equitativo a terapias dirigidas,

inmunoterapias y estudios moleculares avanzados. Estas desigualdades son particularmente marcadas en áreas rurales e indígenas, donde existen limitaciones en la infraestructura diagnóstica, la disponibilidad de personal especializado y el acceso oportuno a tratamientos. Estudios regionales sugieren que la población panameña podría presentar una mayor frecuencia de TNBC, similar a otros países con alto componente afrodescendiente y mestizo (Dietze et al., 2015; Carey et al., 2006). La ausencia de biomarcadores críticos en muchos centros de salud dificulta la aplicación de terapias dirigidas e inmunoterapias, especialmente importantes para TNBC.

### **3 Clasificación Molecular en el cáncer de mama**

La clasificación molecular del cáncer de mama se fundamenta en la evaluación de la expresión de ER, PR y HER2, que funcionan como reguladores maestros dentro de circuitos transcripcionales y epigenéticos que controlan la proliferación celular, el ciclo celular y la plasticidad tumoral. La expresión de ER y PR confiere un fenotipo dependiente de señales hormonales, generalmente asociado con una proliferación más lenta y una mayor sensibilidad a terapias endocrinas. En contraste, la amplificación o sobreexpresión de HER2 genera una activación sostenida de vías como PI3K/AKT y MAPK, lo que impulsa un fenotipo proliferativo más agresivo, aunque sensible a terapias dirigidas específicas (Harbeck & Gnant, 2017).

La incorporación de tecnologías de perfilamiento molecular, como microarreglos, RNA-seq y pruebas multigénicas (por ejemplo, PAM50), permitió definir los subtipos intrínsecos establecidos por Perou y Sørlie: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y basal-like. Estos subtipos representan arquitecturas moleculares diferenciadas, determinadas por firmas transcripcionales relativamente estables que regulan la proliferación, las rutas de señalización, la dinámica de la cromatina, el metabolismo energético y la sensibilidad farmacológica. Esta estratificación molecular constituye la base de la oncología de precisión y orienta el diseño de estrategias terapéuticas, así como la predicción de resistencia en tumores con mayor agresividad biológica (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001).

## 4 Subtipos Moleculares Intrínsecos

Los subtipos intrínsecos del cáncer de mama se definen según la expresión de ER, PR y HER2, además de firmas transcriptómicas como PAM50. Estas clasificaciones reflejan diferencias en proliferación, mecanismos de señalización, remodelación epigenética y sensibilidad a tratamientos específicos (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001).

### 4.1 Subtipo Luminal:

#### 4.1.1 Luminal A:

**Estado de receptores:**

ER: Positivo (+)

PR: Positivo (+)

HER2: Negativo (-)

**Proliferación:**

Ki-67: Bajo (↓)

**Características principales:**

- Alta dependencia del eje hormonal ER/PR.
- Mayor diferenciación celular.
- Excelente respuesta a hormonoterapia.

**Definición científica**

Este subtipo exhibe un epigenoma estructuralmente estable y una firma proteogenómica coherente con baja proliferación celular, sustentada por la fuerte dependencia del eje hormonal, lo que explica su sensibilidad excepcional a terapias endocrinas y su excelente respuesta a intervenciones guiadas por biología molecular (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001; Harbeck & Gnant, 2017).

#### 4.1.2 Luminal B:

**Estado de receptores:**

ER: Positivo (+)

PR: Disminuido / Parcialmente positivo ( $\pm$ )

HER2: Positivo o Negativo ( $\pm$ )

**Proliferación:**

Ki-67: Elevado ( $\uparrow\uparrow$ )

**Características principales:**

- Menor expresión o pérdida parcial de PR.
- Posible sobreexpresión o amplificación de HER2.
- Mayor inestabilidad genómica y plasticidad celular.

**Definición científica**

Este subtipo presenta mayor proliferación, plasticidad epitelial y un perfil transcriptómico agresivo. Suele requerir tratamiento combinado (hormonoterapia + quimioterapia o CDK4/6 inhibitors), especialmente cuando HER2 está amplificado (Prat et al., 2013; Harbeck & Gnant, 2017).

4.2 Subtipo HER2 positivo:

**Estado de receptores:**

HER2: Sobreexpresado (+)

ER: Positivo o Negativo ( $\pm$ )

PR: Positivo o Negativo ( $\pm$ )

**Proliferación:**

Ki-67: Alto ( $\uparrow$ )

**Características principales:**

- Mayor tasa de proliferación (Ki-67).
- Menor expresión o pérdida parcial de PR.
- Posible sobreexpresión o amplificación de HER2.

### **Definición científica**

El subtipo HER2 positivo se define por la amplificación de HER2, responsable de una intensa señalización proliferativa. La introducción de terapias dirigidas como trastuzumab ha transformado significativamente el pronóstico de este subtipo (Slamon et al., 2001).

#### 4.3 Subtipo Triple Negativo/ Basal-like:

##### **Estado de receptores:**

ER: Negativo (-)

PR: Negativo (-)

HER2: Negativo (-)

##### **Proliferación:**

Ki-67: Alto (↑)

##### **Características principales:**

- Carece de receptores terapéuticos
- Alta inestabilidad genómica
- Activación de rutas inflamatorias
- Mayor plasticidad celular
- Alta prevalencia en mujeres jóvenes y afrodescendientes

### **Definición científica**

El subtipo TNBC carece de ER, PR y HER2. Esto limita opciones terapéuticas dirigidas y lo convierte en el subtipo más agresivo, con dependencias en quimioterapia e inmunoterapia selectiva (Bianchini et al., 2016).

## **5 El Cáncer de Mama Triple Negativo**

El TNBC constituye un subgrupo molecular cuyo fenotipo se define por la ausencia de ER, PR y HER2, acompañado de una reprogramación transcripcional y epigenómica que impulsa proliferación acelerada, plasticidad fenotípica y elevada inestabilidad genómica. Representa entre el 15 % y el 20 % de los casos de cáncer de mama y agrupa tumores con firmas basal-

like, inmunomoduladas, mesenquimales y enriquecidas en reparación del ADN, según clasificaciones transcriptómicas modernas (Fragomeni et al., 2018; Bianchini et al., 2016).

### 5.1 Biología molecular

A nivel molecular, el TNBC se caracteriza por una arquitectura genómica profundamente inestable, enriquecida en mutaciones somáticas, alteraciones estructurales y defectos en la vía de recombinación homóloga, especialmente asociados con la pérdida funcional de BRCA1/2 y de genes relacionados con la reparación del ADN. Esta deficiencia, junto con la activación de rutas proliferativas (EGFR/MAPK), antiapoptóticas (PI3K/AKT/mTOR) e inflamatorias (NF- $\kappa$ B, JAK/STAT), impulsa una proliferación acelerada, evasión inmunitaria y remodelación tumoral. El TNBC también exhibe un programa activo de transición epitelial-mesenquimal (EMT), dirigido por ZEB1, SNAIL y TWIST1, que contribuye a la invasividad, la metástasis y la resistencia a la quimioterapia (Marra et al., 2020).

### 5.2 Subtipos transcriptómicos del TNBC

Los avances transcriptómicos han permitido subdividir el TNBC en categorías biológicas específicas (Lehmann et al., 2011):

- Basal-like 1 (BL1): enriquecido en genes de proliferación, replicación y reparación del ADN.
- Basal-like 2 (BL2): dependiente de EGFR, metabolismo glicolítico y vías de crecimiento.
- Inmunomodulado (IM): predominio de respuesta inmune adaptativa e innata; potencial sensibilidad a inmunoterapia.
- Mesenquimal (M) y Mesenquimal Stem-Like (MSL): EMT activa, remodelación de matriz, señalización TGF- $\beta$ /Wnt.
- Luminal Androgen Receptor (LAR): expresión elevada de AR, metabolismo lipídico y firma luminal alternativa.

## 6 Taxanos como Agentes Quimioterapéuticos

Los taxanos, particularmente Paclitaxel y Docetaxel, constituyen el pilar terapéutico en el manejo del TNBC debido a su alta efectividad en la interrupción de la mitosis. Ambos compuestos actúan como moduladores del citoesqueleto mediante su unión al sitio taxano de la  $\beta$ -tubulina, estabilizando los microtúbulos e impidiendo su despolimerización, un proceso fundamental para la dinámica del huso mitótico. Esta estabilización aberrante activa el punto de control del huso mitótico (SAC), evita la degradación de ciclina B1 y conduce a la detención del ciclo celular en G2/M, seguida de apoptosis (Hansen et al., 2015; Murray et al., 2012).

### 6.1 Paclitaxel

Paclitaxel es un taxano de origen natural derivado del árbol tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 1992 para el tratamiento del cáncer de ovario y, posteriormente, para el cáncer de mama. A nivel molecular, promueve la polimerización de microtúbulos y estabiliza estructuras rígidas que detienen la división celular. Asimismo, activa rutas dependientes de p53, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibe proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y produce daño mitocondrial acumulativo (Riedel et al., 2008).

### 6.2 Docetaxel

Docetaxel es un análogo semisintético del Paclitaxel derivado de las hojas del tejo europeo (*Taxus baccata*), perteneciente también al grupo de los taxanos tetracíclicos diterpenoides. Fue aprobado por la FDA en 1996 para el cáncer de mama metastásico. Sus sustituciones químicas aumentan la afinidad por la  $\beta$ -tubulina y confieren una estabilización más rígida y sostenida de los microtúbulos, lo que permite inducir una detención mitótica más marcada. Su metabolismo mediado por CYP3A4 otorga un perfil farmacocinético distinto y posibilita la administración de dosis más altas en comparación con Paclitaxel (Holmes et al., 1996; Krebs et al., 2018).

### 6.3 Comparación estructural y funcional

Desde el punto de vista químico, Paclitaxel y Docetaxel comparten el núcleo taxano tetracíclico, pero difieren en grupos funcionales clave que modifican su solubilidad y afinidad por la  $\beta$ -tubulina. El grupo benzamida único de Paclitaxel le confiere un perfil de polimerización microtubular más progresivo, mientras que el grupo tert-butoxi de Docetaxel incrementa la afinidad por el sitio taxano, produciendo estructuras microtubulares más densas y rígidas. Funcionalmente, Paclitaxel presenta actividad secundaria relacionada con estrés oxidativo, mientras que Docetaxel induce una detención mitótica más marcada y apoptosis más rápida en líneas altamente proliferativas (Krebs et al., 2018; Jordan & Wilson, 2004).

## 7 Mecanismos de Resistencia a Taxanos

La resistencia a taxanos en TNBC emerge como consecuencia de una red de adaptaciones moleculares coordinadas que permiten a las células evadir la detención mitótica inducida por Paclitaxel y Docetaxel. Esta red integra alteraciones en transportadores de membrana, remodelación del citoesqueleto, reprogramación metabólica, plasticidad epitelial-mesenquimal, mecanismos de reparación del ADN y cambios epigenéticos, configurando un fenotipo altamente resiliente frente a la quimioterapia (Bhattacharya et al., 2014; Foulkes et al., 2014).

### 7.1 Mecanismos dependientes del fármaco

#### 7.1.1 Bombas de eflujo (ABCB1 y familia ABC)

El aumento en la expresión de ABCB1, ABCG2 y ABCC1 disminuye la disponibilidad intracelular del taxano. ABCB1 es inducido por NF- $\kappa$ B y HIF-1 $\alpha$ , que responden al estrés tumoral y a la hipoxia, potenciando resistencia en microambientes desfavorables (Hansen et al., 2015).

#### 7.1.2 Alteraciones en microtúbulos y tubulina

La expresión diferencial de isoformas de tubulina, la presencia de TUBB3 y la modulación de proteínas asociadas a microtúbulos pueden alterar el ensamblaje y desensamblaje del

citoesqueleto, de forma que el efecto estabilizador del taxano resulte menos letal. Estas modificaciones permiten que las células progresen a través de la mitosis aun con una interferencia parcial en el huso mitótico (Murray et al., 2012; Marra et al., 2020).

## 7.2 Mecanismos dependientes de señalización

### 7.2.1 PI3K/AKT y MAPK

Las rutas de señalización PI3K/AKT y MAPK se activan frecuentemente en TNBC resistente a taxanos. La vía PI3K/AKT favorece la supervivencia al inhibir componentes proapoptóticos y mantener la síntesis proteica y metabólica. Por su parte, la vía MAPK (ERK1/2) contribuye a reactivar la proliferación incluso tras un arresto mitótico transitorio. En conjunto, estas rutas disminuyen la probabilidad de que el daño inducido por taxanos se traduzca en apoptosis irreversible (Diana et al., 2020; Shaheen et al., 2018).

### 7.2.2 Rutas antiapoptóticas

La resistencia también implica inhibición de mecanismos apoptóticos mediante sobreexpresión de BCL-2, XIAP y otros reguladores que bloquean la muerte celular programada inducida por taxanos (Bhattacharya et al., 2014).

## 7.3 Mecanismos dependientes del daño en ADN

El aumento de la reparación del daño en el ADN, especialmente mediante proteínas como BRCA1/2 y RAD51, permite que las células reparen lesiones inducidas indirectamente por taxanos, mejorando su capacidad para evadir la apoptosis (Riedel et al., 2008; Marra et al., 2020).

## 7.4 Plasticidad tumoral y EMT

La transición epitelial-mesenquimal (EMT) es uno de los mecanismos más consistentes asociados con resistencia. Factores como ZEB1, TWIST1 y SNAIL reprograman la célula hacia un fenotipo mesenquimal caracterizado por motilidad, resistencia a apoptosis y baja dependencia del huso mitótico. Las células en EMT presentan una mayor tolerancia al daño estructural inducido por taxanos (Bai et al., 2021).

## 7.5 Heterogeneidad intratumoral

El TNBC posee alta diversidad clonal. Las subpoblaciones de células madre tumorales (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) muestran mayor capacidad para sobrevivir a quimioterapia y regenerar el tumor post-tratamiento. Su metabolismo, señalización y dinámica del ciclo celular las hacen particularmente insensibles a la detención mitótica inducida por taxanos (Marra et al., 2020).

## 8 Líneas celulares

### 8.1 Línea celular MDA-MB-231

La línea MDA-MB-231, derivada de un carcinoma mamario metastásico pleural, constituye uno de los modelos experimentales más robustos en investigaciones sobre TNBC, debido a su clasificación basal-like y a su fenotipo altamente agresivo. Carece de ER, PR y HER2, lo que replica de manera fiel la biología del TNBC. Su morfología fibroblastoide y su elevada capacidad de migración e invasión la posicionan como un modelo adecuado para estudiar fenómenos asociados a metástasis y resistencia terapéutica (Holliday & Speirs, 2011).

### 8.2 Propiedades funcionales y moleculares relevantes para resistencia

MDA-MB-231 es una línea altamente útil para investigar la resistencia a taxanos, debido a su combinación de plasticidad fenotípica, inestabilidad genómica y activación de rutas de supervivencia. Presenta una elevada expresión de marcadores mesenquimales como vimentina, N-cadherina y ZEB1, los cuales facilitan la transición epitelial-mesenquimal (EMT), un proceso directamente relacionado con resistencia a taxanos (Marra et al., 2020).

Además, expresa niveles altos de TUBB3, una isoforma de  $\beta$ -tubulina asociada con una afinidad reducida para Paclitaxel y Docetaxel. También muestra sobreexpresión de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), así como de transportadores de fármacos como ABCB1, que disminuyen la concentración intracelular de taxanos (Hansen et al., 2015). Todo ello confiere un microambiente molecular favorable a la resistencia adquirida.

### 8.3 Línea celular BJ

La línea BJ representa un modelo transcriptómicamente estable con mínima variabilidad epigenética, ausencia controlada de mutaciones y regulación estricta del ciclo celular. Su estabilidad contrasta con la naturaleza evolutivamente flexible de MDA-MB-231, por lo que funciona como ancla biológica para interpretar alteraciones inducidas por taxanos. Al no presentar EMT activa, rutas inflamatorias activadas ni mutaciones en TP53, BJ permite discriminar toxicidad basal de los mecanismos de resistencia específicos del TNBC (ATCC, 2024).

### 8.4 Uso complementario de MDA-MB-231 y BJ

El uso conjunto de MDA-MB-231 y BJ permite diferenciar efectos específicos del TNBC frente a respuestas celulares universales. Mientras MDA-MB-231 representa un modelo agresivo y altamente adaptable al tratamiento, BJ proporciona una referencia para evaluar citotoxicidad basal, sensibilidad diferencial y mecanismos selectivos de resistencia. Esta estrategia experimental fortalece la interpretación de los resultados y aumenta la validez biológica de los hallazgos (Harbeck & Gnant, 2017).

# **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1 Cultivo de células

Las líneas celulares MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), representativas del fenotipo TNBC, y la línea control no tumoral BJ (RRID: CVCL\_3653) fueron cultivadas en DMEM High Glucose (Multicell™), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS; Gibco™) y 1 % de penicilina-estreptomicina (Gibco™). Ambas líneas se mantuvieron en condiciones controladas (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad) en placas de cultivo de 6 y 10 cm.

Antes de cada pasaje, las células fueron lavadas con DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; Gibco™) para eliminar residuos de suero y favorecer un desprendimiento uniforme. Posteriormente, se aplicó tripsina-EDTA 0.5 mM (Gibco™) para disociar las células cuando la confluencia alcanzaba entre 85 % y 95 %, asegurando la preservación de la morfología fibroblastoide característica de MDA-MB-231 y del fenotipo estable de BJ. La línea BJ se empleó como control no tumoral debido a su estabilidad transcriptómica y genómica, proporcionando un marco de referencia para distinguir efectos específicos del fenotipo TNBC frente a respuestas celulares universales.

## 2 Desarrollo De Resistencia Adquirida A Paclitaxel y Docetaxel

Para generar resistencia adquirida, las células MDA-MB-231 fueron expuestas de manera progresiva a concentraciones crecientes de Paclitaxel y Docetaxel. El tratamiento comenzó con una concentración de 1 nM, incrementándose 1.5 veces cada 7 a 10 días hasta llegar a la concentración final de 130 nM (0). El medio con el fármaco se reemplazó cada 2–3 días y se mantuvo un seguimiento continuo de la viabilidad, confluencia y morfología.

*Tabla 1. Concentraciones Utilizadas por los Agentes Quimioterapéuticos*

Niveles de Concentración	de nM	μL en plato de (60mm)	μL en plato de (100mm)
1	1	5.0	10.0
2	1.50	7.5	15.0
3	2.25	11.3	22.5

<b>4</b>	3.38	16.9	33.8
<b>5</b>	5.06	25.3	50.6
<b>6</b>	7.59	38.0	75.9
<b>7</b>	11.39	57.0	113.9
<b>8</b>	17.09	85.4	170.9
<b>9</b>	25.63	128.1	256.3
<b>10</b>	38.44	192.2	384.4
<b>11</b>	57.67	288.3	576.7
<b>12</b>	86.50	432.5	865.0
<b>13</b>	129.75	648.7	1297.5

*Nota.* Las concentraciones utilizadas de Paclitaxel y Docetaxel en nanomolar (nM) y su respectiva equivalencia en microlitros ( $\mu\text{L}$ ) para placas de cultivo celular de 60 mm y 100 mm. A partir de una concentración inicial de 1MM de las Drogas.

### **3 Proliferación Celular**

La proliferación celular se determinó mediante la construcción de una curva de crecimiento, que permitió caracterizar la cinética proliferativa de las células TNBC no tratadas y de las líneas resistentes (PTX y DOC), en comparación con la línea fibroblástica BJ.

#### **3.1 Curva de crecimiento**

Se sembraron 2,000 células/pocillo en placas de 24 pocillos (500  $\mu\text{L}$ ), manteniendo una densidad inicial homogénea para minimizar efectos de contacto célula. Se realizaron recuentos celulares en seis tiempos experimentales (días 2, 3, 4, 6, 8 y 10). Para cada punto temporal, los pocillos correspondientes fueron disociados y las células se cuantificaron manualmente utilizando un hemocitómetro/cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico Leica, manteniendo condiciones estériles durante todo el procedimiento. Todas las mediciones se realizaron en tetrarréplica ( $n = 4$ ).

### **4 Análisis De La Viabilidad Celular**

La evaluación funcional de la viabilidad y citotoxicidad celular se llevó a cabo mediante dos ensayos complementarios. El ensayo de formación de colonias permitió determinar la

capacidad proliferativa a largo plazo en células MDA-MB-231 sensibles y BJ. El ensayo MTT permitió cuantificar la viabilidad metabólica y la citotoxicidad en células sensibles y en células con resistencia PTX y DOC, bajo distintas concentraciones y tiempos de exposición.

#### 4.1 Ensayo de formación de Colonias

El ensayo se realizó en las líneas MDA-MB-231 sensibles y BJ con el objetivo de evaluar su capacidad proliferativa basal. Ambas líneas fueron cultivadas previamente en placas de 10 cm, lavadas con DPBS y disociadas con tripsina-EDTA. Tras neutralización con DMEM fresco (3:1), las suspensiones celulares se transfirieron a tubos de 15 mL y se realizó un conteo estandarizado mediante hemocitómetro para asegurar la siembra precisa.

Se sembraron 500, 250 y 150 células por pocillo en placas de 6 pocillos, distribuyendo tres pocillos para BJ y tres para MDA-MB-231. Las placas se incubaron durante 7 días bajo condiciones estándar.

Transcurrido el tiempo de crecimiento, se retiró el medio y las células se lavaron con DPBS. Las colonias se fijaron con paraaldehído al 4 % durante 15–25 minutos y luego se lavaron nuevamente con DPBS. La tinción se realizó añadiendo 30  $\mu$ L de violeta cristal, permitiendo su acción entre 5 minutos y 1 hora. Las placas se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar toda la noche. Finalmente, las colonias fueron cuantificadas manualmente mediante microscopio Leica (Leica Suite v4), considerando únicamente aquellas formadas por grupos celulares distinguibles.

#### 4.2 Ensayos de MTT

El ensayo MTT se realizó para evaluar la viabilidad y la citotoxicidad en células MDA-MB-231 sensibles y resistentes a PTX y DOC. Las células fueron previamente cultivadas en placas de 6 y 10 cm fueron lavadas con DPBS y disociadas con tripsina-EDTA. Tras neutralización con DMEM fresco (3:1), las suspensiones celulares se transfirieron a tubos de 50 mL.

Posteriormente, se efectuó un conteo celular para ajustar la densidad deseada, obteniendo una concentración aproximada de 288 000 células/mL. De esta suspensión se sembraron 200  $\mu$ L por pocillo en placas de 96 pocillos, asegurando una distribución homogénea.

Las células se sometieron a dos periodos de preincubación, 24 y 72 h, con el fin de permitir su adhesión y evaluar la sensibilidad basal antes del tratamiento. Cumplidos los tiempos de preincubación, se retiró el medio y los pocillos se distribuyeron en distintos grupos experimentales.

Posteriormente, se aplicaron concentraciones crecientes de PTX y DOC: 0, 100, 130, 150, 200, 250 y 300 nM, incubando las células durante 72, 96 y 120 h. Transcurrido el tiempo de exposición, se retiró el medio y se añadieron 30  $\mu$ L de solución de MTT preparada en DMEM, incubándose por 4 h para permitir la formación de cristales de formazán.

Finalizada la incubación, la solución de MTT se retiró y los cristales se disolvieron con 50  $\mu$ L de DMSO (Sigma-Aldrich™). La absorbancia se registró a 570 nm en un lector de microplacas tipo ELISA. La viabilidad celular se calculó como porcentaje relativo respecto a los controles sin tratamiento, permitiendo evaluar cambios en la actividad metabólica asociados a resistencia o sensibilidad a los taxanos.

## **5 Análisis Molecular**

Los estudios moleculares se realizaron empleando células MDA-MB-231 sensibles y células resistentes estabilizadas en la concentración final de inducción (130 nM de PTX y DOC), consideradas representativas del fenotipo resistente plenamente adquirido. Se integraron aproximaciones transcriptómicas dirigidas (PCR array) y validación proteica (Western blot).

### **5.1 PCR en matriz (microarrays)**

Las células MDA-MB-231 resistentes y no resistentes fueron lavadas con DPBS y recolectadas mediante tripsina e incubadas a 37 °C durante 5 minutos para facilitar su

desprendimiento. Posteriormente, se resuspendieron en DMEM y se centrifugaron a 300 rpm por 5 minutos, obteniendo el pellet destinado a la extracción de ARN.

El ARN total se extrajo utilizando un kit comercial de extracción de ARN (PureLink™ RNA Mini Kit; Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la extracción, se evaluaron la concentración y pureza del ARN mediante espectrofotometría. El ARN purificado se sometió a síntesis de ADNc utilizando el sistema de transcriptasa inversa SuperScript™ (Invitrogen™), y las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

El ADNc obtenido se diluyó a la concentración recomendada y se mezcló con el master mix correspondiente para el panel RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array: Human Cancer Drug Resistance (Qiagen™), el cual incluye 84 genes asociados a resistencia a fármacos, cinco genes de mantenimiento y controles internos para ADN genómico, transcripción inversa y PCR (Tabla 2). Posteriormente, se distribuyó cuidadosamente en la placa de 96 pocillos preconfigurada y se selló con una lámina adhesiva para evitar evaporación durante la amplificación.

Las placas se colocaron en un termociclador compatible con RT<sup>2</sup> Profiler™ Array y se sometieron al programa de amplificación indicado por el fabricante. Finalizado el ciclo, la fluorescencia de cada pocillo se cuantificó mediante un lector de placas de PCR. Los valores Ct obtenidos se analizaron utilizando el software GeneGlobe®, generando los perfiles diferenciales de expresión génica asociados con la resistencia adquirida a Paclitaxel y Docetaxel.

**Tabla 2. Lista de genes para el microarrays**

Cebadores	Genes
<b>Resistencia a los medicamentos</b>	ABCB1 (MDR1, PGY1), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2, cMOAT), ABCC3 (MRP3, MOAT-D), ABCC5 (MRP5), ABCG2 (BCRP), BAX, BCL2, BCL2L1 (BCLXL), BCL2L1 (BCLXL), BCL2L1 (BCLXL), MVP (LRP), RB1, TOP1, TOP2A, TOP2B, TP53 (p53)

<b>Enzimas de metabolización</b>	ARNT, BLMH, CLPTM1L, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, DHFR, EPHX1, GSK3A, GSTP1, NAT2, SOD1, SULT1E1, TPMT, UGCG
<b>Daños y reparación del ADN</b>	APC, ATM, BRCA1, BRCA2, ERCC3 (XPB), MSH2, XPA, XPC
<b>Ciclo celular</b>	CCND1, CCNE1, CDK2, CDK4, CDKN1A (p21CIP1, WAF1), CDKN1B (P27KIP1), CDKN2A (P16INK4A), CDKN2D (p19-INK4D)
<b>Receptores de factores de crecimiento</b>	EGFR (ERBB1), ERBB2 (HER-2, NEU), ERBB3, ERBB4, FGF2 (BFGF), IGF1R, IGF2R, MET
<b>Receptores hormonales</b>	AR, ESR1 (ER $\alpha$ ), ESR2 (ER $\beta$ ), PPARA, PPARG, RARA, RARB, RARG, RXRA, RXRB
<b>Factores de transcripción</b>	AHR, AP1S1, ELK1, FOS, HIF1A, MYC, NFKB1, NFKB2, NFKBIB (TRIP9), NFKBIE, RELB, TNFRSF11A (RANK)

*Nota.* Panel funcional de genes incluidos en el microarreglo, organizados por categoría biológica.

## 5.2 Western blot

Las células MDA-MB-231 sensibles y resistentes fueron procesadas para extracción proteica mediante tampón RIPA, con el fin de recuperar la fracción proteica soluble relevante para los perfiles de resistencia a taxanos. Tras remover el medio, los platos se lavaron con DPBS frío y las células se desprendieron mediante raspado en sentido de las manecillas del reloj hasta lograr su desprendimiento completo.

El pellet obtenido tras centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos se incubó con 200  $\mu$ L de RIPA frío durante 30 minutos, realizando vortex en intervalos de 5 minutos, repitiendo el proceso 10 veces. Posteriormente, se centrifugó a 4°C a 12,000-14,000 RPM durante 20 minutos, conservando el sobrenadante a -80°C.

La cuantificación de proteínas se efectuó mediante un ensayo colorimétrico estandarizado. Las muestras se prepararon con tampón Laemmli 4x + DTT (3:1), se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos, se centrifugaron brevemente y se mantuvieron en hielo previo al análisis.

Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE. Se cargaron 3–5 µL del marcador de peso molecular y 20 µL de cada muestra. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con una solución de leche al 5% preparada en TBS-T 1× durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación constante.

Posteriormente, se incubaron con la solución de bloqueo al 1% conteniendo los anticuerpos primarios RELB y GAPDH (Tabla 2), manteniéndose en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T 1× durante 10 minutos cada una.

La incubación con los anticuerpos secundarios conjugados a HRP se realizó durante 1–2 horas en solución de bloqueo. Se utilizó el anticuerpo secundario anti-ratón para RELB y anti-conejo para GAPDH, siguiendo las diluciones recomendadas. Luego, las membranas se lavaron nuevamente (3×10 min en TBS-T).

El revelado se efectuó utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Scientific), preparado en proporción 1:1 e incubado sobre la membrana durante 3 minutos. Previo a la adquisición de la señal, se marcaron las membranas utilizando WesternSure®.

La detección se realizó mediante el sistema Image Studio LI-COR, obteniendo imágenes digitalizadas de las bandas proteicas. El análisis densitométrico y cuantificación relativa se llevaron a cabo con el software ImageJ, normalizando los valores de intensidad respecto al control interno GAPDH.

## **6 Análisis Estadístico**

Para garantizar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados, todos los procedimientos experimentales de este proyecto se llevaron a cabo por triplicado. Este enfoque aseguró la consistencia de los datos y permitió una evaluación adecuada de la variabilidad experimental.

# **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **A. RESULTADOS**

### **1 Inducción de la Resistencia a Paclitaxel y Docetaxel en Células MDA-MB-231: Patrones Morfológicos y Supervivencia Celular**

Las sublíneas resistentes a PTX y DOC se generaron mediante un incremento escalonado de la concentración hasta 130 nM. A lo largo del proceso se evidenció una respuesta morfológica dependiente de la dosis, que inició con una reducción progresiva de la densidad celular y un aumento de células redondeadas, seguida de la formación de vacuolas citoplasmáticas (Ilustración 1).

En condiciones no tratadas, la línea MDA-MB-231 presentó una morfología alargada y una distribución uniforme. Sin embargo, a partir de concentraciones de 5.06 nM en PTX y 7.59 nM en DOC, se detectaron aumentos en el tamaño celular y una disminución de la adherencia.

En concentraciones superiores, especialmente desde 17.09 nM, la población mostró una disminución marcada de la densidad, heterogeneidad morfológica y predominio de células esféricas, consistentes con un deterioro estructural inducido bajo exposición continua a taxanos.

### **2 Crecimiento y Supervivencia: Células Normales vs Células Cancerígenas tratadas y no tratadas.**

#### **2.1 Comportamiento proliferativo de las células MDA-MB-231 no tratadas y Células BJ**

Los resultados mostraron que las células MDA-MB-231 (MDA, línea violeta) presentaron una proliferación más acelerada que las células BJ (BJ, línea azul) (Gráfica 1). Durante los días 0–2, ambas líneas permanecieron en la fase de latencia, con incrementos mínimos asociados al periodo de adaptación. A partir del día 3, las MDA-MB-231 ingresaron en la fase exponencial, mientras que las BJ continuaron con un aumento más lento.

En el día 4, las MDA-MB-231 alcanzaron una aceleración marcada dentro de la fase exponencial, mientras que las BJ recién iniciaron su transición hacia esta fase. Para el día 6,

las MDA-MB-231 mostraron una desaceleración característica de la fase estacionaria, mientras que las BJ mantuvieron un aumento progresivo, aunque con una magnitud considerablemente menor.

Para el día 8, las MDA-MB-231 alcanzaron su pico máximo de proliferación, mientras que las BJ se encontraban hacia el final de su fase exponencial. Finalmente, entre los días 8–10, las MDA-MB-231 entraron en una fase de declive pronunciada, en contraste con las células BJ, que presentaron un descenso más leve y gradual en su número celular.

## 2.2 Efecto de la resistencia adquirida a Docetaxel Y Paclitaxel

En contraste con el grupo control (MDA), las células tratadas con 130 nM de Docetaxel (MDA+DOC, línea morada) y con 130 nM de Paclitaxel (MDA+PTX, línea naranja) mostraron patrones de proliferación diferenciados a lo largo del tiempo (Gráfica 1). Aunque ambas sublíneas comenzaron con la misma densidad celular, las células expuestas a Docetaxel mostraron el fenotipo más comprometido.

Para el día 2, las curvas comenzaron a divergir: las células MDA+DOC mostraron una ligera disminución, mientras que las MDA+PTX continuaron incrementando su número celular dentro de una fase de latencia tardía.

En el día 3, las células MDA+DOC alcanzaron su pico máximo, indicando la finalización de su fase exponencial, seguida de un rápido freno proliferativo. En contraste, las MDA+PTX continuaron en crecimiento activo.

Entre los días 3–4, las MDA+DOC ingresaron en una fase estacionaria, manteniendo un número celular estable, mientras que las MDA+PTX continuaron aumentando, aunque con una velocidad ligeramente menor que la observada entre los días 2 y 3.

Entre los días 4–6, las MDA+DOC progresaron hacia una fase de declive, presentando valores por debajo de su punto inicial. Por el contrario, las MDA+PTX mantuvieron su crecimiento y alcanzaron su pico máximo en el día 6.

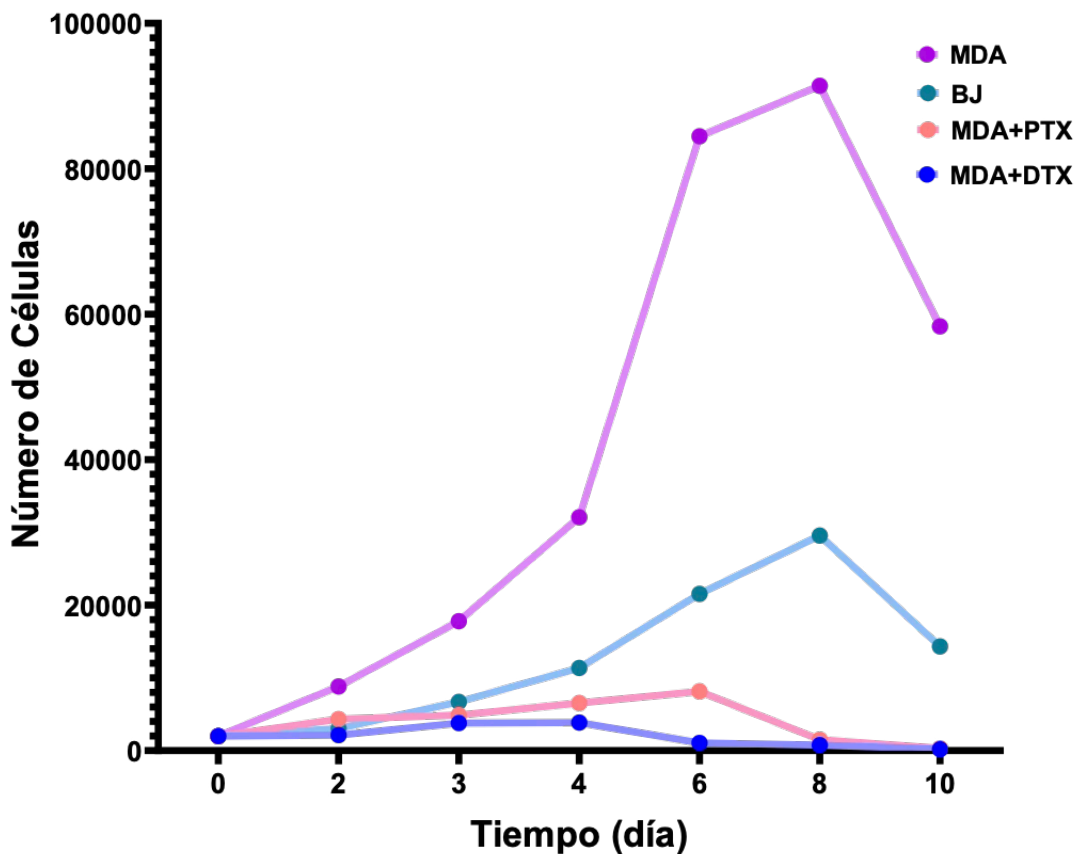
A partir de los días 6–8, las MDA+PTX entraron igualmente en una fase de declive. Finalmente, para el día 10, ambos grupos permanecieron en declive, aunque de manera menos pronunciada en comparación con los días inmediatamente previos.

### 2.3 Comparación entre las líneas MDA

Las tres líneas evaluadas mostraron patrones proliferativos diferenciados a lo largo del experimento. La línea control alcanzó el mayor nivel de crecimiento, con un incremento progresivo hasta el día 8. En contraste, ninguna de las líneas resistentes igualó este comportamiento.

La sublínea resistente a Paclitaxel mantuvo un crecimiento sostenido hasta el día 6, lo que indicó que la adaptación a este fármaco permitió preservar parcialmente la progresión mitótica. En contraste, la sublínea resistente a Docetaxel mantuvo valores casi constantes durante todo el experimento, reflejando una proliferación severamente limitada desde etapas tempranas. Estos resultados reflejaron una clara disminución en la capacidad proliferativa asociada a la adquisición de resistencia en ambas líneas tratadas.

***Gráficas 1. Dinámica proliferativa de células normales vs. células cancerígenas tratadas y no tratadas.***



**Nota.** Número de células en función del tiempo (días 0–10) para células MDA-MB-231 sin tratamiento (línea violeta), células BJ (línea azul), células MDA-MB-231 tratadas con 130 nM de paclitaxel (MDA+PTX, línea naranja) y células MDA-MB-231 tratadas con 130 nM de docetaxel (MDA+DOC, línea morada).

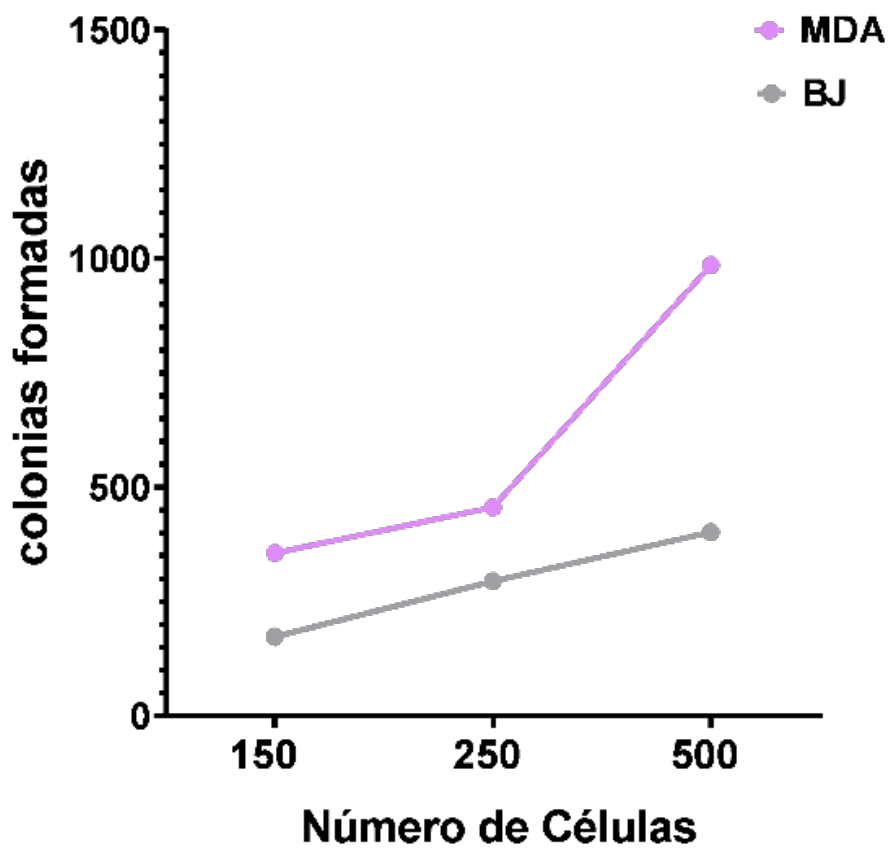
### 3 Ensayo de formación de colonias: evaluación del potencial clonogénico.

Los resultados mostraron que la línea celular MDA-MB-231 tuvo una mayor capacidad para formar colonias (Gráfica 2), evidenciada por un número superior de estructuras clonales y por colonias de mayor tamaño. En contraste, las células BJ generaron menos colonias, pequeñas y dispersas, lo que reflejó una menor capacidad proliferativa y de supervivencia bajo las condiciones del ensayo.

Las colonias derivadas de MDA-MB-231 se distribuyeron de manera más densa en la placa, lo que coincidió con su mayor agresividad y rápida duplicación celular. Por el contrario, las células BJ mostraron una distribución más separada y de baja densidad, consistente con

su crecimiento regulado y no tumoral, lo que limitó su eficiencia para formar colonias en comparación con las células cancerosas.

*Gráficas 2. Comparación del potencial clonogénico entre MDA-MB-231 y BJ.*



*Nota.* Colonias formadas por células MDA-MB-231 (línea rosada) y BJ (línea gris) según la cantidad inicial de células sembradas.

#### **4 Impacto de los tiempos de preincubación en la eficacia antiproliferativa y citotóxica de docetaxel y paclitaxel en células mda-mb-231: análisis comparativo en función del tiempo y concentración**

Los gráficos presentados ilustraron los efectos de DOC y PTX sobre la línea celular MDA-MB-231, evaluados mediante ensayos de viabilidad (Gráficas 3) y citotoxicidad (Gráficas 4). Las células fueron analizadas tras preincubaciones de 24 h (paneles A y C) o 72 h (paneles B y D), con exposiciones prolongadas de 72 h (rosado), 96 h (gris) y 120 h (azul).

##### **4.1 Tratamiento con Docetaxel**

###### **4.1.1 24 h de preincubación**

###### **Viabilidad (Gráfica 4A):**

La viabilidad máxima se registró en 250 nM y 120 h de exposición, mientras que la mínima se observó en 100 nM y 96 h.

- **72 h:** Se observó una disminución progresiva de la viabilidad con respecto al control. La viabilidad se redujo aproximadamente un 60–65 % en concentraciones de 100–130 nM. En el rango de 150–250 nM, la viabilidad disminuyó aún más. Sin embargo, a 300 nM se detectó un leve incremento que no alcanzó los niveles iniciales.
- **96 h:** La reducción de las células con respecto al control fue más marcada al inicio, en comparación con las 72 h. La viabilidad fue inferior al 70–75 % desde 100 nM y se mantuvo reducida en la mayoría de las concentraciones, excepto en 200 nM y 300 nM, que presentaron una viabilidad alrededor del 32–38 %.
- **120 h:** Se observó que la viabilidad cayó 60–65 %, al igual que a 72 h, con respecto al control en 100 nM. No obstante, se observó una disminución en 130 nM y 150 nM. En las concentraciones siguientes, la viabilidad aumentó y alcanzó el punto más alto de la gráfica en 250 nM; en la última concentración se registró una nueva disminución.

###### **Citotoxicidad (Gráfica 5A):**

- **72 h:** Los valores oscilaron entre 65–78 %.
- **96 h:** Se registró el rango más amplio, entre 65–80 %.
- **120 h:** Los valores oscilaron entre 62–78 %.

#### 4.1.2 72 h de preincubación

##### **Viabilidad (Gráfica 4B):**

La viabilidad máxima se registró en 100 nM y 96 h de exposición, mientras que la mínima se alcanzó en 300 nM y 72 h.

- **72 h:** La viabilidad disminuyó aproximadamente 60–65 % respecto al control, con una reducción más pronunciada con el aumento de la concentración.
- **96 h:** Fue el tiempo de exposición con mayor viabilidad general, manteniéndose por encima del 50% en casi todas las concentraciones, excepto en 130 nM y 150 nM.
- **120 h:** La viabilidad celular fue menor a la registrada en los otros tiempos, con una reducción del 80–85 % respecto al control. Las concentraciones iniciales (100–130 nM) mostraron los valores más bajos de viabilidad; a partir de 150 nM, la viabilidad aumentó significativamente y alcanzó su punto máximo en 150 nM.

##### **Citotoxicidad (Gráfica 5B):**

- **72 h:** se registró el rango más amplio, entre 78–90 %.
- **96 h:** Los valores oscilaron entre 45–70 %.
- **120 h:** Los valores oscilaron entre 58–85 %.

##### **Comparación 4A vs. 4B:**

Las células preincubadas por 72 h (Gráfica 4B) mostraron mayor tolerancia a docetaxel que las preincubadas por 24 h (Gráfica 4A), conservando mayor viabilidad, especialmente a 96

h. Esto sugirió que el tiempo de acondicionamiento previo al tratamiento influyó directamente en la respuesta celular.

## 4.2 Tratamiento con Paclitaxel

### 4.2.1 24 h de preincubación

#### **Viabilidad (Gráfica 4C):**

La viabilidad máxima se registró en 200 nM y 120 h de exposición, mientras que la mínima se observó en 300 nM y 72 h.

- **72 h:** La viabilidad disminuyó 70–75 % respecto al control, manteniéndose en un 25–30 % entre 100–200 nM. En 250 nM se observó un aumento moderado (aproximadamente 35 %), seguido de una disminución en 300 nM.
- **96 h:** Se registró un incremento moderado de viabilidad en 100 nM, manteniéndose luego entre 28–38 % en el resto de las concentraciones.
- **120 h:** La viabilidad volvió a disminuir entre 70–75 % en 100 nM. Posteriormente, entre 100–200 nM se registró un aumento progresivo, con un máximo en 200 nM, seguido de una caída en 250–300 nM.

#### **Citotoxicidad (Gráfica 5C):**

- **72 h:** se registró el rango más amplio, entre 78–85 %.
- **96 h:** Los valores oscilaron entre 65–75 %.
- **120 h:** Los valores oscilaron entre 65–78 %.

### 4.2.2 72 h de preincubación

#### **Viabilidad (Gráfica 4D):**

La viabilidad máxima se registró en 200 nM y 96 h, mientras que la mínima se alcanzó en 300 nM y 120 h.

- **72 h:** La viabilidad disminuyó 55–60 % respecto al control, reduciéndose de forma progresiva a medida que aumentaba la concentración.
- **96 h:** La viabilidad se redujo entre 60–65 %. Las concentraciones iniciales (100–150 nM) mostraron disminuciones constantes, mientras que 200 nM registró el valor más alto (aproximadamente 50 %). A partir de 250 nM volvió a disminuir.
- **120 h:** Se observó la menor viabilidad general, con valores del 25–30% en 100 nM. La viabilidad aumentó hasta 150 nM y luego disminuyó en las concentraciones de 200, 250 y 300 nM.

#### **Citotoxicidad (Gráfica 5D):**

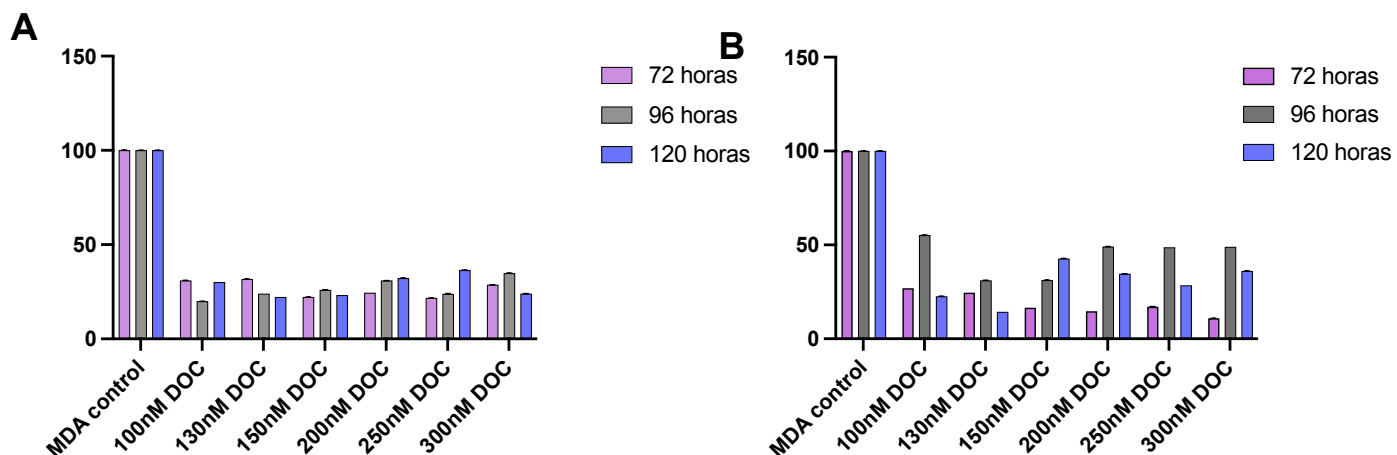
- **72 h:** los valores oscilaron entre 60–85 %.
- **96 h:** Los valores oscilaron entre 58–78 %.
- **120 h:** Se registró el rango más amplio, entre 62–90 %.

#### **Comparación 4C vs. 4D:**

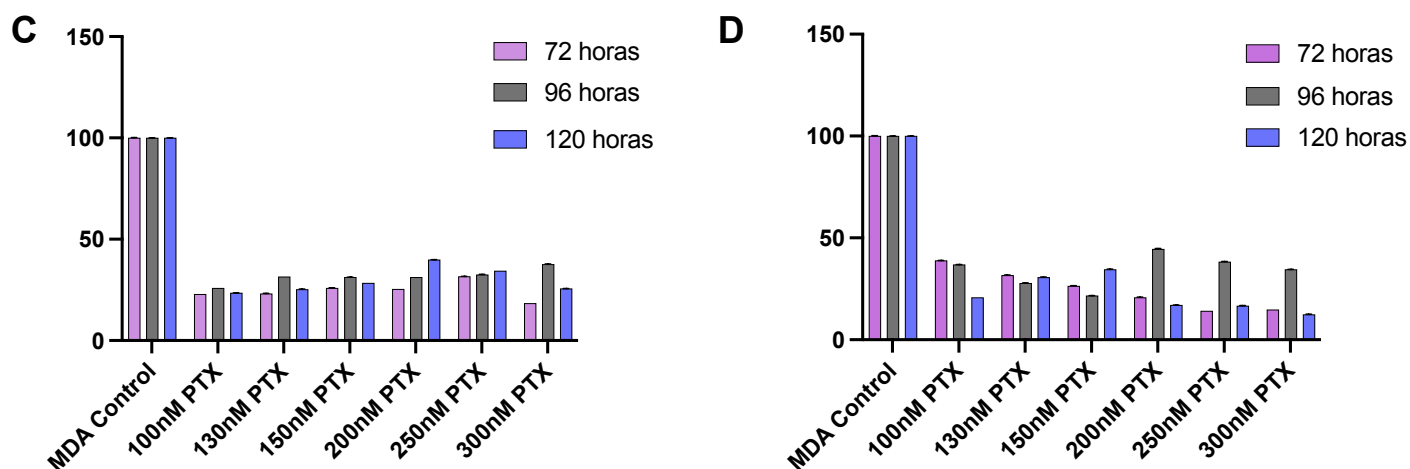
Al igual que con docetaxel, el aumento del tiempo de preincubación con paclitaxel (72 h; Gráfica 4D) permitió conservar ligeramente mayor viabilidad a ciertas concentraciones (especialmente 200 nM a las 96 h). No obstante, la toxicidad global aumentó con el tiempo de exposición, sin una recuperación evidente a las 120 h.

Gráficas 3. Viabilidad en células MDA-MB-231 tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.

## Viabilidad DOC



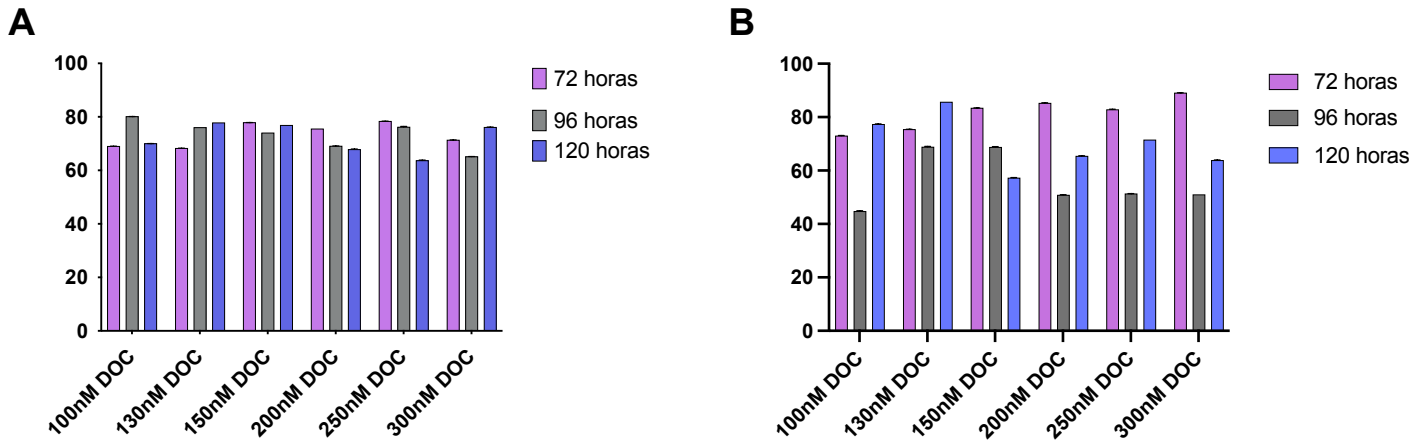
## Viabilidad PTX



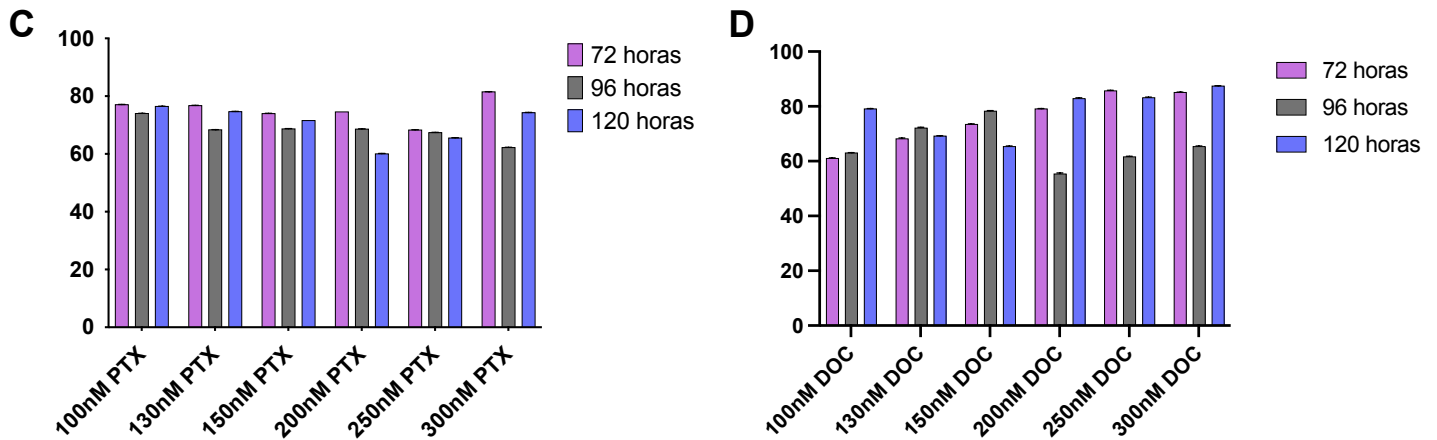
**Nota.** Viabilidad celular de células MDA-MB-231 tratadas con Docetaxel (DOC) y Paclitaxel (PTX), evaluada en función de diferentes tiempos de preincubación y tiempos de exposición de 72 h (rosado), 96 h (gris) y 120 h (azul). A) Células sembradas durante 24 h y tratadas con Docetaxel. B) Células sembradas durante 72 h y tratadas con Docetaxel. C) Células sembradas durante 24 h y tratadas con Paclitaxel. D) Células sembradas durante 72 h y tratadas con Paclitaxel.

Gráficas 4. Citotoxicidad en células MDA-MB-231 tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.

## Citotoxicidad DOC



## Citotoxicidad PTX



**Nota.** Evaluación de la citotoxicidad en células MDA-MB-231 tratadas con Docetaxel (DOC) y Paclitaxel (PTX) en función de diferentes tiempos de preincubación y tiempos de exposición de 72 horas (rosado), 96 horas (gris) y 120 horas (azul). A) Células sembradas durante 24 h y tratadas con Docetaxel. B) Células sembradas durante 72 h y tratadas con Docetaxel. C) Células sembradas durante 24 h y tratadas con Paclitaxel. D) Células sembradas durante 72 h y tratadas con Paclitaxel.

### 5 Análisis de expresión génica en células MDA-MB-231 tratadas con Paclitaxel y Docetaxel: Identificación de genes diferencialmente expresados asociados a resistencia

El análisis de expresión génica (Tabla 2) mostró diferencias marcadas entre las células tratadas con PTX y DTX en comparación con las células control (valor normalizado = 1). En total, se identificaron 36 genes con expresiones significativas en respuesta a los tratamientos, distribuidos en categorías funcionales como resistencia a medicamentos, enzimas de metabolización, reparación del ADN, ciclo celular, receptores hormonales, factores de crecimiento y factores de transcripción (Tabla 3), lo que reveló patrones diferenciales de expresión entre ambos taxanos (Gráficas 5).

### 5.1 Análisis de diferencias en la expresión génica

El estudio reveló que la mayoría de los genes analizados presentaron un aumento notable en su expresión en respuesta al tratamiento con DTX, en comparación con PTX. Entre los genes con mayor diferencia de expresión están ELK1, CYP2C8 y AR (Gráficas 5A), los cuales podrían representar posibles biomarcadores de resistencia o blancos terapéuticos específicos frente a estos taxanos.

### 5.2 Expresión génica organizada por categorías visuales: gráficas A–F

#### **Gráfica A**

- El gen ELK1 mostró la diferencia más amplia en la expresión, con un valor de 20 030.62 con DOC, frente a 515.6 con PTX, lo que representó una diferencia de 19 515.02 entre ambos taxanos.
- El gen CYP2C8 mostró la segunda diferencia más amplia, presentando un aumento de expresión de 9 432.68 con DOC frente a 1 292.78 con PTX, lo que representa una diferencia de 8 139.9.
- El receptor de andrógenos (AR) fue el tercer gen con mayor diferencial de expresión, con un valor de 4 935.31 con DOC frente a 465.81 con PTX, lo que representó una diferencia de 4 469.5.

- El gen CYP2C9 fue el cuarto gen con una diferencial de expresión, con un valor de 5 210.85 con DOC frente a 1 291.62 con PTX. lo que representa una diferencia de 3 919.23.
- El gen CYP3A4 fue el quinto gen con una diferencial de expresión, con un valor de 4 014.98 con DOC frente a 515.6 con PTX. lo que representa una diferencia de 3 499.38.
- El gen CYP2B6 mostró un aumento de expresión de 3 327.06 con DOC frente a 308.4 con PTX, lo que representa una diferencia de 3 018.66.

## **Gráfica B**

- El gen CYP2C19 presentó una expresión de 4 158.12 con DOC frente a 1 706.74 con PTX, con una diferencia de 2 451.38 entre ambos tratamientos.
- El gen SULT1E1 mostró una expresión de 2 621.97 con DOC frente a 319.52 con PTX, con una diferencia de 2 302.45.
- El gen ESR1, correspondiente al receptor de estrógeno alfa, presentó una expresión de 1 963.83 con DOC frente a 15.06 con PTX, lo que representó una diferencia de 1 948.77.
- El gen ABCB1, asociado a resistencia a múltiples fármacos, mostró una expresión de 1 926.18 con DOC frente a 522.11 con PTX, con una diferencia de 1 404.07.
- El gen ESR2, receptor de estrógeno beta, presentó una expresión de 1 491.79 con DOC frente a 120.42 con PTX, con una diferencia de 1 371.37.
- El gen DHFR, relacionado con el metabolismo del folato, mostró una expresión de 1 080.81 con DOC frente a 7.48 con PTX, lo que representó una diferencia de 1 073.33.

## **Gráfica C**

- El gen CYP3A5 presentó una expresión de 911.88 con DOC frente a 159.54 con PTX, con una diferencia de 752.34.
- El gen CYP2D6 mostró una expresión de 742.37 con DOC frente a 21.48 con PTX, con una diferencia de 720.89.
- El gen FGF2, factor de crecimiento básico, presentó una expresión de 814.53 con DOC frente a 312.55 con PTX, con una diferencia de 501.98.
- El gen TPMT presentó una expresión de 440.64 con DOC frente a 28.08 con PTX, lo que representa una diferencia de 412.56.
- El gen NFKBIE, regulador de la vía NF- $\kappa$ B, presentó una expresión de 387.57 con DOC frente a 12.19 con PTX, con una diferencia de 375.38.
- El gen CYP1A2 mostró una expresión de 440.19 con DOC frente a 109.67 con PTX, con una diferencia de 330.52.

## **Gráfica D**

- El gen ERBB3, miembro de la familia de receptores ERBB, presentó una expresión de 264.59 con DOC frente a 13.59 con PTX, con una diferencia de 251.00.
- El gen CYP1A1 mostró una expresión de 317.31 con DOC frente a 72.97 con PTX, lo que representa una diferencia de 244.34.
- El gen XPC, involucrado en reparación del ADN, presentó una expresión de 229.44 con DOC frente a 20.33 con PTX, con una diferencia de 209.11.
- El gen NAT2, relacionado con acetilación de xenobióticos, presentó una expresión de 212.66 con DOC frente a 25.19 con PTX, con una diferencia de 187.47.

- El gen BCL2, antiapoptótico, presentó una expresión de 208.42 con DOC frente a 21.02 con PTX, con una diferencia de 187.40.
- El gen CDKN2A, regulador del ciclo celular, mostró una expresión de 472.98 con DOC frente a 290.3 con PTX, lo que representa una diferencia de 182.68.

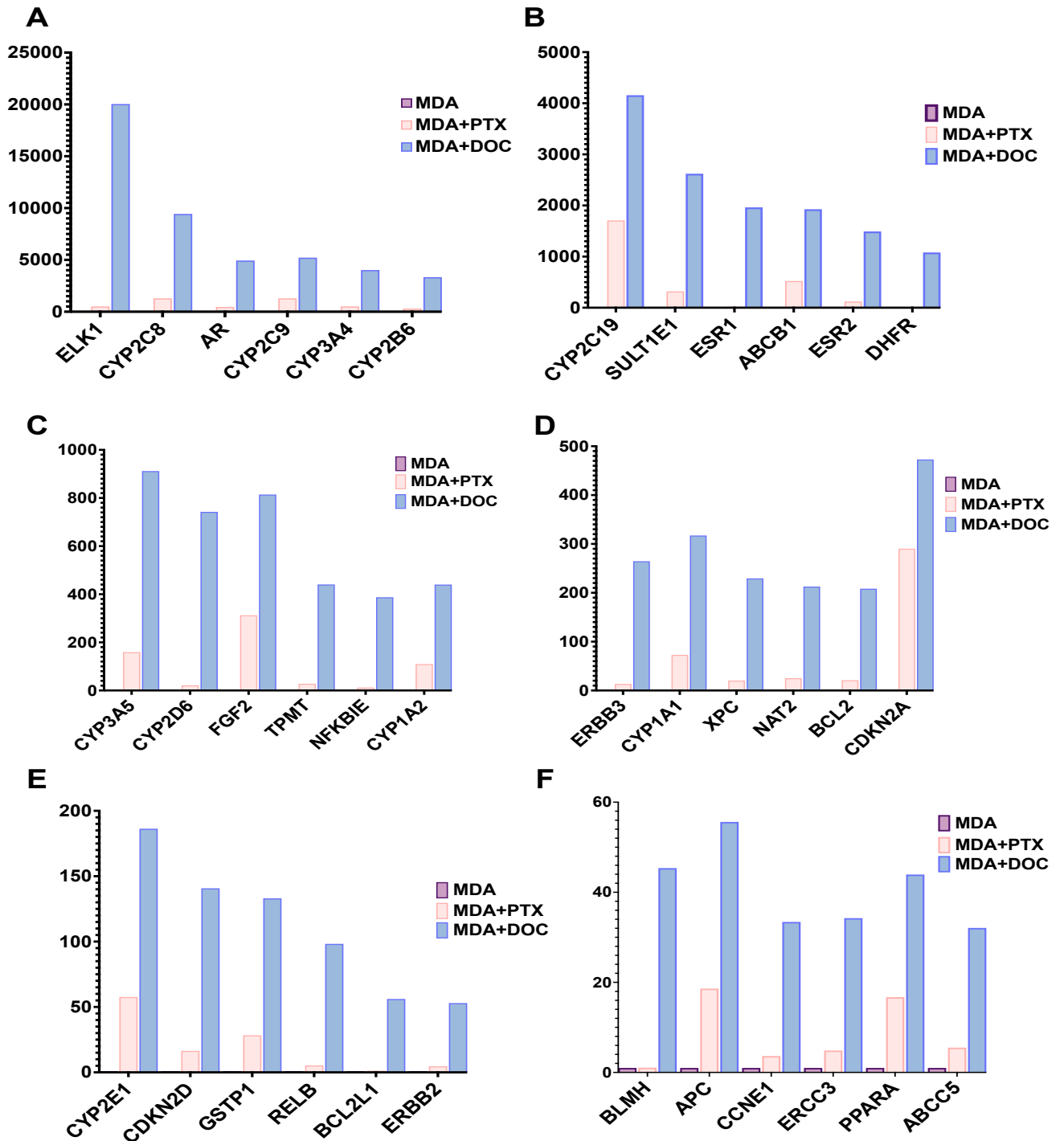
### **Gráfica E**

- El gen CYP2E1 presentó una expresión de 186.34 con DOC frente a 57.67 con PTX, con una diferencia de 128.67.
- El gen CDKN2D mostró una expresión de 140.74 con DOC frente a 16.47 con PTX, con una diferencia de 124.27.
- El gen GSTP1, implicado en detoxificación, presentó una expresión de 133.08 con DOC frente a 28.34 con PTX, con una diferencia de 104.74.
- El gen RELB, de la familia NF- $\kappa$ B, mostró una expresión de 98.27 con DOC frente a 5.29 con PTX, con una diferencia de 92.98.
- El gen BCL2L1, isoforma antiapoptótica BCL-XL, presentó una expresión de 56.14 con DOC frente a 1.25 con PTX, con una diferencia de 54.89.
- El gen ERBB2, conocido como HER2, mostró una expresión de 53.00 con DOC frente a 4.72 con PTX, con una diferencia de 48.28.

### **Gráfica F**

- El gen BLMH, presentó una expresión de 45.37 con DOC frente a 1.07 con PTX, con una diferencia de 44.30.
- El gen APC, supresor tumoral, presentó una expresión de 55.62 con DOC frente a 18.61 con PTX, con una diferencia de 37.01.
- El gen CCNE1, mostró una expresión de 33.42 con DOC frente a 3.64 con PTX, con una diferencia de 29.78.
- El gen ERCC3, presentó una expresión de 34.26 con DOC frente a 4.86 con PTX, lo que representa una diferencia de 29.40.
- El gen PPARA, mostró una expresión de 43.94 con DOC frente a 16.71 con PTX, con una diferencia de 27.23.
- El gen ABCC5, mostró una diferencia de expresión de 32.09 con DOC frente a 5.51 con PTX, con una diferencia de 26.58.

Gráficas 5. Genes con mayor diferencia en expresión entre las células MDA-MB-321 Control y las tratadas.



**Nota.** Genes diferenciales en MDA-MB-231: Paclitaxel vs. Docetaxel. Expresión de 36 genes en células no tratadas (Control, barras violetas), tratadas con 130 nM de Paclitaxel (MDA+PTX, barras rosas) y tratadas con 130 nM de Docetaxel (MDA+DOC, barras celestes). Los genes se ordenan de mayor a menor según las diferencias en expresión entre PTX y DTX.

## **6 Expresión proteica de RELB en células MDA-MB-231 control y tratadas con Paclitaxel y Docetaxel**

Para validar si los cambios transcripcionales observados en el microarreglo se reflejaban a nivel proteico, se realizó un ensayo de Western blot dirigido a RELB. En la membrana se cargaron cuatro carriles (escalera, MDA control, MDA+PTX, MDA+DOC), permitiendo una comparación directa del impacto de ambos taxanos.

### **6.1 Patrón de bandas y peso molecular**

Las bandas correspondientes a RELB se observaron en el rango de 62–65 kDa, concordante con el peso molecular reportado para esta proteína. La escalera permitió verificar la correcta migración y confirmar la especificidad del anticuerpo empleado.

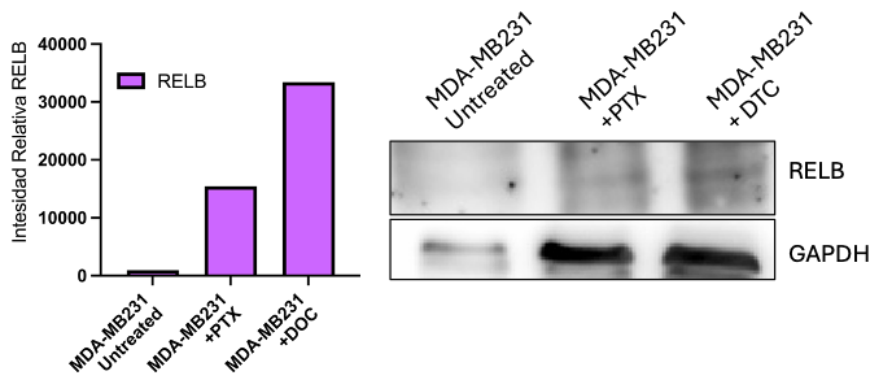
El carril de MDA control mostró niveles basales. En contraste, la exposición a Paclitaxel produjo un incremento moderado en la intensidad de la banda, mientras que Docetaxel indujo una señal notablemente superior, reflejando una activación más robusta de la vía dependiente de RELB.

Este comportamiento proteico fue congruente con el análisis transcriptómico, en el cual RELB también mostró una sobreexpresión más marcada bajo tratamiento con Docetaxel, lo que indicó una mayor expresión proteica. Este patrón coincidió con la sobreexpresión transcripcional observada previamente para RELB en el microarreglo.

### **6.2 Control de carga (GAPDH)**

Las bandas correspondientes a GAPDH se detectaron en el rango de 36–38 kDa y fueron uniformes en los tres carriles, lo que descartó variaciones en carga, transferencia o degradación proteica. Este control permitió interpretar de manera fiable los cambios relativos en RELB.

*Gráficas 7. Western blot y cuantificación de bandas de expresión de RELB diferencia en expresión entre las células MDA-MB-231 Control y las tratadas.*



**Nota.** GAPDH se empleó como control de carga. la intensidad de la banda correspondiente a RELB fue mayor en las células tratadas con docetaxel en comparación con las demás condiciones experimentales.

## B. DISCUSIÓN

### 1 Adaptación morfológica y primeros indicios de resistencia frente a taxanos

Los cambios morfológicos observados durante la exposición progresiva a Paclitaxel y Docetaxel sugieren que las células MDA-MB-231 activaron mecanismos adaptativos frente al daño inducido por ambos taxanos. Alteraciones como vacuolización citoplasmática, redondeamiento celular y pérdida de confluencia han sido descritas como indicadores tempranos de disrupción del citoesqueleto y activación del estrés mitótico en modelos de cáncer de mama expuestos a taxanos (Alalawy et al., 2024).

A pesar del daño temprano, algunas células permanecieron adheridas, lo que sugiere la selección de subpoblaciones tolerantes. Estudios actuales han demostrado que la exposición sostenida a taxanos favoreció la supervivencia de células con mayor expresión de transportadores ABC, especialmente ABCB1, así como la activación de rutas como NF- $\kappa$ B y PI3K/AKT que promueven resistencia (Kannan et al., 2025; Postigo-Corrales et al., 2025).

Estos patrones sugirieron que la resistencia emergió como resultado de una combinación de adaptación estructural, reprogramación de la señalización intracelular y selección de subpoblaciones con mayor tolerancia metabólica y citoesquelética, más que por el impacto directo del daño inducido por los taxanos.

## **2 Comparación del comportamiento del crecimiento entre células normales, tumorales y resistentes a taxanos en cáncer de mama triple negativo**

La divergencia proliferativa entre BJ, MDA-MB-231 y las variantes resistentes reflejó la naturaleza tumoral de la línea MDA-MB-231 y el efecto adaptativo inducido por los taxanos. Las células BJ, como fibroblastos normales, mostraron un crecimiento controlado, coherente con la presencia de puntos de control del ciclo celular funcionales y una baja tasa replicativa, tal como se ha reportado para líneas no transformadas (Campisi, 2013). En contraste, las MDA-MB-231 mostraron un crecimiento acelerado y un punto máximo temprano, lo que concuerda con reportes que caracterizan esta línea como altamente proliferativa y metastásica debido a mutaciones en TP53 y la activación constitutiva de rutas como MAPK y PI3K/AKT (Tian et al., 2020; Kenny et al., 2007).

Tras la selección con Paclitaxel y Docetaxel, ambas líneas resistentes mostraron un crecimiento reducido respecto al control, lo cual ha sido reportado previamente como un efecto asociado al costo metabólico que implica mantener mecanismos de resistencia, tales como sobreexpresión de transportadores ABC y remodelación del citoesqueleto (Nedeljković & Damjanović, 2019). No obstante, las células resistentes a Paclitaxel mantuvieron mayor capacidad proliferativa que las resistentes a Docetaxel, lo cual coincide con estudios que indican que la resistencia a PTX puede asociarse a fenotipos más móviles e invasivos, mientras que la resistencia a DOC tiende a inducir estados más cercanos a senescencia parcial o arresto prolongado del ciclo (Zhao et al., 2019).

Estos resultados apoyaron la idea de que la resistencia a taxanos es un fenómeno evolutivo multifactorial, en el cual cada fármaco presenta trayectorias adaptativas distintas y diferencias notorias en la proliferación.

### **3 Potencial clonogénico diferencial entre MDA-MB-231 y BJ**

La mayor formación de colonias observada en MDA-MB-231 indicó una elevada capacidad de supervivencia y proliferación tras el estrés de baja densidad, coherente con su fenotipo tumoral agresivo. Esto coincidió con estudios que muestran que líneas TNBC poseen un alto potencial clonogénico y elevada tasa de duplicación (Bai et al., 2021).

En contraste, las células BJ generaron pocas colonias, reflejando su proliferación regulada y menor plasticidad, como se ha documentado para fibroblastos normales con limitada capacidad de expansión clonal (Li et al., 2020).

### **4 Influencia del Tiempo de Preincubación y Exposición en la Respuesta de Células MDA-MB-231 a Docetaxel y Paclitaxel**

Los resultados demostraron que la respuesta de las líneas MDA-MB-231 tratadas con Paclitaxel y Docetaxel dependió tanto del tiempo de preincubación como del tiempo de exposición. Las células preincubadas por 72 h mantuvieron una mayor viabilidad que las preincubadas por solo 24 h, lo que coincidió con estudios que reportan que una mayor adhesión y estabilización celular favorecen la activación de mecanismos tempranos de defensa, especialmente vías de supervivencia como PI3K/Akt (Woods et al., 2020).

Docetaxel presentó una citotoxicidad más rápida e intensa que Paclitaxel, confirmando lo descrito en la literatura, donde su mayor afinidad por  $\beta$ -tubulina y la formación de microtúbulos generan una detención mitótica más estable y apoptosis más temprana (Barbuti & Chen, 2015).

El comportamiento no lineal observado entre concentración y respuesta respalda la idea de que la sensibilidad a taxanos no depende solamente de la dosis, sino también del estado fisiológico previo de la célula y de su capacidad para activar rutas adaptativas frente al estrés mitótico (Nedeljković & Damjanović, 2019).

## **5 Mecanismos Moleculares Diferenciales Inducidos por Taxanos en Cáncer de Mama Triple Negativo**

El análisis de expresión génica mostró que Docetaxel provocó una activación molecular mucho más intensa que Paclitaxel, afectando rutas asociadas a proliferación, metabolismo xenobiótico, resistencia a fármacos, señalización hormonal, reparación de ADN y supervivencia celular. Este comportamiento coincidió con estudios que demostraron que DOC tiende a inducir respuestas celulares más intensas debido a su mayor afinidad por  $\beta$ -tubulina (Barbuti & Chen, 2015; Nedeljković & Damjanović, 2019).

### **5.1 Biomarcador de Resistencia Emergente**

La marcada sobreexpresión de ELK1 observada en las células tratadas con Docetaxel representó uno de los hallazgos más sobresalientes del estudio, ya que este gen codifica un factor de transcripción clave en la vía MAPK/ERK, responsable de regular la proliferación y la supervivencia celular. Aunque la activación de ELK1 es común en células sometidas a estrés, los niveles extremadamente elevados excedieron lo documentado previamente en el cáncer de mama, indicando un fenómeno transcripcional atípico. En otros tumores, como próstata y melanoma, ELK1 ha sido descrito como un amplificador transcripcional capaz de reactivar programas de supervivencia bajo condiciones citotóxicas, pero no se había documentado una inducción tan marcada en TNBC (Hollenhorst et al., 2011).

Esta sobreexpresión sugiere que las células activaron un mecanismo de reprogramación transcripcional dirigido a contrarrestar el bloqueo mitótico, en concordancia con estudios que vinculan la resistencia a taxanos con la hiperactivación de rutas proliferativas y antiapoptóticas (Nedeljković & Damjanović, 2019).

### **5.2 Genes con Expresión Novedosa en TNBC**

La inducción de SULT1E1 y BLMH en TNBC introdujo elementos novedosos en la comprensión de la resistencia a taxanos. SULT1E1, una sulfotransferasa encargada de inactivar estrógenos, ha sido reportada principalmente en cáncer de mama luminal, cáncer endometrial y tumores hormono-dependientes, controla la sulfatación de estrógenos y metabolitos derivados. A pesar de que TNBC carece de receptores hormonales, se ha

demostrado que metabolitos estrogénicos regulan circuitos proliferativos independientes del receptor, influyendo sobre rutas MAPK/ERK y PI3K/AKT (Zhang et al., 2021). La activación de SULT1E1 sugiere una posible reconfiguración hormonal compensatoria, mecanismo ya propuesto en tumores resistentes a terapia (Peters et al., 2023). Su expresión indica una posible reactivación de rutas hormonodependientes como mecanismo compensatorio.

Por su parte, BLMH (bleomicina hidrolasa) ha sido descrita fundamentalmente en cáncer de pulmón, cáncer testicular y linfomas sensibles a bleomicina; asimismo, ha adquirido relevancia como modulador integral de la homeostasis proteica y genómica bajo condiciones de estrés antimitótico. Estudios de alto impacto han demostrado que BLMH no solo detoxifica bleomicina, sino que también participa en la tolerancia al estrés quimioterapéutico y en el mantenimiento de la estabilidad genómica frente a perturbaciones estructurales del ciclo celular (Li et al., 2022). Su sobreexpresión sugiere un rol adaptativo clave, posicionándola como un posible marcador funcional de reparación asociado a resistencia, coherente con mecanismos descritos en tumores quimiorresistentes.

### 5.3 Isoenzimas del Citocromos P450

El grupo de genes CYP (CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP2B6 y CYP2C19) mostró una activación mucho mayor de la esperada en MDA-MB-231, indicando que las células resistentes recurrieron a rutas de detoxificación poco habituales en TNBC. Estos genes participan en el metabolismo de taxanos y suelen estar sobreexpresados principalmente en cáncer de hígado, pulmón y próstata, donde contribuyen a disminuir la concentración intracelular de fármacos y favorecer la resistencia (Zanger & Schwab, 2013; Gao et al., 2021).

La elevada inducción de CYP2C8 y CYP2C9 coincide con su papel conocido en el metabolismo de taxanos y con reportes que asocian variantes como CYP2C8\*3 a menor sensibilidad al paclitaxel (Karlgrén et al., 2011). En conjunto, los resultados sugieren que las

células resistentes desarrollaron un perfil metabólico similar al hepático, usando enzimas de detoxificación para disminuir el efecto citotóxico de los taxanos.

#### 5.4 vía NF- $\kappa$ B

Los reguladores NFKBIE y RELB sugirieron la activación coordinada de las ramas canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B, favoreciendo respuestas inflamatorias, reparación del daño y supervivencia temprana frente al estrés mitótico. Este patrón coincide con evidencia de que NF- $\kappa$ B actúa como un eje prosupervivencia central en resistencia a taxanos, al modular antiapoptosis, reparación y plasticidad tumoral (Perkins, 2012). Aunque la activación canónica ha sido ampliamente vinculada a quimiorresistencia, la inducción de RELB es particularmente relevante, ya que estudios recientes lo asocian con EMT, persistencia celular y agresividad tumoral en cáncer de mama (Kim et al., 2023). RELB, no había sido previamente reportado en este contexto, por lo que podría implicar un nuevo eje de regulación inmuno-inflamatoria en la resistencia al tratamiento.

#### 5.5 Genes de Reparación del ADN

Los genes XPC, ERCC3 y APC, relacionados con la reparación por escisión de nucleótidos y vigilancia genómica, se expresaron más con DOC, lo que coincidió con reportes que asocian este taxano a un daño replicativo más severo en células altamente proliferativas (Barbuti & Chen, 2015).

#### 5.6 Genes de resistencia farmacológica

Los genes ABCB1, BCL2 y BCL2L1 establecieron un umbral más alto para la activación de la muerte celular programada. Se ha demostrado que la sobreexpresión de miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2 confiere tolerancia a taxanos y otros agentes citotóxicos, facilitando la supervivencia bajo estrés mitótico (Maloney et al., 2020; Alalawy et al., 2024)

## 5.7 Genes del Ciclo Celular

La inducción de CDKN2A, CDKN2D y CCNE1 fue marcada, lo cual puede interpretarse como un intento de las células por detener su proliferación ante el daño. La expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclina como CDKN2A y CDKN2D puede facilitar la entrada en un estado de senescencia transitoria, mientras que la activación de CCNE1, una ciclina G1/S, ha sido vinculada a resistencia en cánceres de mama y ovario (Li et al., 2018; Bosco et al., 2007). Este patrón sugiere una dualidad funcional: por un lado, detención del ciclo; por el otro, promoción de recuperación proliferativa.

## 5.8 Genes de Receptores Hormonales y Factores de Crecimiento

La sobreexpresión de AR (receptor de andrógenos), ESR1 (receptor de estrógeno alfa) y ESR2 (receptor de estrógeno beta), constituye uno de los hallazgos más inesperados considerando que las células MDA-MB-231 corresponden al subtipo triple negativo, caracterizado por la ausencia de receptores hormonales. Esta activación anómala sugiere un proceso de reprogramación fenotípica, donde las células tumorales recuperan o reactivan vías hormonales como estrategia de escape frente al estrés citotóxico. Estudios recientes han demostrado que algunos subtipos de TNBC pueden adquirir características luminales, activando señalización estrogénica o androgénica con el fin de sostener la proliferación bajo condiciones adversas (Yuan et al., 2021).

Asimismo, la sobreexpresión de ERBB2, ERBB3 y FGF2, factores clave en proliferación, angiogénesis y migración tumoral, apunta a la activación redundante de rutas de señalización como PI3K/AKT y MAPK/ERK, las cuales se han relacionado con resistencia a quimioterapia en cáncer de mama (Dienstmann et al., 2014).

## 6 Validación Proteica de RELB y su Contribución a la Resistencia

La validación proteica demostró que RELB se activó de forma diferencial en células tratadas con paclitaxel y docetaxel, siendo más evidente en este último. Esto coincidió con la mayor intensidad del estrés mitótico inducido por docetaxel y con la activación de mecanismos de resistencia basados en NF- $\kappa$ B descritos en la literatura reciente (Postigo-Corrales et al., 2025).

Estudios actualizados indicaron que RELB favoreció la supervivencia tumoral bajo quimioterapia mediante la regulación de procesos como reparación del daño, inflamación y transición hacia fenotipos más tolerantes (Guo et al., 2024; Oh et al., 2023). Asimismo, su sobreexpresión ha sido asociada con progresión tumoral en modelos agresivos de cáncer de mama (Kim et al., 2023).

La coincidencia entre la inducción transcriptómica (Resultado 5) y la activación proteica (Resultado 6) reforzó que RELB actuó como un componente clave en la resistencia a taxanos y sugirió su potencial como biomarcador y blanco terapéutico en TNBC resistente.

## C. LIMITACIONES

El alcance del presente estudio se encuentra condicionado por determinadas limitaciones metodológicas propias del modelo experimental empleado. En primer lugar, el uso de líneas celulares establecidas no representa completamente la heterogeneidad biológica de los tumores *in vivo*, lo que puede restringir la extrapolación de los resultados a contextos fisiológicos más complejos.

Asimismo, la generación de líneas celulares resistentes a Paclitaxel y Docetaxel requirió un periodo prolongado de exposición escalonada, lo que constituye una limitación temporal del estudio. Incrementos frecuentes o acelerados en la concentración de los taxanos pueden inducir apoptosis celular, comprometiendo la estabilidad del modelo resistente.

Adicionalmente, la inducción de resistencia se realizó bajo condiciones *in vitro*, en un entorno controlado que no reproduce completamente la complejidad del microambiente tumoral *in vivo*, incluyendo la influencia del sistema inmunológico y de vías de señalización asociadas a la supervivencia celular. Finalmente, como en todo sistema de cultivo celular prolongado, existe un riesgo inherente de contaminación, lo que exige un control experimental riguroso.

# **CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## A. CONCLUSIÓN

La adaptación escalonada a taxanos permitió la generación de sublíneas resistentes de MDA-MB-231 que presentaron modificaciones morfológicas, proliferativas y moleculares indicativas de un proceso de selección celular sostenido. Los cambios fenotípicos observados durante la inducción de la resistencia reflejaron la activación de mecanismos compensatorios necesarios para tolerar el estrés citotóxico inducido por Paclitaxel y Docetaxel.

Los ensayos de proliferación demostraron que la resistencia adquirida no solo permitió la evasión farmacológica, sino que también modificó de manera significativa el comportamiento biológico de las células. Mientras las células control mantuvieron un patrón de crecimiento agresivo característico del TNBC, las sublíneas resistentes mostraron una desaceleración proliferativa marcada, especialmente bajo tratamiento con Docetaxel, lo que indicó un costo metabólico y replicativo asociado al mantenimiento de la resistencia. Este hallazgo sugirió que la resistencia no constituye únicamente un mecanismo molecular, sino también un estado fisiológico alterado que impacta la progresión tumoral.

Los análisis de viabilidad y citotoxicidad revelaron que la eficacia de los taxanos dependió de manera crítica del tiempo de preincubación, de la duración del tratamiento y de la concentración. La preincubación de 72 h generó una respuesta más tolerante, lo que evidenció que el estado fisiológico previo moduló la sensibilidad al tratamiento. Asimismo, las exposiciones extendidas (96–120 h) mostraron que la viabilidad no siguió un patrón lineal, sino un comportamiento altamente dependiente del contexto temporal y del tipo de taxano. En ambos fármacos, la ventana terapéutica más efectiva se observó entre 200–250 nM, lo que permitió establecer parámetros experimentales robustos para futuros estudios comparativos.

El perfil transcriptómico reveló que Docetaxel indujo una respuesta génica más intensa que Paclitaxel, con la sobreexpresión de genes asociados a proliferación (ELK1), metabolización de xenobióticos (CYP2C8), señalización hormonal aberrante (AR) y resistencia

antiapoptótica. La activación simultánea de múltiples isoformas del citocromo P450 sugirió la adquisición de un fenotipo hepatomimético, en el cual la línea resistente incorporó una capacidad biotransformadora ampliada para reducir la carga intracelular de taxanos, un mecanismo inusual pero altamente adaptativo en TNBC. En este contexto, RELB destacó como un nodo central de la vía NF- $\kappa$ B no canónica, lo que sugirió un papel dominante en la persistencia tumoral.

La validación proteica de RELB confirmó su papel central como efector de la vía NF- $\kappa$ B no canónica, integrando señales de estrés mitótico, inflamación, plasticidad celular y persistencia tumoral. La concordancia entre los aumentos transcriptómicos y proteicos consolidó a RELB como un biomarcador funcional de resistencia y un blanco terapéutico potencial en TNBC.

En su conjunto, los resultados evidenciaron que la resistencia a taxanos en células MDA-MB-231 fue un proceso multifactorial sostenido por la convergencia de rutas metabólicas, antiapoptóticas, proliferativas e inflamatorias. Este estudio aporta bases sólidas para el diseño de futuras estrategias terapéuticas dirigidas a superar la resistencia en cáncer de mama triple negativo.

## **B. RECOMENDACIONES**

1. Validar los genes con mayor expresión en el microarreglo, como ELK1, CYP2C8, AR y ABCB1, mediante qPCR para cuantificar su expresión y Western blot para verificar la presencia proteica.
2. Evaluar el uso de inhibidores de señalización, como bloqueadores de NF- $\kappa$ B y PI3K/AKT, con el fin de determinar si es posible revertir parcial o totalmente la resistencia adquirida.
3. Emplear herramientas de edición génica como CRISPR-Cas9 para estudiar la función específica de los genes implicados en la resistencia.
4. Analizar si la resistencia adquirida modifica la capacidad invasiva o migratoria de las células.
5. Utilizar citometría de flujo para evaluar apoptosis, ciclo celular y otros marcadores funcionales asociados a la resistencia a Paclitaxel y Docetaxel.
6. Incluir otras líneas TNBC o modelos más complejos para validar si los mecanismos identificados presentan comportamientos similares.
7. Repetir los ensayos empleando diferentes tiempos de exposición y concentraciones de los fármacos, con el fin de comprender con mayor detalle la dinámica dosis–tiempo de la respuesta celular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alalawy, A. I. (2024). Key genes and molecular mechanisms related to paclitaxel resistance in breast cancer. *Cancer Cell International*.
- Anderson, B. O. (2021). Breast cancer in limited-resource countries: Diagnosis and treatment. *The Breast*, 56, 1–12.
- ATCC: The global bioresource center. (n.d.). <https://www.atcc.org>. Retrieved January 7, 2026, from <https://www.atcc.org>
- Bai, J., Gao, J., Ma, J., Wang, X., & Zhang, J. (2021). Mechanisms of resistance to taxanes in triple-negative breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 11.
- Barbuti, A. M., & Chen, Z.-S. (2015). Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: Exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers*, 7(4), 2360–2371. <https://doi.org/10.3390/cancers7040897>
- Bhattacharya, R., Cabral, F., & Panda, D. (2014). A minimal  $\beta$ -tubulin C-terminal tail peptide triggers microtubule assembly: Implications for paclitaxel-based therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24), 8633–8638.
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 13(11), 674–690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
- Bosco, E. E., Knudsen, E. S., & Witkiewicz, A. K. (2007). Cyclin E deregulation in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 212(2), 407–418.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Breast cancer. (n.d.). Who.int. Retrieved January 7, 2026, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Cáncer de mama. (n.d.). Paho.org. Retrieved January 7, 2026, from <https://www.paho.org/es/temas/cancer-mama>
- Carey, L. A., Perou, C. M., & Livasy, C. A. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492–2502.
- Diana, A., Franzese, E., & Centonze, S. (2020). Triple-negative breast cancers: Molecular and clinical features with a focus on innovative treatments. *Current Oncology Reports*, 22(5).
- Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V., & Tabernero, J. (2014). Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(5), 1021–1031. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0639>
- Dietze, E. C., Sistrunk, C., Miranda-Carboni, G., O'Regan, R., & Seewaldt, V. L. (2015). Triple-negative breast cancer in African-American women: disparities versus biology. *Nature Reviews. Cancer*, 15(4), 248–254. <https://doi.org/10.1038/nrc3896>
- Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), 95–120.

- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
- Gao, Y., Xiao, Q., Ma, H., Li, L., Liu, J., Feng, Y., & Fang, Z. (2021). Cytochrome P450 enzymes in breast cancer: Expression, regulation, and therapeutic implications. *Frontiers in Oncology*, 11, 636522.
- Ginsburg, O. (2021). Breast cancer early detection and diagnosis: A roadmap to improve global outcomes. *The Lancet Global Health*, 9(8), e1028–e1035.
- Guo, Q., Jin, Y., Lin, M., Zeng, C., & Zhang, J. (2024). NF- $\kappa$ B signaling in therapy resistance of breast cancer: Mechanisms, approaches, and challenges. *Life Sciences*, 348(122684), 122684. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122684>
- Hansen, S. N., & Westergaard, D. (2015). Mechanisms of drug resistance in breast cancer. *Current Drug Targets*, 16(15), 1567–1583.
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *Lancet*, 389(10074), 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
- Hollenhorst, P. C., Mcintosh, L. P., & Graves, B. J. (2011). Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 437–471.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253–265.
- Kannan, K., Srinivasan, A., Kannan, A., & Ali, N. (2025). The underlying mechanisms and emerging strategies to overcome resistance in breast cancer. *Cancers*, 17(17), 2938. <https://doi.org/10.3390/cancers17172938>

- Karlgren, M., Vildhede, A., & Norinder, U. (2011). Classification of inhibitors of hepatic transporters. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(1), 1–12.
- Kenny, P. A., Lee, G. Y., & Bissell, M. J. (2007). Targeting the tumor microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5), 530–538.
- Kim, S. L., Kim, E. M., & Kim, S. W. (2023). BRD4/nuclear PD-L1/RelB circuit in breast cancer progression. *Cell Communication and Signaling*, 21.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Li, Y., Wang, J., Chen, Z., & Liu, Q. (2022). Bleomycin hydrolase contributes to cellular stress tolerance and genome stability under chemotherapeutic pressure. *Molecular Oncology*, 16(9), 1934–1950.
- Li, Z. (2020). Cellular clonogenic survival and stress responses in primary fibroblasts. *Scientific Reports*, 10.
- Li, Z., Razavi, P., & Li, Q. (2018). Loss of cyclin E1 regulation confers chemoresistance. *Clinical Cancer Research*, 24(13), 3257–3269.
- Maloney, C. (2020). BCL-2 family proteins and chemoresistance. *Cell Death & Disease*, 11.
- Marra, G., & Di Cosimo, S. (2020). Triple-negative breast cancer: Molecular features and therapeutic options. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 1–12.

- Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D., & Papadimitriou, C. (2012). Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews*, 38(7), 890–903. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.02.011>
- Nedeljković, M., & Damjanović, A. (2019). Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer-how we can rise to the challenge. *Cells (Basel, Switzerland)*, 8(9), 957. <https://doi.org/10.3390/cells8090957>
- Oh, A., Park, S. H., & Chung, J. (2023). NF- $\kappa$ B pathway and epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cell Communication and Signaling*, 21.
- Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). Paho.org. Consultado el 7 de enero de 2026 en <https://www.paho.org>
- Perkins, N. D. (2012). The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 12(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrc3204>
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Peters, J. M. (2023). Hormonal compensation mechanisms in therapy resistance. *Cancer Research*, 83(9), 1452–1465.
- Polyak, K. (2011). Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3786–3788. <https://doi.org/10.1172/JCI60534>
- Postigo-Corrales, F., Beltrán-Videla, A., Lázaro-Sánchez, A. D., Hurtado, A. M., Conesa-Zamora, P., Arroyo, A. B., & Luengo-Gil, G. (2025). Docetaxel resistance in breast cancer:

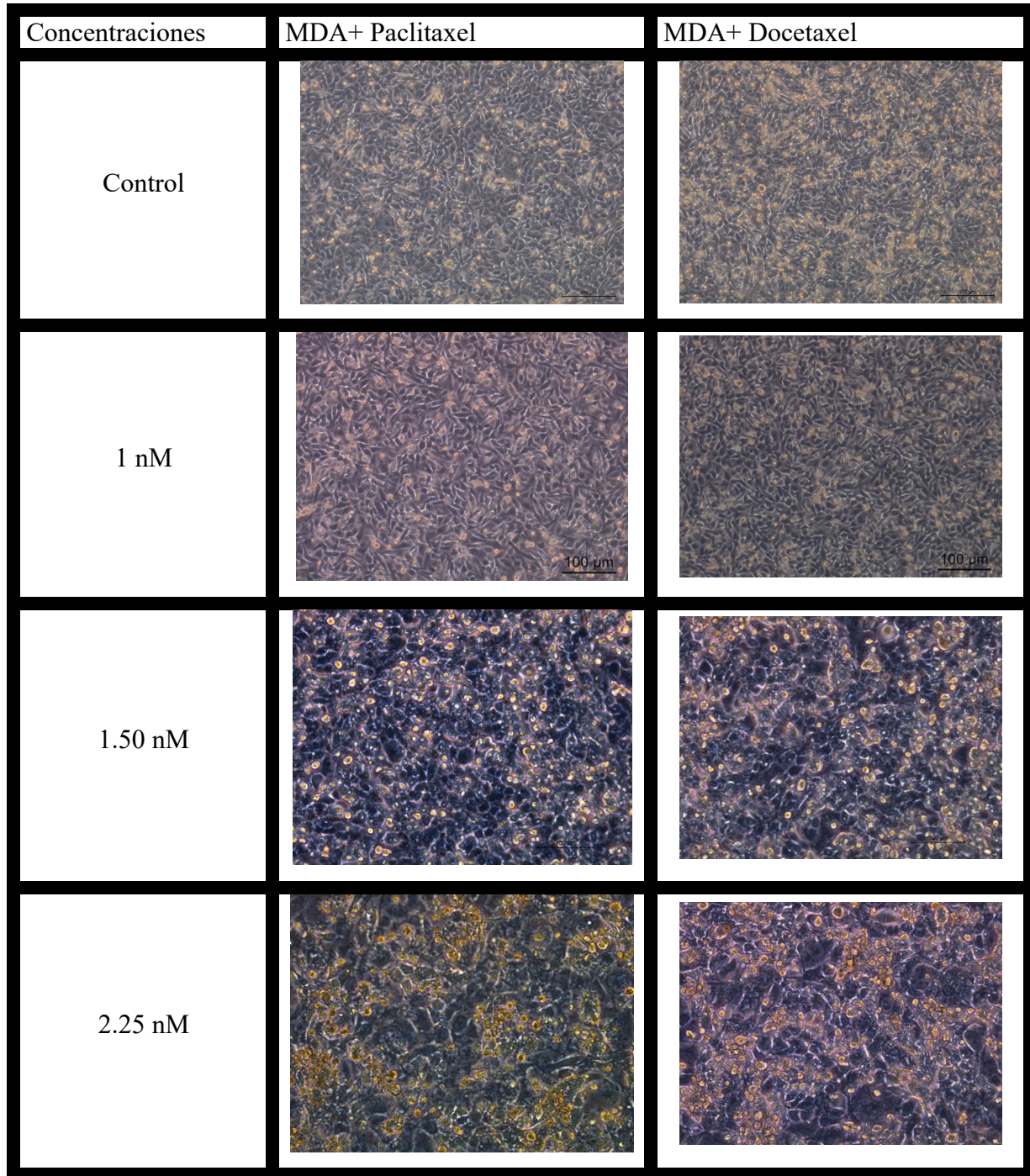
Current insights and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(15), 7119. <https://doi.org/10.3390/ijms26157119>

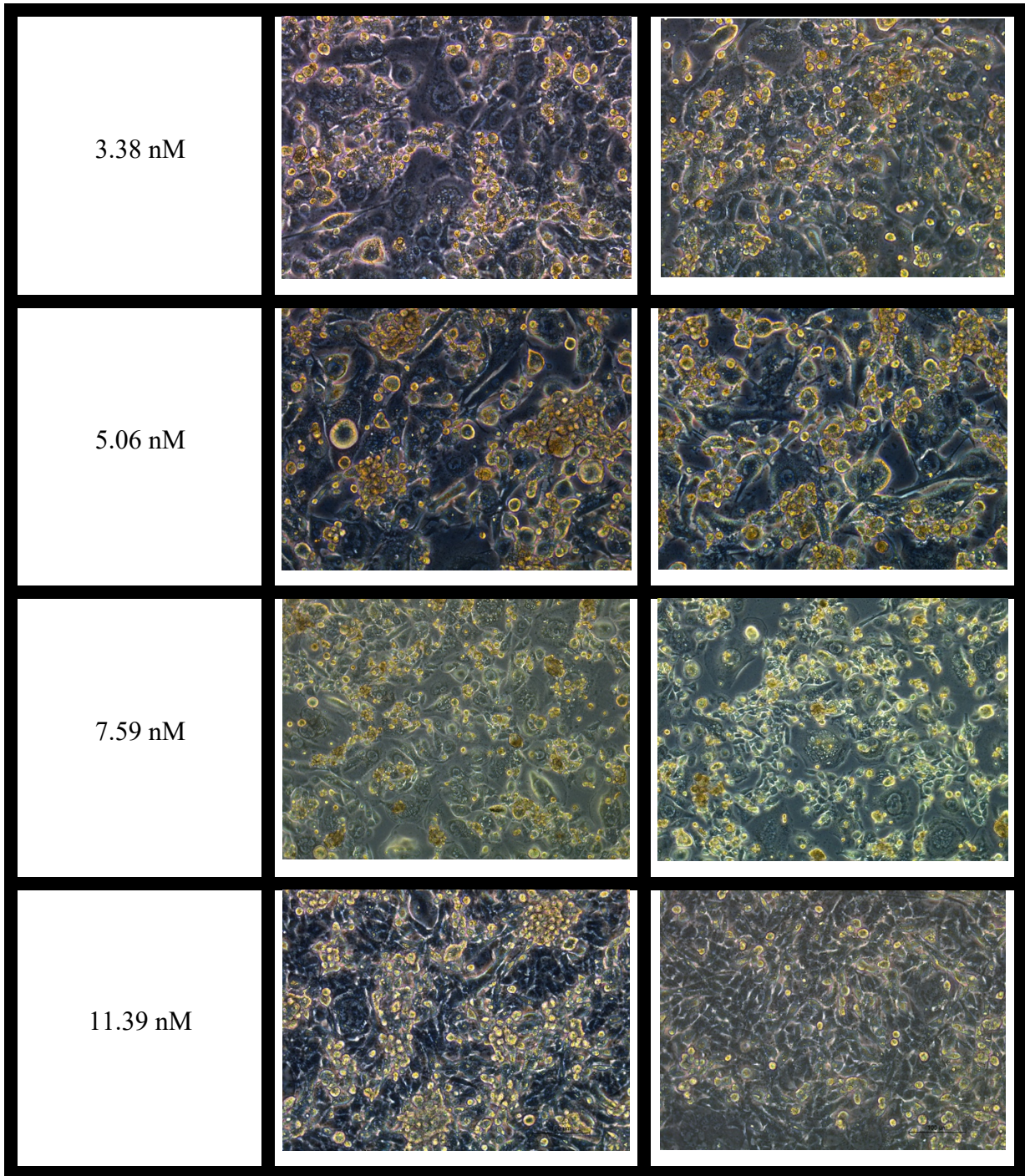
- Riedel, R. F., Porrello, A., & Pontzer, E. (2008). Molecular pathways involved in chemotherapy resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), 3141–3149.
- Shaheen, S., Hanif, A., Afzal, N., & Faisal, M. (2018). Molecular and cellular mechanisms of taxane resistance. *International Journal of Breast Cancer*, 1–10.
- Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- The International Agency for Research on Cancer (IARC). (n.d.). Global Cancer Observatory. [Iarc.Fr](https://gco.iarc.fr). Retrieved January 7, 2026, from <https://gco.iarc.fr>
- Tian, T., Li, X., & Zhang, J. (2020). mTOR signaling in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–22.
- Woods, E. C., Agha, A., Scheffler, K., & Bertozzi, C. R. (2020). Integrin signaling influences chemotherapy response. *Cell Reports*, 32(10).
- Yuan, Y. (2021). Hormone receptor reprogramming in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 23.

- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103–141.
- Zhang, H., Wang, Y., Zhang, Y., & Wang, J. (2021). Proteomic insights into chemotherapy resistance. *Cancer Cell International*, 21.
- Zhao, J., Zhang, W., Li, P., & Wu, M. (2019). Mechanisms of docetaxel and paclitaxel resistance in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, 2269–2280.

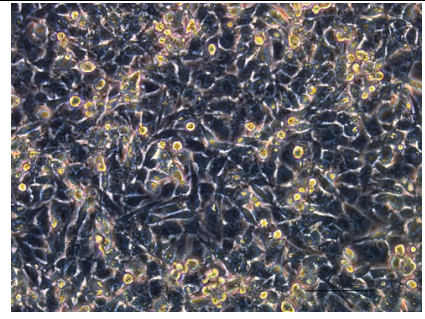
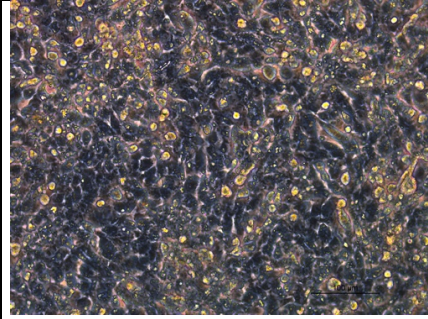
# ANEXOS

*Ilustración 1. Concentraciones de Paclitaxel y Docetaxel*

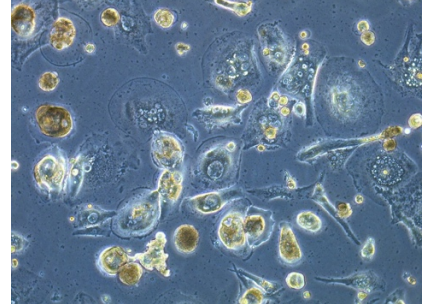
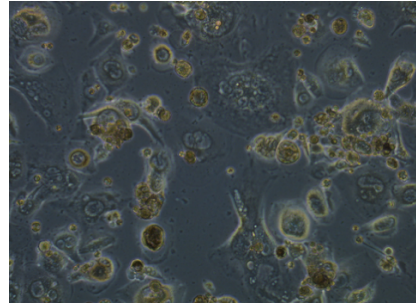




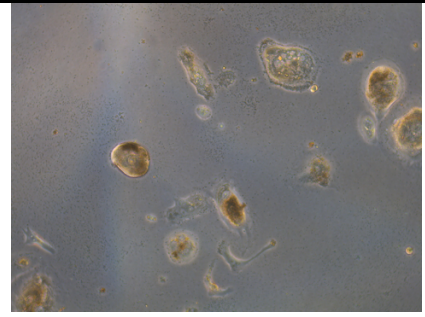
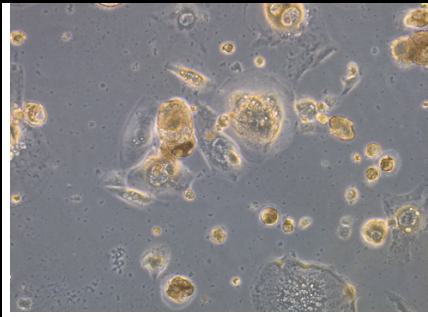
17.09 nM



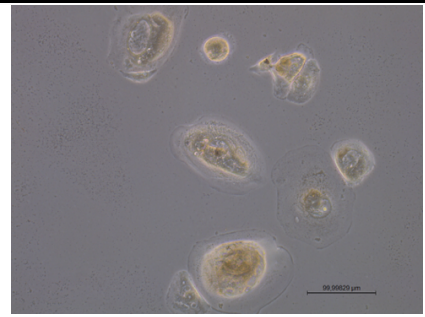
25.63nM

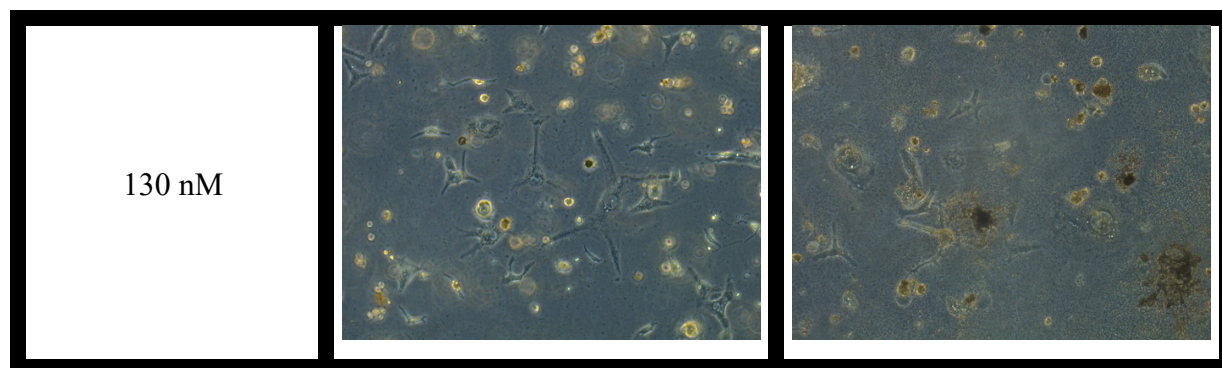


38.44 nM



86.50 nM



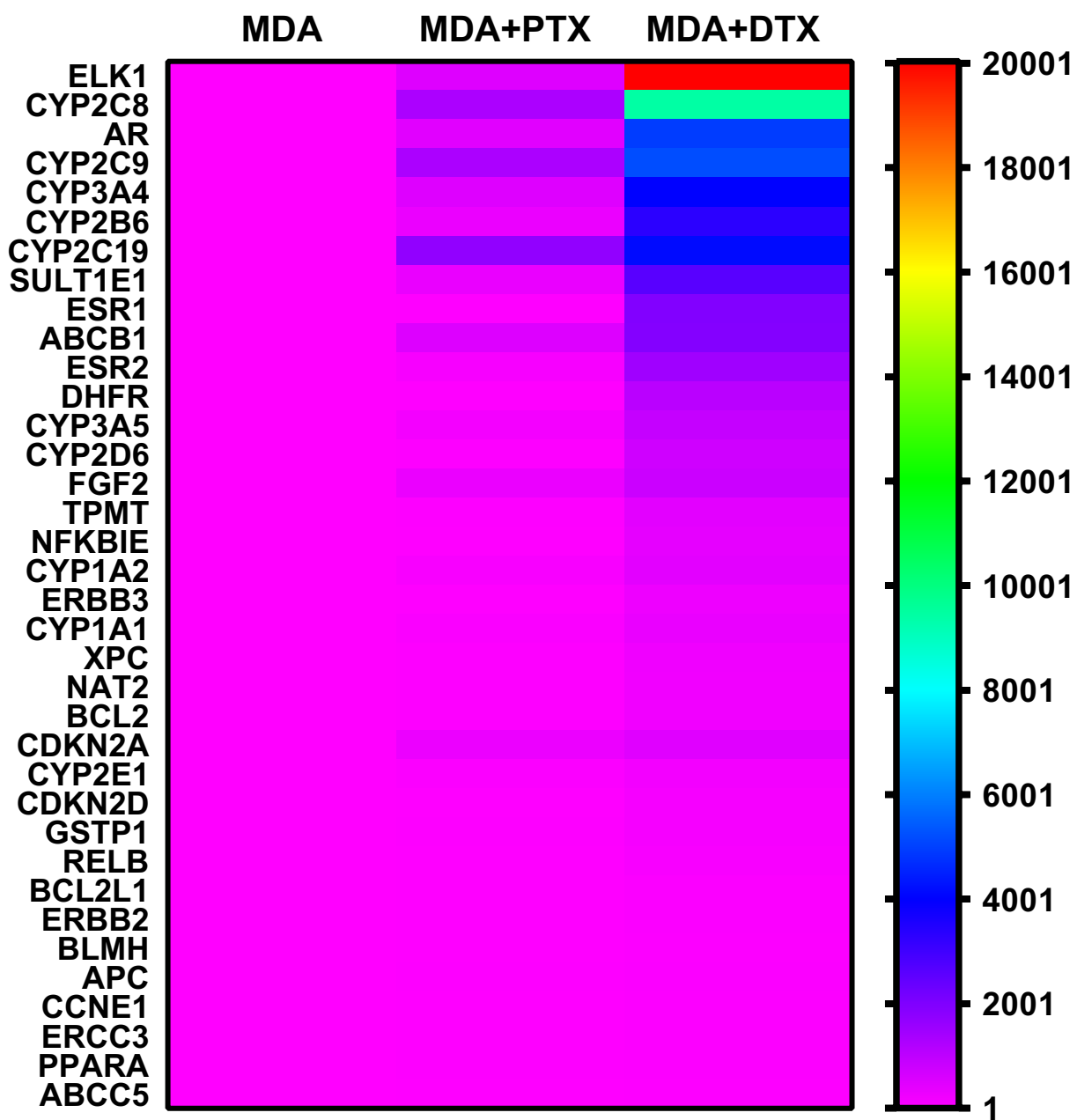


**Tabla 3. Resultado del microarreglo**

Cebadores	Genes
Resistencia a los medicamentos	ABCB1, BCL2, BCL2L1, GSTP1, ABCC5
Enzimas de metabolización	CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, DHFR, NAT2, SULT1E1, TPMT, BLMH
Daños y reparación del ADN	APC, ERCC3, XPC
Ciclo celular	CCNE1, CDKN2A, CDKN2D
Receptores de factores de crecimiento	ERBB2, ERBB3, FGF2
Receptores hormonales	AR, ESR1, ESR2, PPARA
Factores de transcripción	ELK1, NFKBIE, RELB

**Nota.** Clasificación funcional de los 36 genes con mayor expresión en relación con resistencia a medicamentos, metabolismo, reparación del ADN, ciclo celular, señalización y transcripción.

*Ilustración 2. Perfil transcriptómico comparativo de genes asociados a resistencia*



**Nota.** Mapa de calor que muestra la expresión relativa de genes asociados a resistencia en MDA-MB-231 bajo control, Paclitaxel y Docetaxel.