



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

**ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER DE MAMA POSITIVO PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO (RE) Y
EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA CRUZADA IN VITRO.**

Presentado por:

Suranis Saday Marín Quintero

C.I.P. 8-968-1887

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

2026



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“Establecimiento y caracterización de líneas celulares de cáncer de mama positivo para receptores de estrógeno (re) y evaluación de la resistencia cruzada in vitro”

Por:

Suranis Saday Marín Quintero
8-968-1887

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

Mgtr. Yamilka Díaz
Co-Asesor

Dra. Leyda Ábrego
Co-Asesor

DEDICATORIA

A mi bebé Taylor,

mi mayor motivación y la razón más grande para no rendirme. Llegaste a mi vida en medio de este proceso y, aunque no lo sabías, le diste un nuevo sentido a todo, te convertiste en mi fuerza cuando más lo necesitaba. Cada esfuerzo, cada noche larga y cada logro llevan tu nombre, porque todo lo hice pensando en ti, en tu futuro y en la vida que sueño construir a tu lado.

A mis padres, Amarelis e Isael,

por haberme dado la base de todo: la educación, los valores, la perseverancia y el apoyo constante desde niña. Gracias por cada sacrificio, por cada apoyo silencioso, por creer en mí incluso cuando yo misma dudaba, y por hacer posible que hoy esté cumpliendo esta meta. Este logro también es de ustedes.

A mi pareja, Ángel,

por estar presente en cada etapa de este camino, por tu amor, tu apoyo incondicional, tu paciencia y tu compromiso. Gracias por sostenernos, por estar presente para mí y para nuestro hijo, y por asumir tantas responsabilidades para que yo pudiera llegar hasta aquí. Sin ti, este camino no habría sido el mismo.

A mis hermanos, Eiranis y Jonathan,

por ser parte de mi vida, de mi motivación, por su cariño y por acompañarme, cada uno a su manera, en este recorrido.

Y a todos mis familiares,

gracias por cada palabra de ánimo, por cada “tú puedes”, por cada gesto de apoyo y por recordarme, en los momentos difíciles, que podía seguir adelante.

Hoy cierro esta etapa con el corazón lleno, porque este logro no es solo mío, es de todos ustedes que estuvieron conmigo, de una u otra forma, en cada paso.

A todos ustedes, con amor.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no habría sido posible sin el apoyo y la confianza de muchas personas e instituciones que, de una forma u otra, dejaron huella en este proceso.

En primer lugar, agradezco profundamente a Dios, porque sin Él nada de esto habría sido posible. Su presencia me sostuvo en cada etapa de este camino, incluso en los momentos en los que sentí dudas, cansancio o incertidumbre. Fue mi guía cuando no tenía claridad, mi fortaleza cuando las cosas se hacían difíciles y mi paz en medio del proceso. Cada logro alcanzado en este trabajo es también reflejo de su gracia y fidelidad.

Quiero expresar un agradecimiento profundo a la Dra. Erika Guerrero, investigadora postdoctoral del ICGES y mi asesora científica principal. Su acompañamiento constante desde el diseño experimental hasta los llamados de atención marcaron completamente la dirección y solidez de este proyecto. Su experiencia, paciencia y dedicación fueron un punto de apoyo enorme, y su propio trabajo, en el marco de su proyecto FID23-105, sirvieron de base e inspiración para la consolidación de esta iniciativa.

Agradezco profundamente al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) por brindar la infraestructura, los equipos y la logística necesarios para realizar este estudio. Honestamente, una experiencia que me transformó como estudiante y como futura profesional.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), por el financiamiento otorgado a través de la convocatoria de Nuevos Investigadores, el cual ha sido de mucho apoyo para el desarrollo de esta investigación.

A la Universidad de Panamá, especialmente a la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, por la formación académica que hizo posible que yo llegara hasta aquí y contara con las bases para enfrentar los retos del laboratorio con seguridad y curiosidad.

De igual manera, agradezco a la Asociación Panameña para el Avance de la Ciencia (APANAC), entidad ejecutora del proyecto, por su gestión, acompañamiento y por hacer más ligero el camino administrativo.

Y, finalmente, a todas las personas que estuvieron ahí, compañeros de laboratorio, amigos, familiares y que quizá no aparezcan en los documentos oficiales, pero sí estuvieron presentes en cada conversación, cada desvelo y cada pequeño logro que me empujó a seguir.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VIII
GLOSARIO	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
CAPÍTULO I:	8
MARCO TEÓRICO	8
1 Cáncer de Mama	9
2 Clasificación del cáncer de mama y subtipos moleculares	9
3 Biología de los receptores de estrógeno en el cáncer de mama	10
3.1 Estructura y función del ER	10
3.2 Vías de señalización RE	12
4 La línea celular MCF-7 como modelo para el cáncer de mama ERα+	14
4.1 Origen y características de las células MCF-7	14
4.2 Ventajas y limitaciones del modelo MCF-7	15
5 Quimioterapia en ERα+ Cáncer de Mama	17
	III

5.1 Mecanismo de acción del Topotecán	17
5.2 Mecanismo de acción de los Taxanos	19
6 Resistencia a fármacos en células cancerosas	20
6.1 Cambios genéticos y epigenéticos	20
6.2 Respuestas celulares adaptativas	22
6.3 Resistencia primaria vs. resistencia adquirida	23
6.4 Mecanismos de resistencia cruzada	24
CAPITULO II:	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1 Cultivo y expansión de células	26
2 Generación de Líneas Celulares MCF-7 Resistentes a Topotecan	27
3 Curva de crecimiento	28
4 Ensayo de MTT	29
5 Ensayo de Formación de colonias	30
6 qPCR	31
6.1 Extracción de ARN	31
6.2 Síntesis de ADN complementario (cDNA)	33
6.3 Cuantificación de expresión génica por qPCR (SYBR Green)	34
CAPÍTULO III:	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Resultados	38
1 Caracterización morfológica de las células MCF-7 tratadas con Topotecán	38
2 Curvas de crecimiento celular	41
2.1 Comportamiento proliferativo de las células MCF-7 control	41
2.2 Comportamiento proliferativo de las células MCF-7 tratadas con Topotecán	42
2.3 Comparación entre células MCF-7 control y tratadas con Topotecán	42
3 Efecto del topotecán sobre la formación de colonias en células MCF-7	43
4 Evaluación del impacto del Topotecán sobre la proliferación y supervivencia de células MCF-7 mediante ensayo MTT	45
4.1 Viabilidad celular	46

4.2 Citotoxicidad celular	46
5 Perfil de expresión génica mediante qPCR y evaluación de la resistencia cruzada	48
5.1 Señalización de daño en el ADN (Gráfica A)	49
5.2 Genes asociados a reparación del ADN (Gráficas B y C)	49
5.3 Regulación del ciclo celular y puntos de control (Gráfica D)	50
Discusión	52
1. Caracterización morfológica de células MCF-7 tratadas con Topotecán	52
2. Curvas de crecimiento: inhibición sostenida de la tasa proliferativa	53
3. Ensayo de formación de colonias	54
4. Ensayo de viabilidad celular (MTT)	55
5. Perfil de expresión génica y evaluación de resistencia cruzada	56
5.1 Señalización de daño en el ADN	56
5.2 Genes asociados a reparación del ADN	57
5.3 Regulación del ciclo celular y puntos de control	57
LIMITACIONES	58
CAPÍTULO IV:	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
Conclusión	61
Recomendaciones	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	75
ANEXO A. Protocolo de Preparación de Medio de Cultivo DMEM High Glucose	75
ANEXO B. Datos de las curva de crecimiento celular	76
ANEXO C. Fotografías microscópicas de Colonias	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diluciones de Topotecán a partir de una solución stock de 50 μ M.	27
Tabla 2. Lista de genes para análisis por qPCR, organizados según la vía biológica.	36

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Esquema del proceso de cultivo, mantenimiento y expansión de células MCF-7 bajo condiciones in vitro	26
Ilustración 2. Flujo experimental del ensayo de curva de crecimiento en células MCF-7 control y tratadas con Topotecán.	28
Ilustración 3. Esquema del ensayo de viabilidad celular (MTT) en células MCF-7.	30
Ilustración 4. Esquema del ensayo de formación de colonias en células MCF-7	31
Ilustración 5. Esquema del proceso de extracción de ARN en células MCF-7.	32
Ilustración 6. Esquema de la síntesis de cDNA a partir de ARN total.	34
Ilustración 7. Esquema del análisis de expresión génica mediante qPCR.	36
Ilustración 8. Cambios morfológicos inducidos por Topotecán en células MCF-7	38

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curvas de crecimiento celular de células MCF-7 control vs. tratadas con Topotecán.	43
Gráfica 2. Formación de colonias en células MCF7 control y tratadas con Topotecán (1µM)	45
Gráfica 3. Viabilidad celular en células MCF-7 tratadas con Topotecán	47
Gráfica 4. Citotoxicidad inducida por Topotecán en células MCF-7	48
Gráfica 5. Expresión relativa de genes en células MCF-7 control, tratadas con Topotecán y Topotecán + Paclitaxel.	51

GLOSARIO

Apoptosis: Proceso de muerte celular programada, que es crucial para el desarrollo y el mantenimiento del equilibrio en los tejidos.

Cáncer de mama: Tipo de cáncer que se origina en el tejido mamario y puede clasificarse según la presencia o ausencia de receptores hormonales.

Citotoxicidad: Capacidad de un agente para dañar o matar células, evaluada en experimentos in vitro.

Cultivo celular: Técnica de laboratorio para el crecimiento y mantenimiento de células en condiciones controladas fuera del organismo.

Curva de crecimiento celular: Representación gráfica del aumento en el número de células en función del tiempo, utilizada para estudiar el comportamiento celular.

Ensayo in vitro: Experimento realizado fuera de un organismo vivo, en condiciones controladas de laboratorio.

Fenotipo: Conjunto de características observables de una célula o un organismo resultantes de la interacción de su genotipo con el ambiente.

Líneas celulares: Células derivadas de tejido humano o animal que se cultivan en laboratorio para estudios científicos.

Marcadores moleculares: Biomoléculas utilizadas como indicadores de procesos biológicos normales, patológicos o respuestas a tratamientos.

Microtúbulos: Estructuras celulares compuestas de tubulina que forman parte del citoesqueleto y son esenciales para la división celular.

Proliferación celular: Proceso mediante el cual las células se dividen y aumentan en número.

Quimio resistencia: Capacidad de las células cancerosas para resistir los efectos de los medicamentos quimioterapéuticos.

Receptor de estrógeno (RE): Proteína en células que se une al estrógeno, regulando la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular.

Resistencia cruzada: Fenómeno donde una célula resistente a un tratamiento desarrolla resistencia a otros agentes terapéuticos con mecanismos similares o diferentes.

Taxanos: Grupo de agentes quimioterapéuticos, como paclitaxel y docetaxel, que interfieren con la división celular al estabilizar los microtúbulos.

Topotecán: Quimioterapéutico utilizado para tratar ciertos tipos de cáncer al inhibir la enzima topoisomerasa I.

RESUMEN

El cáncer de mama positivo para receptores de estrógeno alfa (ER α +) representa uno de los subtipos más frecuentes de esta enfermedad; sin embargo, la resistencia a fármacos continúa siendo un desafío importante en el tratamiento. La resistencia adquirida y la resistencia cruzada a diferentes agentes quimioterapéuticos pueden comprometer la eficacia de los tratamientos y favorecer la progresión tumoral. En este contexto, el estudio de los mecanismos celulares y moleculares asociados a estos procesos resulta fundamental para comprender la evolución de la enfermedad y desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la resistencia cruzada a quimioterapéuticos en células de cáncer de mama ER α + que desarrollaron resistencia adquirida a topotecán. Para ello, se generaron líneas celulares MCF-7 resistentes mediante exposición escalonada al fármaco. Posteriormente, se evaluaron cambios en el comportamiento celular mediante curvas de crecimiento, ensayos de viabilidad celular (MTT) y formación de colonias. Además, se analizó la expresión de genes asociados a señalización de daño en el ADN, reparación genómica y regulación del ciclo celular mediante qPCR.

Los resultados evidenciaron que la exposición prolongada a topotecán indujo adaptaciones celulares que modificaron el comportamiento proliferativo y la capacidad de supervivencia de las células tratadas en comparación con las células control. Las curvas de crecimiento mostraron cambios en la dinámica proliferativa, mientras que los ensayos de formación de colonias y viabilidad celular reflejaron alteraciones en la capacidad clonogénica y metabólica frente al tratamiento. El análisis de expresión génica reveló variaciones en genes relacionados con la respuesta al daño en el ADN, reparación genómica y control del ciclo celular, lo que sugiere la activación de mecanismos moleculares asociados a la adaptación celular frente a la presión farmacológica.

En conclusión, los resultados indican que la exposición prolongada a topotecán puede inducir modificaciones funcionales y moleculares en células MCF-7 que reflejan procesos de adaptación celular asociados al desarrollo de resistencia.

ABSTRACT

Estrogen receptor alpha-positive (ER α +) breast cancer represents one of the most common subtypes of this disease; however, drug resistance remains a major challenge in its treatment. Acquired resistance and cross-resistance to different chemotherapeutic agents can compromise treatment effectiveness and promote tumor progression. In this context, studying the cellular and molecular mechanisms involved in these processes is essential to better understand disease progression and to develop more effective therapeutic strategies.

The objective of this study was to evaluate cross-resistance to chemotherapeutic agents in ER α + breast cancer cells that developed acquired resistance to topotecan. To achieve this, resistant MCF-7 cell lines were generated through stepwise exposure to the drug. Subsequently, changes in cellular behavior were assessed using growth curves, cell viability assays (MTT), and colony formation assays. In addition, the expression of genes associated with DNA damage signaling, genomic repair, and cell cycle regulation was analyzed by qPCR.

The results showed that prolonged exposure to topotecan induced cellular adaptations that altered the proliferative behavior and survival capacity of treated cells compared with control cells. Growth curves revealed changes in proliferative dynamics, while colony formation and cell viability assays reflected alterations in clonogenic and metabolic capacity under treatment conditions. Gene expression analysis revealed variations in genes related to DNA damage response, genomic repair, and cell cycle control, suggesting the activation of molecular mechanisms associated with cellular adaptation to pharmacological pressure.

In conclusion, the results indicate that prolonged exposure to topotecan may induce functional and molecular modifications in MCF-7 cells that reflect cellular adaptation processes associated with the development of drug resistance.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo (ER α +) es el más diagnosticado en todo el mundo y, a pesar de los avances terapéuticos que han mejorado la supervivencia, la resistencia a fármacos sigue limitando las respuestas en pacientes con enfermedad metastásica avanzada (Kannan et al., 2025). El problema se agrava porque hay resistencia intrínseca y adquirida, la primera por falta de sensibilidad basal a ciertos agentes y la segunda que surge luego de exposiciones repetidas inicialmente efectivas (Gautam et al., 2025). Esto determina que tratamientos inicialmente efectivos se vuelvan inefectivos con el tiempo, con mayor recurrencia y que explican en parte las altas tasas de mortalidad por cáncer.

En este sentido, la creación de líneas celulares resistentes es una manera experimental de descifrar las bases moleculares y celulares involucradas. En particular, la creación de líneas MCF-7 resistentes a topotecán, un inhibidor de topoisomerasa I, permite estudiar mecanismos intrínsecos y posibles fenómenos de resistencia cruzada a taxanos como paclitaxel. Estos taxanos interfieren con la dinámica de los microtúbulos y su eficacia puede verse influenciada por cambios en isótipos tubulínicos, mutaciones en sitios de unión o modificaciones en proteínas asociadas a microtúbulos (Chen et al., 2023).

La propuesta experimental no solo plantea analizar si hay resistencia cruzada, sino también si se producen cambios funcionales que tienen importancia para el fenotipo tumoral. Generalmente, la resistencia a los quimioterápicos como el paclitaxel está mediada por procesos multifactoriales. La sobreexpresión de transportadores ABC, especialmente la P-glicoproteína (P-gp), es uno de los más destacados. Estas bombas expulsan el medicamento de manera activa del interior celular, lo que disminuye su concentración efectiva en el interior de las células (Gautam et al., 2025). Esta ruta se ha visto repetidamente como una respuesta adaptativa frente a taxanos y otros agentes, tales como vincristina o doxorubicina. En efecto, investigaciones comparativas con modelos como MES-SA y variantes MCF-7 revelan que otros compuestos derivados, tales como cabazitaxel, podrían poseer una actividad más elevada, pero también estar sujetos a la P-gp, que puede ser regulada mediante inhibidores particulares (Duran et al., 2015).

Por otra parte, también se ha comprobado que los procesos regulados por ARN no codificantes largos (lncRNAs) tienen un impacto significativo en la resistencia a taxanos. Estos lncRNAs tienen un papel en el aumento del eflujo de medicamentos, la inhibición de

la apoptosis y el fortalecimiento de vías proliferativas y transiciones epitelio-mesenquimáticas (EMT), modificando de esta manera cómo las células responden al tratamiento (Chen et al., 2023). La importancia biológica no se encuentra solamente en su rol mecanístico, sino también en su posible aplicación como biomarcadores diagnósticos tempranos o pronósticos, e incluso como blancos terapéuticos directos para contrarrestar resistencias establecidas.

Los modelos MCF7 que han sido tratados continuamente con fotosensibilizadores específicos han demostrado que es posible aislar clones, cuyas características genéticas y fenotípicas aportan pistas sobre vías de resistencia cruzada que, están menos exploradas en la literatura científica. Además, este enfoque nos podría guiar hacia la identificación de combinaciones farmacológicas óptimas para el tratamiento (Aniogo et al., 2022)

Por lo tanto, las pruebas experimentales que hemos propuesto, que incluyen ensayos de viabilidad celular, curvas de crecimiento e interrogación molecular tienen un objetivo claro: establecer una conexión verificable entre los cambios fenotípicos y la modulación de marcadores genéticos o epigenéticos que, como sabemos, están implicados en la Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR). Nuestro propósito es establecer un vínculo entre genes reguladores clave y los parámetros cuantitativos que obtendremos al exponer estas células, de forma controlada a topotecán y paclitaxel (Gautam et al., 2025).

Además, la implementación rigurosa de estos ensayos nos permitirá evaluar si las resistencias detectadas pueden ser revertidas mediante combinaciones racionales de fármacos o intervenciones específicas dirigidas. Este trabajo aborda un doble propósito; por un lado, buscamos aportar conocimientos fundamentales acerca de las rutas moleculares implicadas en la resistencia cruzada entre inhibidores de la topoisomerasa I y taxanos en el subtipo ER α +. Por otro lado, pretendemos ofrecer información valiosa para el diseño de estrategias clínicas más efectivas. Creo que la sinergia entre una comprensión detallada del mecanismo, que incluye incluso aspectos estocásticos propios del proceso de selección celular descrito en modelos paralelos MCF-7, y su potencial aplicación clínica representa un compromiso sólido entre la investigación básica y su impacto traslacional (McDermott et al., 2014).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo (ER α +) representa un desafío importante en oncología, especialmente a medida que se desarrolla resistencia a las terapias habituales (Castellanos Ledesma Beatriz Alejandra, 2018). Esta resistencia puede ser primaria o adquirida, la resistencia adquirida a las drogas quimioterapéuticas como el Topotecan restringe la efectividad del tratamiento y disminuye las opciones terapéuticas, lo que resulta en tasas de supervivencia más bajas (Palacios Navarro, 2022). Estudios anteriores han indicado que la resistencia cruzada a múltiples fármacos es una complicación habitual en el tratamiento del cáncer de mama ER α (Barbosa Gómez, 2022), lo que hace que sea necesario investigar los mecanismos moleculares responsables de esta resistencia.

Este proyecto es consistente con los esfuerzos para mejorar la atención del cáncer de mama, al centrarse en la manipulación experimental mediante la exposición controlada a agentes quimioterapéuticos, lo que permitirá observar los efectos en variables dependientes como la resistencia adquirida, la expresión génica y el ciclo celular; identificando biomarcadores de resistencia y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento (Valdez, 2020). A largo plazo, pretendemos aportar nuestros hallazgos al desarrollo de tratamientos personalizados en función del perfil molecular del tumor (Carbonell, 2023).

Esta propuesta surge, debido a la necesidad de comprender e interpretar los mecanismos de resistencia a nivel molecular, y la realidad es que utilizar modelos celulares y métodos analíticos avanzados nos puede facilitar el camino para lograrlo (Palacios Navarro, 2022). El uso de líneas celulares resistentes se ha convertido en un modelo experimental indispensable para descifrar cómo y por qué surge la resistencia al Topotecan y a otros agentes como los taxanos. Cuando uno compara de manera cuidadosa la respuesta entre células sensibles y aquellas que ya han desarrollado resistencia, usando ensayos de viabilidad, citometría de flujo o análisis del ciclo celular, se pueden identificar las diferencias en las vías de señalización del receptor de estrógeno y su relación con los procesos de resistencia.

Establecer estas comparaciones es clave en la identificación de genes y vías de señalización asociados con la resistencia a Topotecan con el fin de desarrollar estrategias para superar esta resistencia. Considerando que el cáncer de mama es una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, y particularmente relevante en Panamá debido

a su alta incidencia, esta investigación puede tener un impacto significativo en la salud del país y contribuir al progreso científico (Arellano Acosta, 2021).

Esta investigación no solo busca aportar datos cuantitativos y cualitativos sobre la resistencia a tratamientos en cáncer de mama, sino también establecer un marco para el desarrollo futuro de estrategias terapéuticas más efectivas en el tratamiento del cáncer de mama ER α + resistente, aunque el conocimiento generado no tenga una aplicación inmediata en la práctica clínica, es fundamental para enfrentar uno de los desafíos más apremiantes en el tratamiento del cáncer, lo que justifica plenamente la realización de este estudio.

ANTECEDENTES

El cáncer de mama es una de las enfermedades más mortales en mujeres, y se diagnosticaron alrededor de 2,3 millones de nuevos casos y 685.000 muertes mundialmente en 2020, lo que consolida su posición como primera causa de cáncer entre las mujeres (Procuraduría Federal del Consumidor, 2021). Esta enfermedad representa un desafío importante para los sistemas de salud y la calidad de vida de las mujeres en todo el mundo (World Health Organization, 2021).

Dentro de sus subtipos, el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno alfa (ER α), que comprende aproximadamente el 70% de todos los casos, es impulsado por la señalización mediada por la hormona estrógeno (Wang et al., 2017; Smith et al., 2019). Su importancia es especialmente relevante por su alta incidencia y retos terapéuticos, pues tiene el potencial de generar resistencia a diversos agentes citotóxicos (González-Suárez et al., 2020; Johnson & Lee, 2022).

El cáncer de mama tiene considerables consecuencias socioeconómicas y psicológicas, desde el momento del diagnóstico hasta la supervivencia a largo plazo. Los síntomas psicológicos que se presentan con más frecuencia a nivel clínico son: hasta el 46.6% de las pacientes sufren depresión, el 56.9% ansiedad y el 51.9% estrés; estos se dan con mayor frecuencias en mujeres jóvenes, con historial psiquiátrico, de estatus socioeconómico bajo, desempleadas, y después de la mastectomía en comparación con la cirugía conservadora (Hessami et al., 2025; Penberthy et al., 2023). El diagnóstico y el tratamiento pueden llevar a problemas de adaptación, alteración de la imagen corporal, disfunción sexual, alteraciones del sueño o disminución de la salud general; esto ocurre sobre todo en el primer año tras el

diagnóstico, aunque con frecuencia los síntomas tienden a mejorar (Penberthy et al., 2023; Burstein & Winer, 2000).

El estado socioeconómico (SES) tiene un impacto importante en la supervivencia y el tratamiento del cáncer de mama. Las tasas de supervivencia son menores en mujeres con ingresos y educación más bajos, en parte debido a que tienen menos acceso a tamizajes tempranos como la mamografía, lo que resulta en diagnósticos tardíos y terapias menos eficaces. Las zonas con escasa educación y altos índices de pobreza también tienen tasas más altas de mortalidad, sin importar el SES individual. El cáncer de mama también puede causar problemas económicos, ya que el tratamiento es costoso, se pierde la capacidad para trabajar y se requiere cuidado, lo que impacta negativamente en la calidad de vida general. Las desigualdades en acceso a servicios de salud, factores ambientales, estilos de vida y educación contribuyen a estas disparidades (Sprague et al., 2011).

Es fundamental clasificar el cáncer de mama a nivel molecular, ya que posibilita la comprensión de la biología propia de cada tipo de tumor. De esta manera, el personal médico puede determinar qué tipo de cáncer está tratando para poder tomar decisiones terapéuticas personalizadas (Diana Schlamadinger, n.d.).

Los cuatro subtipos moleculares principales son: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido y triple negativo (o basal-like). Se caracterizan por la presencia de receptores hormonales (estrógeno y progesterona), HER2 y otros marcadores genéticos. Cada subtipo tiene sus propias características en cuanto a la agresividad del tumor, el pronóstico y la reacción ante los tratamientos. El subtipo luminal A usualmente presenta una evolución más lenta y un pronóstico más favorable, en cambio el luminal B es más agresivo y tiene un mayor riesgo de recaída. Esta clasificación permite a los oncólogos predecir el comportamiento del cáncer y elegir las terapias más favorables para cada paciente (Jamie DePolo, 2024).

La investigación biomédica y la aplicación de modelos in vitro son esenciales para identificar y emprender nuevos enfoques terapéuticos. Permiten a los científicos estudiar enfermedades a nivel molecular y celular, identificar posibles objetivos para la terapia y evaluar si los nuevos tratamientos son efectivos y seguros antes de probarlos en humanos en ensayos clínicos (Tosca et al., 2023). Los modelos in vitro, han revolucionado la investigación al hacer que puedan reproducir con más fidelidad que la que ofrecen los modelos in vivo más comunes la complejidad de los tejidos humanos que se desarrollan durante condiciones patológicas para una comprensión mucho más rápida y fácil tanto del mecanismo de la

enfermedad como del descubrimiento de biomarcadores y el cribado de fármacos (Seliger et al., 2022).

Además, estos modelos proporcionan una importante plataforma para disminuir el uso de animales en la experimentación según los principios de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) y promover la traducción de los descubrimientos preclínicos a la clínica (Urzi et al., 2023). No obstante, a pesar de las ventajas de los modelos in vitro, todavía existen limitaciones con respecto a la replicación de la fisiología de un organismo vivo y, por tanto, los resultados deben luego validarse utilizando modelos animales y ensayos clínicos (Tosca et al., 2023).

En Panamá, la personalización de tratamiento y la optimización de recursos sanitarios se ven limitadas debido a la ausencia de investigaciones locales sobre los mecanismos de resistencia. Este proyecto tiene como objetivo establecer y caracterizar líneas celulares de cáncer de mama ER α + resistentes a Topotecán, analizar la resistencia cruzada con Taxanos utilizando herramientas avanzadas de biología molecular (Chen et al., 2023; (Yang et al., 2000)

OBJETIVOS

Los objetivos de la investigación se describen a continuación:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la resistencia cruzada a quimioterapéuticos en células de cáncer de mama con alta expresión de receptor de estrógeno alfa con resistencia adquirida a Topotecan.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar líneas celulares resistentes a Topotecan a partir de líneas celulares de cáncer de mama con alta expresión del receptor de estrógenos alfa (ER α).
- Evaluar como el topotecan afecta el ciclo celular de las células de cáncer de mama (ER α) sensibles y resistentes.
- Estudiar la resistencia cruzada con taxanos en líneas celulares de cáncer de mama (ER α) resistentes a Topotecan.

CAPÍTULO I:

MARCO TEÓRICO

1 Cáncer de Mama

El cáncer de mama es una enfermedad compleja caracterizada por una proliferación celular anormal y descontrolada en el tejido mamario. Este tipo de cáncer es el más frecuente en mujeres de países desarrollados (Martinez et al., 2015). Esta neoplasia no solo implica un compromiso físico, sino también un impacto psicológico significativo en la calidad de vida de las pacientes (Díaz Pérez & Arriciaga Vázquez, 2022).

El cáncer de mama puede manifestarse de diversas maneras. Se clasifica en diferentes tipos basados en su origen y características histológicas.

2 Clasificación del cáncer de mama y subtipos moleculares

La clasificación del cáncer de mama ha experimentado una evolución significativa, pasando de enfoques basados únicamente en la morfología a sistemas más precisos fundamentados en perfiles moleculares, gracias al avance en tecnologías de expresión génica y caracterización inmunohistoquímica. Sin embargo, es interesante notar que, a pesar del auge de la genómica y transcriptómica de alta resolución, las categorías histomorfológicas mantienen su relevancia clínica porque permiten predecir patrones de evolución y respuesta a tratamientos (Reed et al., 2015).

El sistema molecular más ampliamente adoptado reconoce cuatro subtipos principales definidos por el patrón de expresión de receptores hormonales, estrógeno (ER), progesterona (PR), y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), junto con indicadores proliferativos como Ki-67 (Nascimento & Otoni, 2020; Vaz et al., 2024).

El subtipo Luminal A se caracteriza por ER y PR positivos, HER2 negativo y baja proliferación según Ki-67; representa un fenotipo más diferenciado, con mejor pronóstico y elevada sensibilidad a terapia endocrina. Por otro lado, el Luminal B comparte positividad para receptores hormonales pero añade HER2 positivo o bien preserva HER2 negativo acompañado de alta proliferación; este grupo muestra comportamiento clínico menos favorable y requiere habitualmente combinación entre terapia endocrina y citotóxica (Kinnel et al., 2023).

El subtipo HER2 enriquecido carece de expresión hormonal (ER-/PR-) pero presenta sobreexpresión o amplificación del oncogén HER2; este perfil se beneficia preferentemente de terapias anti-HER2 como trastuzumab o pertuzumab. Finalmente, el basal-like o triple

negativo (TNBC) no expresa ninguno de los tres marcadores mencionados (ER-, PR-, HER2-) y suele asociarse con alto grado histológico, elevada tasa proliferativa y opciones terapéuticas limitadas a quimioterapia convencional (Kannan et al., 2025; Saha & Lukong, 2025).

Recientemente se ha propuesto la inclusión de la categoría “HER2-low”, tumores con expresión baja de HER2 detectada por inmunohistoquímica sin cumplir criterios clásicos de positividad. Este subtipo podría beneficiarse de fármacos conjugados anticuerpo-droga diseñados para esa baja densidad antigénica (Kannan et al., 2025), aunque todavía no se incorpora sistemáticamente en las clasificaciones convencionales. Sin embargo, su reconocimiento clínico está en aumento, planteando nuevas posibilidades terapéuticas.

El esquema de clasificación basado en un panel inmunohistoquímico de ER, PR, HER2 y Ki-67 resulta accesible y eficaz para la práctica clínica habitual y es consistente con los perfiles genómicos que dieron origen a la clasificación molecular actual (Nascimento & Otoni, 2020). Estudios pioneros demostraron que firmas transcriptómicas específicas separaban tumores en estos mismos grupos, correlacionando patrones génicos con pronóstico diferencial y respuesta sistémica prevista. Los genes conductores implicados comprenden desde reguladores nucleares hormonodependientes hasta proteínas accesorias del ciclo celular o moduladores estructurales.

Cabe resaltar que la heterogeneidad intrínseca del cáncer de mama condiciona que cada subtipo sea todavía una agrupación amplia dentro de la cual existen variaciones importantes. Por ejemplo, un Luminal B HER2 negativo presenta diferencias sustanciales frente a su contraparte HER2 positiva en cuanto a indicaciones precisas para quimioterapia adyuvante. De igual modo, no todos los TNBC son estrictamente basal-like: algunos muestran perfiles moleculares distintos que podrían responder selectivamente a inhibidores específicos fuera del alcance habitual para triple negativos clásicos (Al-thoubaity, 2020).

3 Biología de los receptores de estrógeno en el cáncer de mama

3.1 Estructura y función del ER

El receptor de estrógeno alfa (ER) es una proteína modular cuya arquitectura se compone de seis dominios estructurales con funciones diferenciadas que forman el núcleo de su actividad como factor de transcripción y mediador de señales rápidas dependientes de estrógeno. Estos dominios incluyen la región A/B, también denominada dominio de activación función 1 (AF-

1), la región C o dominio de unión al ADN (DBD), la región D o bisagra, y las regiones E y F que abarcan el dominio de unión al ligando (LBD) y la activación función 2 (AF-2) (P. Chen et al., 2022) (Anbalagan & Rowan, 2015). Cada uno de ellos contribuye de manera distinta a la regulación génica, interacción con cofactores y respuesta a modificaciones postraduccionales.

La región N-terminal A/B participa de forma importante en la actividad del receptor independiente de la unión al ligando. Desde el punto de vista estructural, presenta una homología baja con ER β y muestra un grado de desorden mayor, lo que, podría otorgarle cierta flexibilidad para interactuar con distintos co-reguladores según el contexto celular (Sellitto et al., 2020). Además, concentra varios residuos susceptibles a modificaciones postraduccionales, en particular fosforilaciones, que ajustan su capacidad transcripcional incluso en ausencia de unión directa al estrógeno (Anbalagan & Rowan, 2015).

Por su parte, el dominio C muestra alta identidad con ER β , contiene dos estructuras tipo “zinc finger” y se encarga tanto de la dimerización como del reconocimiento específico de secuencias en el ADN (Sellitto et al., 2020). La bisagra o dominio D funciona como elemento flexible que conecta la porción central (C) con el extremo C-terminal (E/F). Este diseño permite ajustar la orientación relativa entre el módulo de unión al ADN y el LBD cuando el receptor interacciona dinámicamente con promotores génicos u otros componentes del complejo transcripcional (P. Chen et al., 2022).

La región E equivale al LBD/AF-2; adopta una estructura muy conservada tras la unión del ligando, lo que favorece la interacción precisa con coactivadores y represión por correpresores según el contexto celular (Anbalagan & Rowan, 2015). En ER β , este dominio comparte aproximadamente un 55% de similitud estructural con ER α , pero su bolsillo para ligandos es más pequeño y presenta diferencias en los residuos aminoacídicos del borde cavitario, lo cual puede cambiar su afinidad por moduladores selectivos (Sellitto et al., 2020). El dominio F, menos estudiado, está asociado con funciones represoras sobre ciertas actividades del receptor.

Desde un punto de vista funcional, ER opera mediante mecanismos genómicos y no genómicos. Los genómicos dependen de su localización nuclear y activación transcripcional directa tras unirse a elementos de respuesta a estrógeno (ERE) en genes blanco (Toker et al., 2025). Esto conlleva el reclutamiento de coactivadores como SRC3 o CBP/p300, cuyo acoplamiento depende de patrones específicos de fosforilación, por ejemplo, la fosforilación

en Ser118 que promueve interacciones estables y aumenta la sensibilidad a E2 mediante activación continua de MAPK. La pérdida de fosforilaciones como Ser118 o Ser167 afecta negativamente la unión al ADN y puede emular fenotipos más agresivos típicos de tumores ER α negativos (Anbalagan & Rowan, 2015).

Las acciones no genómicas implican tráfico a membranas plasmáticas donde ER interactúa con complejos adaptadores activando cascadas como ERK/MAPK o PI3K/AKT, contribuyendo a procesos proliferativos y migratorios complementarios a los efectos transcripcionales. También existen receptores relacionados como GPER1, localizado en membrana endoplasmática, que responde rápidamente a estrógenos y modula estas mismas vías (P. Chen et al., 2022).

Además, la fosforilación regula mecanismos independientes del ligando mediante sitios como S46/47, S282, S294 y S559, conectando vías externas con cambios conformacionales internos que definen estados activos alternativos. Por ejemplo, Src promueve fosforilaciones clave (como Ser167) que aumentan la asociación del receptor con promotores y programas transcripcionales específicos (Anbalagan & Rowan, 2015).

Fisiológica y patológicamente, ER α coordina programas extensos vinculados a replicación, reparación del ADN y progresión del ciclo celular, regulando genes para factores nucleares, enzimas metabólicas y receptores de otras vías hormonales o paracrinas. Esta amplia función explica por qué alteraciones mínimas en sus dominios impactan considerablemente en fenotipos tumorales observados experimentalmente.

3.2 Vías de señalización RE

El receptor de estrógeno alfa (ER α) es un factor de transcripción nuclear que regula la expresión de genes esenciales para la multiplicación y la supervivencia de las células, especialmente en cánceres hormonodependientes como el de mama (Tecalco-Cruz et al., 2022). Cuando se une al estrógeno 17 β -estradiol (E2), ER α crea homodímeros y migra al núcleo, donde se une a elementos de respuesta a estrógenos en el ADN, reclutando coactivadores para activar la transcripción de genes asociados con la progresión celular, ciclo celular y supervivencia (Kulkoğlu & Madak-Erdogan, 2016).

ER α modula otras vías de señalización como PI3K/AKT y MAPK, relacionadas con crecimiento tumoral, migración celular y la resistencia a la apoptosis (Liu et al., 2020). La activación simultánea de MAPK y PI3K/Akt, la cual es provocada con frecuencia por

receptores tirosina quinasa como el receptor de estrógeno alfa (ER α) y HER2, favorece que las células cancerosas escapen a la muerte celular programada y continúen proliferándose (Li et al., 2021).

Asimismo, estas rutas mantienen comunicación cruzada: Akt tiene la capacidad de activar o inhibir elementos de MAPK y viceversa, lo que permite regular tanto la duración como la intensidad de las señales (Braicu et al., 2019). Para mantener un balance en la proliferación y supervivencia, por ejemplo, la señalización de PI3K/Akt puede suprimir la sobreactivación del MAPK (Braicu et al., 2019). No obstante, en el cáncer de mama, las desregulaciones posibilitan que los dos caminos se activen de manera constante y sin regulación, lo cual propicia una resistencia a tratamientos hormonales y quimioterapéuticos, así como una mayor agresividad del tumor (Braicu et al., 2019).

El rol de ER α en la proliferación se demuestra a través de su regulación de genes fundamentales para el avance del ciclo celular, como p53, p21, PCNA y E2F1, lo que favorece la transición y multiplicación celular en células malignas de mama (Liao et al., 2014). La expresión aumentada de ER α se relaciona con un aumento en factores como las ciclinas y NF- κ B, que impulsan la proliferación y agresividad del tumor (Liu et al., 2020). Por otro lado, ER α también se relaciona con receptores tirosina quinasa, produciendo señales no genómicas rápidas que ayudan a las células a sobrevivir y adaptarse a las terapias (P. Chen et al., 2022).

El receptor ER α no solo promueve la proliferación de las células sino que además favorece la supervivencia al activar mecanismos anti-apoptóticos y la regulación de proteínas de señalización que evitan la muerte celular programada. Por ejemplo, ER α favorece la expresión de neuroglobina, una proteína que promueve la supervivencia celular y brinda protección frente al estrés en células de cáncer de mama y otros tipos de neoplasias. Estas funciones convierten al ER α un actor fundamental en la progresión del tumor y un blanco terapéutico fundamental para la terapia del cáncer de mama positivo para receptor hormonal (Fiocchetti et al., 2014).

4 La línea celular MCF-7 como modelo para el cáncer de mama ER α +

4.1 Origen y características de las células MCF-7

La línea celular MCF-7, derivada de carcinoma ductal de mama humano metastásico, es uno de los modelos experimentales más empleados para investigar cáncer de mama con receptores hormonales positivos debido a su estabilidad genotípica y fenotípica bajo condiciones estándar de cultivo. Establecida en 1970 a partir de una paciente de 69 años con metástasis pleural que exhibía una expresión significativa del receptor de estrógeno alfa (ER), esta línea ha mantenido consistentemente dicho fenotipo a lo largo de las décadas, permitiendo modelar terapias endocrinas y explorar mecanismos de resistencia primaria y adquirida frente a inhibidores hormonales y citotóxicos (G. Chen et al., 2022).

Presenta morfología epitelial adherente con formación de monocapas confluyentes cuya proliferación depende en gran medida de la presencia de estrógenos en el medio. La expresión robusta y nuclear tanto de ER como del receptor de progesterona (PR) la clasifica dentro del subtipo luminal A, aunque su perfil proliferativo puede modificarse hacia un estado semejante al luminal B bajo presión farmacológica sostenida. Con tasas de proliferación moderadas en medios suplementados con suero fetal bovino (FBS), estas células demuestran sensibilidad a agentes antiestrogénicos, como tamoxifeno e inhibidores de aromatasas, facilitando la simulación in vitro de respuestas clínicas (Porrás et al., 2021).

Molecularmente, MCF-7 se observa que mantiene niveles relativamente elevados de genes bajo regulación del receptor de estrógeno, entre ellos CCND1, MYC, diversos E2F y FOXM1, que, como sabemos, son fundamentales para impulsar la progresión del ciclo celular (Porrás et al., 2021). Además, esta línea celular muestra una dependencia particularmente marcada de las fases S/G2/M cuando el ER se encuentra sobreexpresado, y ese detalle resulta esencial para comprender cómo responde a terapias dirigidas. Esta señalización estrogénica activa suele manifestarse en un incremento notable de marcadores proliferativos; sin embargo, dicho efecto es reversible cuando aplicamos inhibición hormonal, algo bastante ilustrativo del papel central del ER en este modelo. Sin embargo, existe una variabilidad adaptativa intrínseca, donde subclones pueden desarrollar resistencia a través de modificaciones en vías extragenómicas de ER o inducción de transportadores de la familia ABC, que incrementan la defensa celular (Zheng, 2017).

MCF-7 ofrece una flexibilidad experimental notable, ya que puede inducir subpoblaciones resistentes tras exposiciones repetidas a quimioterapéuticos como doxorubicina o paclitaxel, lo que termina generando alteraciones funcionales tanto en los perfiles transcriptómicos como en la organización del citoesqueleto (McDermott et al., 2014). Además, las sublíneas MCF-7/MX, obtenidas bajo presión selectiva con mitoxantrona, exhiben una sobreexpresión del transportador BCRP/ABCG2 regulada por estrógenos a través del ER, lo cual incrementa de forma considerable la tolerancia farmacológica. Este fenómeno, ilustra cómo las vías hormonales endógenas pueden modular la resistencia cruzada frente a agentes citotóxicos (Zheng, 2017). Mutaciones puntuales inducidas en residuos específicos de ER (S118A y S167A) generan variantes con alteraciones morfológicas, mayor crecimiento clonal y disminución de la susceptibilidad a apoptosis, lo que resalta la plasticidad del modelo ante modificaciones genéticas precisas (Anbalagan & Rowan, 2015).

La plasticidad epigenética también es un aspecto relevante; distintas condiciones nutricionales, composición medioambiental y estímulos físicos afectan patrones de expresión asociados a sensibilidad o resistencia farmacológica. En cultivos prolongados sin estrógenos exógenos, las células pueden mantener la proliferación mediante activación cruzada de las vías PI3K/AKT/mTOR y MAPK, replicando escenarios clínicos observados en tumores luminales con crecimiento sostenido tras supresión estrogénica. Este comportamiento adaptativo resulta especialmente útil para estudiar resistencia independiente de la función transcripcional clásica del receptor (Aguilar et al., 2010).

Finalmente, MCF-7 se caracteriza por una estabilidad cromosómica relativa en comparación con líneas triplemente negativas, lo cual facilita estudios reproducibles y permite aislar efectos específicos derivados de modificaciones en rutas moleculares definidas. Sin embargo, esta estabilidad no excluye la heterogeneidad clonal interna, pues subpoblaciones celulares pueden diferir en su tasa proliferativa y respuesta farmacológica según el historial del lote celular y condiciones ambientales durante pasajes sucesivos (G. Chen et al., 2022)

4.2 Ventajas y limitaciones del modelo MCF-7

El modelo MCF-7 ofrece ventajas relevantes para el estudio de cáncer de mama ER+ debido a su perfil molecular bien caracterizado, estabilidad genotípica y reproducibilidad experimental. La expresión nuclear constante de ER y PR bajo condiciones normales de cultivo nos permite analizar con precisión la respuesta a terapias endocrinas y cómo estas

interactúan con agentes citotóxicos en un contexto luminal, clínicamente común (G. Chen et al., 2022). La estabilidad de estos marcadores hormonales es, lo que nos permite analizar con precisión las rutas dependientes del receptor y seguir cómo se ajustan durante el proceso de adquirir resistencia a la quimioterapia. Sin ese mantenimiento sostenido, sería mucho más difícil interpretar la regulación mediada por el ER a lo largo de la adaptación celular.

Las MCF-7 suelen comportarse de forma bastante consistente frente a moduladores selectivos del ER o inhibidores enzimáticos, y eso facilita generar modelos resistentes mediante una presión farmacológica prolongada que, sintetiza con bastante fidelidad lo que ocurre en pacientes. Gracias a esta característica, se puede “simular” en el laboratorio la transición hacia la resistencia y, por lo tanto, desentrañar con mayor claridad los mecanismos moleculares que la sustentan (McDermott et al., 2014).

Otra ventaja sustancial reside en su tolerancia y facilidad para la manipulación genética y epigenética dirigida. Experimentos con edición génica en dominios funcionales específicos del receptor estrógeno o rutas relacionadas han mostrado alteraciones fenotípicas evidentes, permitiéndonos asociar mutaciones puntuales con variaciones precisas en proliferación, apoptosis y metabolismo. Además, la interacción entre señalización hormonal y sistemas universales como transportadores ABC, P-gp o BCRP puede investigarse con alto control experimental (Zheng, 2017).

Este modelo celular sigue siendo especialmente útil cuando buscamos desentrañar procesos multifactoriales, como la resistencia cruzada entre familias farmacológicas distintas. Debido a que MCF-7 conserva afinidad basal frente a inhibidores de topoisomerasa I y estabilizadores microtubulares, es factible inducir adaptaciones que afecten simultáneamente ambos blancos primarios. Este doble potencial especialmente con taxanos como paclitaxel, donde alteraciones en las isoformas de tubulina, junto con un aumento inducido de P-gp, terminan disminuyendo de forma notable la eficacia terapéutica (H. Chen et al., 2023).

Sin embargo, el modelo MCF-7 no está exento de limitaciones, y conviene tenerlas presentes antes de interpretar datos o intentar llevarlos al contexto clínico. Una de las más evidentes deriva de su marcada homogeneidad, muy distinta a lo que ocurre en un tumor mamario in vivo, donde coexisten múltiples subpoblaciones celulares y divergencias subclonales que, resultan imposibles de reproducir por completo en un cultivo monolítico. Las variantes

clonales internas existentes en MCF-7 pueden manifestar diferencias funcionales sutiles, pero no alcanzan el espectro completo encontrado in vivo (G. Chen et al., 2022).

Otra restricción importante es que MCF-7 reproduce solo de forma parcial los componentes esenciales del microambiente tumoral. En cultivo estándar, la línea prácticamente no cuenta con un estroma funcional, un infiltrado inmunitario activo ni gradientes hipóxicos prolongados, todos elementos que influyen de manera determinante en la resistencia primaria o adquirida a través de rutas como HIF-1 α , la remodelación vascular o las interacciones célula-matriz (Gautam et al., 2025). Sin estas influencias presentes en cultivo estándar bidimensional, ciertos comportamientos resistentes pueden ser subestimados o no manifestarse hasta trasladar los hallazgos a modelos tridimensionales o animales.

En cuanto a representatividad molecular, si bien MCF-7 refleja perfiles luminal A bajo condiciones iniciales, su plasticidad puede derivar hacia fenotipos más agresivos tipo luminal B ante presiones farmacológicas intensas. Este cambio progresivo puede alterar respuestas previstas según subtipo basal e interferir con comparaciones longitudinales si no se realiza caracterización periódica por inmunohistoquímica o transcriptómica (Vaz et al., 2024).

Finalmente conviene mencionar ciertas contingencias experimentales: variabilidad entre lotes distintos adquiridos comercialmente puede generar diferencias notables en comportamiento proliferativo o sensibilidad farmacológica pese a compartir denominación "MCF-7". Factores como número acumulado de pasajes celulares previo al inicio del experimento pueden impactar sobre expresión génica basal y capacidad adaptativa posterior (G. Chen et al., 2022).

5 Quimioterapia en ER α + Cáncer de Mama

5.1 Mecanismo de acción del Topotecán

Topotecán actúa como un inhibidor altamente específico de TOPI, y su efecto antitumoral se basa en estabilizar complejos enzima-ADN que normalmente existen solo por fracciones de segundo, bloqueando así el flujo normal de la replicación y la transcripción (Kollmannsberger et al., 1999). En condiciones fisiológicas, TOPI funciona como una proteína monomérica que alivia el estrés torsional generado cuando la doble hélice se desenrolla o se vuelve a compactar. Para lograrlo, introduce un corte transitorio en una de

las hebras, permite el paso controlado de la cadena complementaria y luego religa la ruptura de forma precisa (Yakkala et al., 2023). Gracias a este ciclo, la continuidad estructural y funcional del ADN se mantiene sin comprometer la integridad genómica. La intervención farmacológica con topotecán impide precisamente esta religación al unirse de forma estable al complejo intermediario entre topoisomerasa I y ADN, formando así una estructura ternaria que persiste más allá del tiempo fisiológico normal (Alshammari et al., 2022). Como consecuencia, cuando la horquilla de replicación avanza, encuentra estos cortes estancados y los transforma en roturas doble cadena (DSBs), desencadenando una parada brusca del ciclo celular y un daño letal que las células mamíferas no son capaces de reparar con eficacia. El bloqueo es particularmente irreversible en células en fase S, donde la síntesis de ADN se detiene definitivamente y las horquillas se destruyen, acompañándose además de supresión global de la transcripción (Kollmannsberger et al., 1999).

En un sentido molecular más detallado, el ataque farmacológico modifica las condiciones normales en las que TOPI genera un extremo 3'-hidroxilo libre sobre una hebra y un extremo 5' unido covalentemente a un residuo tirosina del sitio activo sobre la otra hebra cortada (Yakkala et al., 2023). Al impedir el paso inmediato hacia la religación mediante su ocupación del complejo ternario, topotecán amplifica el riesgo de colisión mecánica entre las proteínas implicadas en replicación o transcripción y estas estructuras bloqueadas. Dichas colisiones son esenciales para convertir lesiones monocatenarias inicialmente reversibles en roturas bicatenarias definitivas.

El mecanismo también implica efectos indirectos derivados del reconocimiento celular del daño. Estas rupturas inducen señales moleculares como la fosforilación masiva de histona H2AX alrededor del sitio lesionado, lo que recluta maquinaria reparadora especializada. Sin embargo, dada la persistencia del complejo ternario bloqueado por el fármaco, muchas rutas de reparación se ven inefectivas o derivan en repuestas aberrantes. En algunos casos se ha sugerido participación secundaria de vías como reparación por escisión o recombinación homóloga, aunque estas no logran restituir adecuadamente la integridad genómica frente a interferencia continua a nivel del tenedor replicativo (Sharma et al., 2024). Este panorama explica por qué el fármaco provoca detención duradera o muerte celular incluso tras exposiciones relativamente breves.

El impacto terapéutico está ligado tanto a concentración intracelular como a duración de exposición; estudios in vitro demuestran que incrementos prolongados favorecen daño

masivo y apoptosis sostenida en poblaciones altamente proliferativas (Kollmannsberger et al., 1999). Sin embargo, esta dependencia también plantea riesgos: células con mecanismos eficientes de eflujo activo, como sobreexpresión basal o inducida de P-glicoproteína, podrían reducir niveles efectivos evitando formación recurrente del complejo ternario patológico. Esto se conecta con consideraciones anteriores sobre resistencia cruzada frente a otras quimioterapias que afectan estructuras críticas pero comparten vulnerabilidad frente al eflujo aumentado.

En términos bioquímicos, cabe señalar que topotecán es derivado sintético aprobado por agencias regulatorias para múltiples indicaciones oncológicas precisamente por su capacidad única para bloquear religación monocatenaria sin requerir reconocimiento secuencial específico largo sobre el ADN. Su afinidad suficiente para formar un puente entre TOPI y ADN cortado lo distingue funcionalmente respecto a otros inhibidores menos estables (Alshammari et al., 2022). Este puente farmacológico constituye parte integral del golpe genotóxico que finaliza induciendo apoptosis mediada por vías intrínsecas mitocondriales tras acumulación crítica de DSBs. Existe evidencia experimental adicional sobre cómo las colisiones entre tenedores replicativos activos y estos complejos bloqueados propician también desligamiento o fragmentación irregular del aparato replicativo mismo.

5.2 Mecanismo de acción de los Taxanos

Los taxanos forman una familia de compuestos antitumorales que, básicamente, sabotean la dinámica normal de los microtúbulos y terminan ejerciendo efectos letales sobre células en división. Su acción central ocurre cuando se unen a β -tubulina dentro del microtúbulo, en una hendidura hidrofóbica conocida como sitio taxoide, compartido por fármacos como paclitaxel y docetaxel (H. Chen et al., 2023) (Azarenko et al., 2014). Esta unión desplaza el equilibrio entre dímeros libres de α/β -tubulina y polímeros ya formados, favoreciendo la estabilidad del microtúbulo e impidiendo su desensamblaje. Lo crítico es que, durante la mitosis, el huso depende de un ciclo muy preciso de ensamblaje y despolimerización; por eso, esta estabilización forzada termina bloqueando la progresión mitótica y desencadenando la muerte celular.

Al impedir esta dinámica, el fármaco bloquea a las células en las fases G2 y M del ciclo celular, generando mitosis aberrante o su cese completo y culminando en apoptosis (Murray et al., 2012). La fijación farmacológica al microtúbulo no implica un aumento significativo de masa o reorganización estructural global, sino una supresión de su dinámica en estadios

vulnerables como la división celular activa (Azarenko et al., 2014). Esto conduce a la activación sostenida del punto de control del ensamblaje del huso (spindle assembly checkpoint), cuyo objetivo es asegurar el alineamiento cromosómico correcto antes de permitir la transición a anafase. Bajo acción de taxanos, este control permanece activo por fallo mecánico para acomodar cromosomas, causando arresto mitótico prolongado y eventualmente catástrofe mitótica (Nami & Wang, 2018).

El impacto citotóxico no se limita a la fase mitótica. Está documentado que paclitaxel también afecta microtúbulos durante interfase, comprometiendo procesos como el transporte intracelular y la organización metabólica general (Murray et al., 2012). Tales alteraciones pueden inducir disfunción sostenida incluso en células que han evitado el arresto mitótico completo mediante fenómenos adaptativos como el “slippage” mitótico descrito para distintos estabilizadores de microtúbulos. Este slippage consiste en que, tras un bloqueo inicial mediado por el spindle assembly checkpoint, algunas células degradan paulatinamente ciclinas críticas (por ejemplo ciclina B) y salen de mitosis sin dividirse correctamente; este escape puede modular la respuesta final frente al fármaco.

6 Resistencia a fármacos en células cancerosas

6.1 Cambios genéticos y epigenéticos

Las modificaciones genéticas y epigenéticas en células cancerosas configuran la base de múltiples fenómenos de resistencia farmacológica, tanto primaria como adquirida. Estas alteraciones operan a diferentes niveles funcionales y afectan desde el blanco molecular del fármaco hasta redes regulatorias complejas que influyen sobre supervivencia, apoptosis y metabolismo celular. Dentro del espectro genético, estas modificaciones incluyen mutaciones puntuales en genes que codifican para proteínas críticas vinculadas con la eficacia terapéutica, tales como alteraciones en sitios activos que afectan la afinidad del receptor al fármaco. Por ejemplo, mutaciones o sustituciones de aminoácidos en β -tubulina, disminuyen la eficacia de los taxanos al reducir su reconocimiento (H. Chen et al., 2023). Alteraciones similares en la topoisomerasa I (TOPI) interfieren con la acción de inhibidores como el topotecán al impedir la formación de complejos ADN-enzima estables (Housman et al., 2014).

En contextos de presión terapéutica prolongada, las células desarrollan redundancia funcional en vías de señalización, favoreciendo la emergencia de clones resistentes con mutaciones en genes de respuesta al daño del ADN (DDR). Esto aumenta la diversidad genómica intratumoral y selecciona variantes que toleran mejor el estrés mitótico o la reparación de daños bicatenarios, dominando el tejido tumoral tratado. Aunque existen "callejones sin salida evolutivos" donde ciertas mutaciones dan ventajas temporales sin permitir adaptación futura, la combinación con cambios epigenéticos reversibles mantiene la plasticidad celular (Soragni et al., 2025).

Las modificaciones epigenéticas regulan la expresión génica sin alterar la secuencia DNA permanente, mediante mecanismos como metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas y regulación por ARN no codificantes (Gu et al., 2025). En particular, la hipermetilación del promotor ESR1 reduce la expresión del receptor hormonal, afectando la respuesta a terapias endocrinas en cáncer de mama ER+ (Kannan et al., 2025). Por otro lado, cambios en histonas modulan la accesibilidad transcripcional, activando oncogenes o reprimiendo rutas proapoptóticas esenciales para la eficacia quimioterápica. Los lncRNAs también participan activamente, modulando la dinámica microtubular y regulando transportadores ABC, integrando componentes estructurales y defensivos (H. Chen et al., 2023).

Esta interacción entre alteraciones genéticas y epigenéticas da lugar a perfiles multirresistentes complejos. Por ejemplo, células con mutaciones en tubulina que coexisten con hipermetilación en promotores proapoptóticos muestran resistencia simultánea a taxanos y apoptosis reducida tras daño quimioterápico (Neophytou et al., 2021). Además, adaptaciones epigenéticas pueden preceder y facilitar mutaciones estables, promoviendo la persistencia de clones resistentes. El microambiente tumoral también influye mediante estados hipóxicos que inducen modificaciones epigenéticas vía HIF-1, favoreciendo perfiles similares a células madre cancerosas con alta capacidad de resistencia.

Esta plasticidad epigenética complica el diseño de terapias dirigidas a blancos moleculares específicos, ya que las redes paralelas epigenéticas pueden sostener la viabilidad tumoral incluso si las mutaciones son revertidas (Gu et al., 2025). Por ello, se exploran combinaciones de inhibidores epigenéticos, como bloqueadores de DNMTs (DNA methyltransferases) y HDACs (histone deacetylases), junto con quimioterapia clásica,

buscando desestructurar la resistencia desde múltiples frentes. Sin embargo, su uso requiere control cuidadoso para evitar efectos adversos que podrían favorecer la progresión tumoral.

En modelos como MCF-7 ER+ resistentes a topotecán, es crucial determinar la proporción relativa de resistencia genética y epigenética para definir tratamientos racionales: clones con sobreexpresión epigenéticamente inducida de P-gp podrían beneficiarse de inhibidores específicos del transportador combinados con quimioterapia, mientras que aquellos con mutaciones estables requieren terapias alternativas dirigidas a blancos menos afectados. Esta coexistencia molecular genera heterogeneidad intratumoral, con subclones coexistentes que pueden mostrar diferentes respuestas a un mismo tratamiento, una realidad evidente incluso bajo condiciones experimentales controladas (Neophytou et al., 2021).

6.2 Respuestas celulares adaptativas

Frente a exposiciones prolongadas, las células también activan respuestas adaptativas más inmediatas, como incrementar el eflujo de fármacos, modulación del metabolismo, reparación aumentada del daño genómico, evasión de apoptosis y remodelación epigenética (Gu et al., 2025). Proteínas como P-glicoproteína (ABCB1), MRP1 (ABCC1) y BCRP (ABCG2) incrementan su expresión mediante rutas PI3K/AKT/mTOR, facilitando la expulsión del fármaco y aumentando la supervivencia celular (Dong et al., 2021). Estas respuestas adaptativas se manifiestan en cambios transcripcionales tempranos y modificaciones epigenéticas duraderas que fijan el fenotipo resistente (Kannan et al., 2025).

El aumento en la expresión de enzimas CYP, que desactivan quimioterapéuticos como taxanos antes de que alcancen concentraciones efectivas, complementa la defensa celular (Maloney et al., 2020). Asimismo, la reparación del daño genómico se intensifica mediante sobreexpresión adaptativa de factores como RAD51, mejorando la capacidad de reparar roturas bicatenarias y disminuyendo la letalidad del tratamiento (Grimsley et al., 2025).

La evasión de apoptosis se sostiene con la alteración de proteínas reguladoras como Bcl-2 y la activación constitutiva de NF- κ B, estabilizando la resistencia (Gu et al., 2025). El microambiente hipóxico también contribuye aumentando la expresión de genes antiapoptóticos y transportadores ABC mediante HIF-1. Cambios en modificaciones histónicas y la acción de lncRNAs regulan la expresión génica defensiva y la dinámica estructural, afectando la sensibilidad a fármacos (Kannan et al., 2025).

Estos procesos generan poblaciones celulares con alto grado de plasticidad fenotípica, capaces de alternar entre estados tolerantes y resistentes según las condiciones, facilitando la emergencia de clones resistentes completos (Iida & Okada, 2024). Así, las respuestas multifacéticas, que incluyen actividad exportadora, reparación eficiente, metabolismo adaptativo y evasión apoptótica, explican la resistencia cruzada observada entre agentes no relacionados químicamente pero que comparten nodos funcionales (Beretta et al., 2025).

Aunque los modelos 2D no replican completamente el microambiente tumoral *in vivo*, la simulación de factores como congestión proteica y estrés osmótico permite la activación persistente de vías MAPK/PI3K/AKT, consolidando fenotipos resistentes (Dong et al., 2021).

6.3 Resistencia primaria vs. resistencia adquirida

La resistencia primaria o intrínseca aparece cuando las propias células tumorales ya cuentan con mecanismos que las vuelven insensibles al tratamiento desde el primer contacto, incluso sin haber enfrentado antes el fármaco. Muchas veces, este comportamiento se asocia a mutaciones constitutivas en oncogenes o genes supresores que distorsionan rutas de señalización esenciales y mantienen un estado basal prácticamente refractario. En estos casos, las alteraciones genómicas preceden al tratamiento y se conservan de manera estable, lo que en la práctica impide obtener un efecto terapéutico apreciable desde las dosis iniciales (Gautam et al., 2025).

Este estado puede incluir mutaciones en receptores hormonales o proteínas involucradas en reparación del ADN que modifican el blanco del fármaco, como cambios en afinidad o activación de rutas compensatorias que bloquean la acción farmacológica. En contraste, la resistencia adquirida emerge como respuesta adaptativa progresiva al tratamiento, donde células inicialmente sensibles acumulan nuevas alteraciones inducidas por exposición prolongada al fármaco. Estos incluyen amplificaciones génicas, deleciones o mutaciones que reactivan vías alternativas para la supervivencia, permitiendo la expansión de clones resistentes en un ambiente terapéuticamente hostil.

La dinámica temporal distingue entre ambas: la resistencia intrínseca está presente desde el diagnóstico y condiciona la selección inicial del tratamiento, mientras que la adquirida aparece generalmente tras ciclos efectivos y provoca recaídas clínicas. Los modelos

experimentales han reproducido estas formas mediante dos estrategias principales: manipulación genética dirigida para introducir alelos específicos en líneas sensibles y selección in vitro o in vivo con exposiciones escalonadas a dosis crecientes del agente (Rosa et al., 2014). La primera reproduce perfiles genéticos clínicos, mientras que la segunda refleja mejor la heterogeneidad natural y la selección clonal estocástica observada en vivo, generando tanto resistencias altas como bajas clínicamente relevantes (McDermott et al., 2014).

6.4 Mecanismos de resistencia cruzada

La resistencia cruzada constituye un fenómeno en el que las adaptaciones adquiridas frente a un agente terapéutico confieren simultáneamente insensibilidad a otros fármacos, incluso de clases químicas distintas. En modelos como MCF-7 ER+, este proceso puede estar mediado por mecanismos celulares compartidos que funcionan como nodos clave dentro de la red defensiva tumoral contra compuestos citotóxicos. Por ejemplo, la sobreexpresión de transportadores ABC como P-glicoproteína (P-gp/ABCB1), MRP1 (ABCC1) o BCRP (ABCG2), inducida en la resistencia a fármacos como topotecán, también reduce eficazmente las concentraciones intracelulares de taxanos como paclitaxel y docetaxel (Kannan et al., 2025). Esta expulsión no discrimina por estructura química, manteniendo niveles subterapéuticos que comprometen la citotoxicidad de múltiples agentes (Postigo-Corrales et al., 2025).

Funcionalmente, una presión selectiva inicial, por ejemplo con inhibidores de topoisomerasa I, activa reguladores transcripcionales y epigenéticos que controlan genes de estos transportadores. La persistencia de su sobreexpresión convierte el fenotipo resistente en un estado protegido frente a múltiples compuestos expulsados por las mismas bombas. Estudios muestran que este patrón puede acompañarse de cambios en rutas proliferativas como PI3K/AKT/mTOR y MAPK, cuya activación sostenida aumenta señales de supervivencia y mecanismos antiapoptóticos, elevando la capacidad adaptativa frente a diversos fármacos (Kannan et al., 2025) (Gautam et al., 2025).

CAPÍTULO II:

MATERIALES Y MÉTODOS

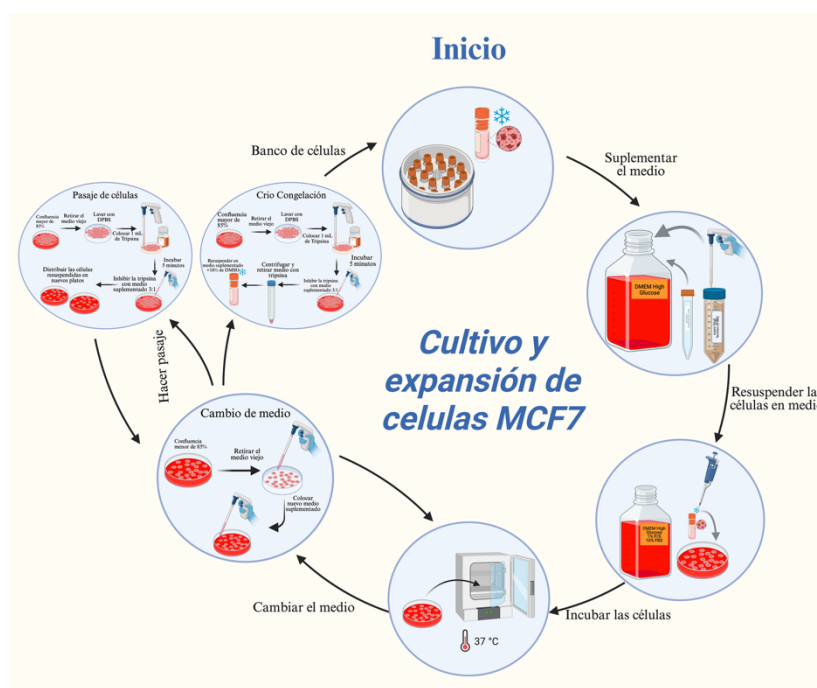
1 Cultivo y expansión de células

Las células MCF-7 wild type (MCF-7wt), conocidas por su estabilidad transcriptómica y dependencia funcional del receptor ESR1, se expandieron bajo condiciones estrictamente controladas utilizando Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM High Glucose; Gibco™), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco™) y 1% de penicilina-estreptomicina (P/S; Gibco™). Esta combinación favorece la preservación de la actividad transcripcional de ESR1, esencial en estudios de plasticidad tumoral (Jeselson et al., 2022).

Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Antes del pasaje, las células se lavaron con Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS; Gibco™) para reducir interferencias proteicas. El desprendimiento se efectuó mediante tripsina-EDTA 0.5 mM (Gibco™), seguido de neutralización en medio suplementado y pipeteo suave para mantener la integridad celular.

La expansión celular se mantuvo hasta alcanzar una viabilidad mayor al 85%, lo que permitió asegurar un número adecuado de células para los ensayos funcionales y macrológica (Gourley et al., 2019).

Ilustración 1. Esquema del proceso de cultivo, mantenimiento y expansión de células MCF-7 bajo condiciones in vitro



Nota. Esquema del cultivo y expansión de células MCF-7 que incluye etapas de descongelación, suplementación del medio, siembra, incubación, cambio de medio y pasaje celular en condiciones controladas (37 °C, 5% CO₂).

2 Generación de Líneas Celulares MCF-7 Resistentes a Topotecan

La generación de resistencia adquirida a topotecán se llevó a cabo mediante un protocolo escalonado de exposición continua durante seis meses. El proceso se inició con una concentración de 50 nM de topotecán, preparado en dimetilsulfóxido (DMSO; 0.1% final), y añadido al medio DMEM suplementado. La concentración del fármaco se incrementó progresivamente en un factor aproximado de 1.5 veces, ajustándose según la viabilidad y la capacidad adaptativa observada morfológicamente, hasta alcanzar una concentración final de 1 μ M. Este enfoque es congruente con modelos tradicionales de adquisición de resistencia a inhibidores de topoisomerasa I (Pommier et al., 2010).

El medio de cultivo se renovó cada 2–3 días utilizando pipetas serológicas estériles, retirando el medio agotado y reemplazándolo por medio fresco suplementado con la concentración correspondiente del fármaco. La preparación de las soluciones de topotecán se llevó a cabo con micropipetas de 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L, asegurando precisión en la medición de los volúmenes durante cada etapa del proceso.

Tabla 1. Diluciones de Topotecán a partir de una solución stock de 50 μ M.

Topotecan 50 μ M			
Niveles de Concentración	Concentración en nM	μ L en platos de 60mm	μ L en platos de 100 mm
1	50	6	10
2	75	9	15
3	112.5	13.50	22.5
4	168.75	20.25	33.75
5	253.13	30.38	50.625
6	379.69	45.56	75.938
7	569.53	68.34	113.906
8	854.30	102.52	170.859
9	1281.45	153.77	256.289

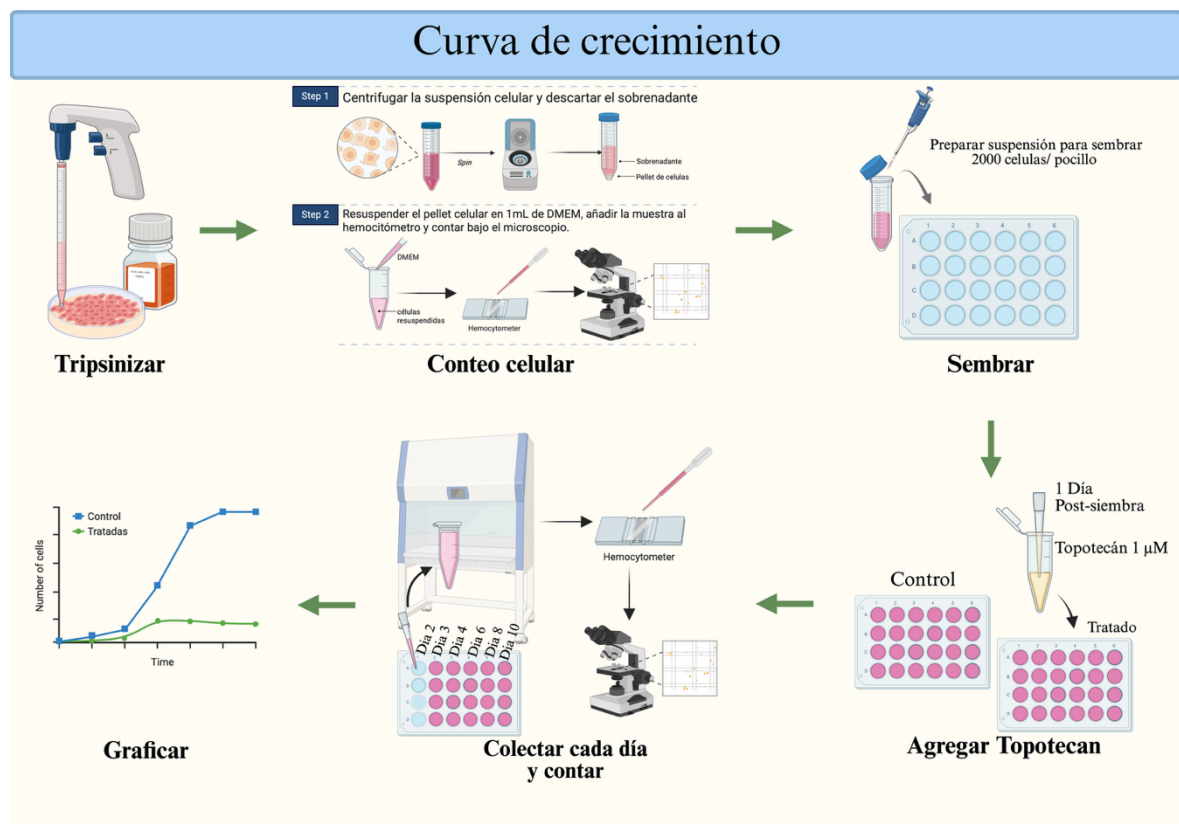
Nota. La tabla presenta las concentraciones utilizadas de Topotecán en nanomolar (nM) y los volúmenes en microlitros (μ L) de la solución stock de 50 μ M necesarios para su preparación en placas de cultivo de 60 mm y 100 mm. Las diluciones se realizaron de forma seriada para obtener un rango gradual de concentraciones para los tratamientos celulares.

3 Curva de crecimiento

Para evaluar la dinámica proliferativa de las células MCF-7 control y tratadas con topotecán, se sembraron 2,000 células por pocillo en placas de 24 pocillos utilizando DMEM suplementado con FBS al 10% y P/S al 1%. Para las células tratadas, el topotecán se añadió 1 día post-siembra a la concentración de 1 μ M. Las células se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂, y cada condición se trabajó por triplicado.

La cuantificación celular se realizó manualmente con un hemocitómetro o cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico Leica, se realizó en los días 2, 3, 4, 6, 8 y 10. El modelado de las curvas de crecimiento permitió identificar alteraciones en parámetros proliferativos asociados a la exposición prolongada a topotecán, incluyendo cambios en la tasa de duplicación y en la densidad máxima alcanzada, factores relevantes en estudios de adaptación farmacológica en líneas tumorales humanas (Pommier et al., 2010).

Ilustración 2. Flujo experimental del ensayo de curva de crecimiento en células MCF-7 control y tratadas con Topotecán.



Nota. Esquema del procedimiento experimental para la obtención de curvas de crecimiento en células MCF-7, incluyendo disociación celular, conteo con hemocitómetro, siembra a densidad definida, tratamiento con Topotecán y monitoreo diario de la proliferación celular.

4 Ensayo de MTT

El ensayo de MTT se realizó con el objetivo de evaluar la viabilidad celular y la actividad metabólica en células MCF-7 bajo tratamiento con topotecán. Para ello, las células control fueron previamente cultivadas en placas de 10 cm, posteriormente lavadas con DPBS y disociadas mediante tripsina-EDTA, asegurando una suspensión celular homogénea. Tras la neutralización de la tripsina, las células se resuspendieron en medio DMEM y se ajustó la densidad celular a 2.88×10^5 células/mL mediante conteo celular.

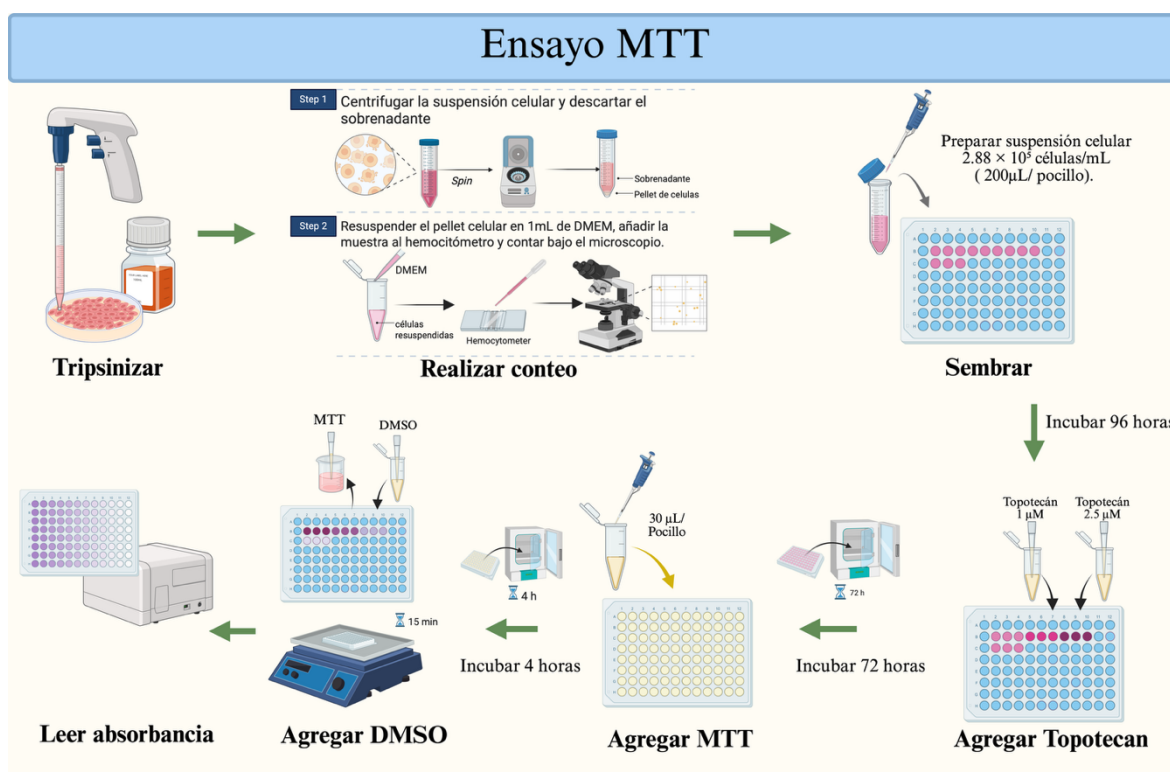
De esta suspensión se sembraron 200 μ L por pocillo en placas de 96 pocillos, procurando una distribución uniforme de las células. Las placas se incubaron durante un periodo de estabilización de 96 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, con el fin de permitir la adecuada adhesión celular y la recuperación metabólica previa al tratamiento.

Una vez finalizado este periodo, las células se dividieron en tres condiciones experimentales: control sin tratamiento, tratamiento con 1 μ M de topotecán y tratamiento con 2.5 μ M de topotecán. Las células se incubaron bajo estas condiciones durante 72 horas, tiempo seleccionado para evaluar el efecto del fármaco sobre la viabilidad celular.

Al finalizar el tratamiento, se añadieron 30 μ L de solución de MTT a cada pocillo y las placas se incubaron durante 4 horas, permitiendo la reducción del tetrazolio por las enzimas mitocondriales activas y la formación de cristales de formazán. Posteriormente, el medio fue retirado y los cristales se solubilizaron mediante la adición de DMSO (Sigma-Aldrich™) al 10%, obteniendo una solución homogénea. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas tipo ELISA.

Este procedimiento permitió evaluar de manera precisa las diferencias en actividad metabólica y viabilidad entre las condiciones control y tratadas con topotecán, coherente con el principio del ensayo basado en la reducción de tetrazolios y con su aplicación en estudios recientes sobre proliferación y respuesta farmacológica en células de cáncer de mama (Huang et al., 2021; Stockert et al., 2018; Fotakis & Timbrell, 2020).

Ilustración 3. Esquema del ensayo de viabilidad celular (MTT) en células MCF-7.



Nota. Representación esquemática del ensayo de viabilidad celular (MTT), que incluye siembra de células, tratamiento con Topotecán, incubación, adición de MTT, solubilización con DMSO y lectura de absorbancia.

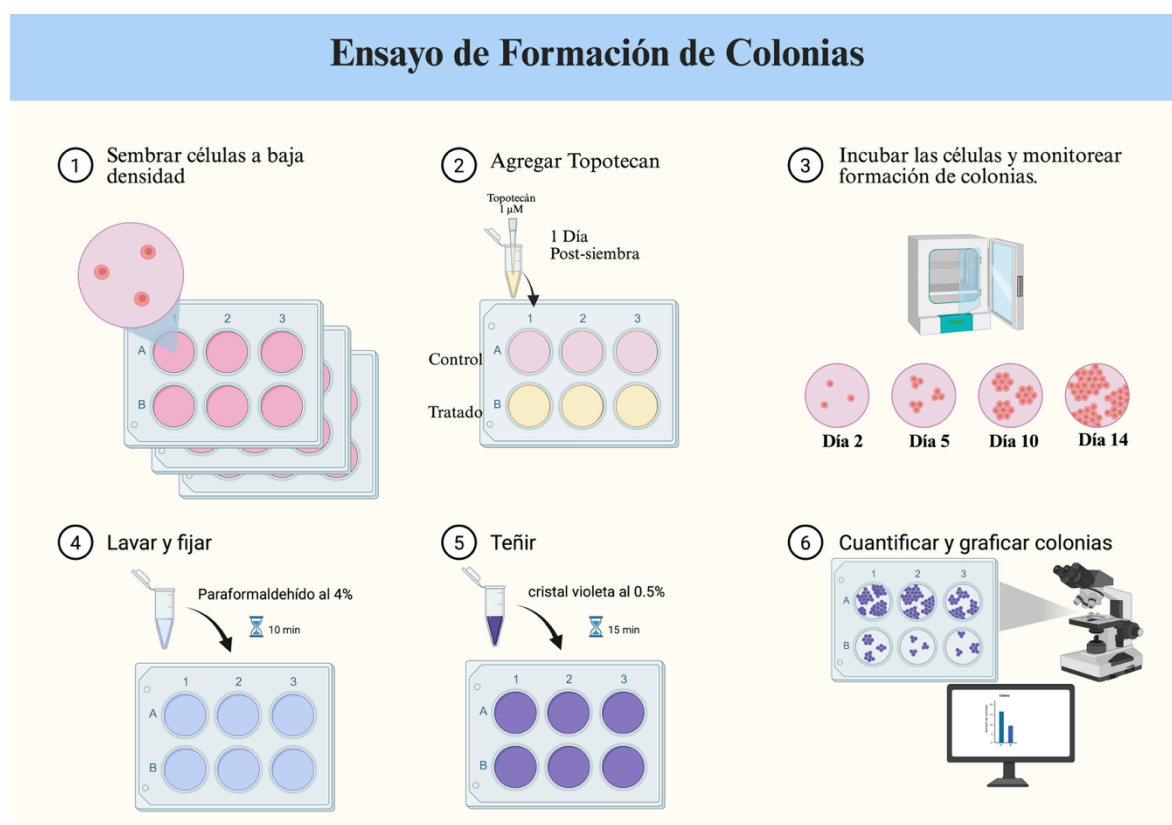
5 Ensayo de Formación de colonias

El ensayo de formación de colonias (análisis clonogénico) se llevó a cabo para evaluar la capacidad de supervivencia y proliferación a largo plazo de células MCF-7 control y tratadas con topotecán. Previamente, las células fueron cultivadas en condiciones estándar y posteriormente sembradas a baja densidad en placas de 6 pocillos, utilizando medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) y penicilina/estreptomicina (P/S), con el fin de favorecer el crecimiento de colonias derivadas de células individuales.

Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante un periodo de 10 a 14 días, tiempo necesario para permitir la expansión clonal. Durante este periodo, se evitó que la confluencia superara el 70–80%, asegurando así condiciones adecuadas para la formación de colonias bien definidas. El medio de cultivo se reemplazó cada 2–3 días para mantener un suministro adecuado de nutrientes y factores de crecimiento.

Al finalizar el periodo de incubación, el medio fue retirado y las colonias se fijaron mediante incubación con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0.5% durante 15–20 minutos, lo que permitió una visualización clara de las colonias formadas. Tras el enjuague y secado, se realizó el conteo manual mediante microscopio Leica (Leica Suite v4) considerando únicamente colonias que presentaran ≥ 50 células, siguiendo las guías actuales para ensayos clonogénicos en cáncer de mama (Rafehi et al., 2020).

Ilustración 4. Esquema del ensayo de formación de colonias en células MCF-7



Nota. Esquema del ensayo de formación de colonias que incluye siembra a baja densidad, tratamiento con Topotecán, incubación prolongada, fijación, tinción y cuantificación de colonias.

6 qPCR

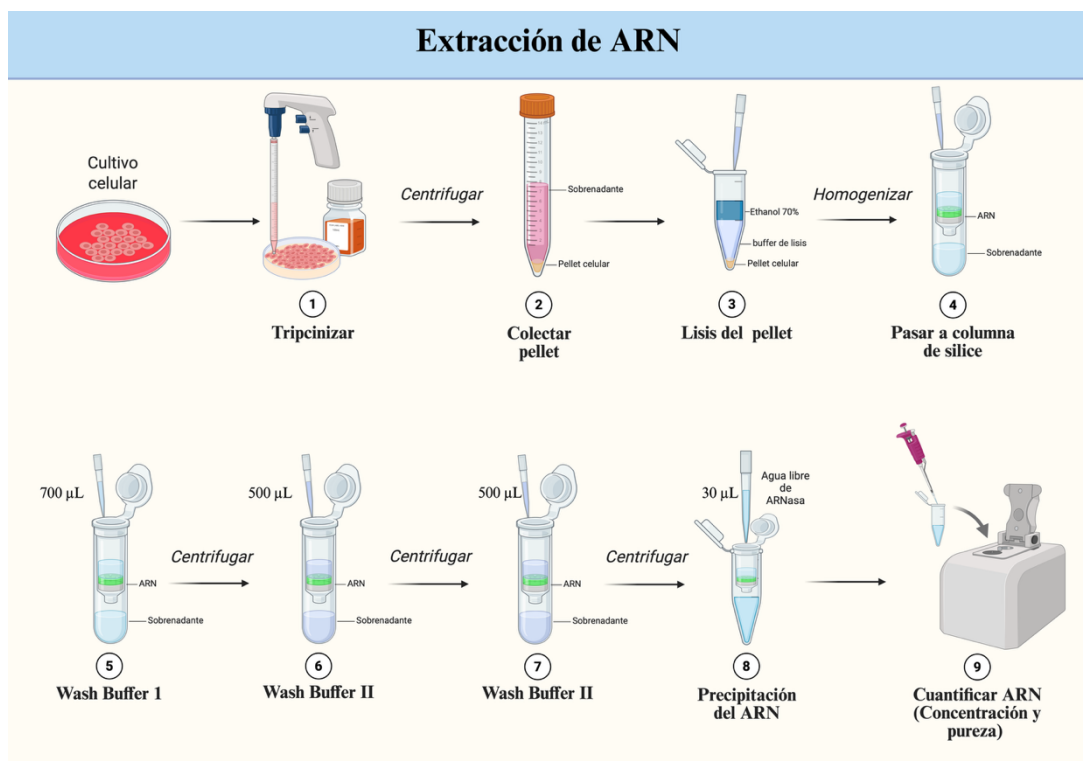
6.1 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, primero se recolectaron las células MCF-7 (MCF7 control, MCF-7 con Topotecán y MCF-7 con Topotecán +Paclitaxel) a partir de cultivos en placas de 10 cm, mantenidos en confluencias aproximadas del 70–80%.

En cada condición, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las monocapas con 5 ml de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS; Gibco™) para eliminar restos de medio y suero. Posteriormente, se procedió a la colecta de las células mediante tripsinización. Tras retirar el DPBS, se añadió 1 ml de tripsina-EDTA 0.25% y se incubó 5 minutos a 37 °C hasta observar el desprendimiento. La reacción se neutralizó con 3 ml de medio completo, se recogió la suspensión celular en tubos cónicos de 15 mL y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet celular se guardó en frío para evitar la degradación.

La extracción de ARN se realizó utilizando un kit comercial (Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lisaron los pellets celulares añadiendo el volumen recomendado de 600 µL de buffer de lisis suplementado con DTT al 1% en cada pellet celular. También se añadió un volumen 1:1 de ethanol al 70%, se homogeneizaron con el vortex y se incubaron en hielo para evitar la degradación del ADN.

Ilustración 5. Esquema del proceso de extracción de ARN en células MCF-7.



Nota. Representación esquemática del proceso de extracción de ARN total, que incluye lisis celular, purificación mediante columna de sílice, lavados y recuperación del ARN.

Los lisados se pasaron a la columna de sílice (spin cartridge), se centrifugaron a 12000 g durante 30 segundos para permitir la unión del ARN a la membrana y se descartó el

sobrenadante. A continuación, las columnas se lavaron para eliminar proteínas, lípidos y otros contaminantes con 700 μL de Wash Buffer I, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se lavaron con 500 μL de Wash Buffer II, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y repetimos este paso una vez más. Finalmente, el ARN se eluyó añadiendo 30 μL de agua libre de nucleasas directamente sobre la membrana y centrifugando a $12,000 \times g$ durante 2 minutos.

La concentración y pureza del ARN se determinaron mediante espectrofotometría (NanoDrop™), registrando las relaciones A260/280 y A260/230. Solo se utilizaron preparaciones con A260/280 comprendida entre 1.8 y 2.1.

6.2 Síntesis de ADN complementario (cDNA)

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el SuperScript® IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction Kit a partir de 2000 ng de ARN total por reacción. En términos generales, para un volumen final de 20 μL , se realizó el siguiente protocolo.

⇒ Mezcla de reacción inicial (13 μL):

- ARN total (2,000 ng): 11 μL
- 50 μM oligo(dT)20 primer: 1 μL (mezcla incluida en el kit)
- 10mM dNTP mix: 1 μL

Incubación: 65 °C (5 min) → luego en hielo (1 min) para hibridación.

⇒ Mezcla de RT (7 μL):

- 5× SSIV Buffer: 4 μL
- 100mM DTT: 1 μL
- Recombinant RNase Inhibitor: 1 μL
- SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/ μL): 1 μL

Se añadió la mezcla RT a la mezcla de hibridación y se incubó en termociclador siguiendo este programa:

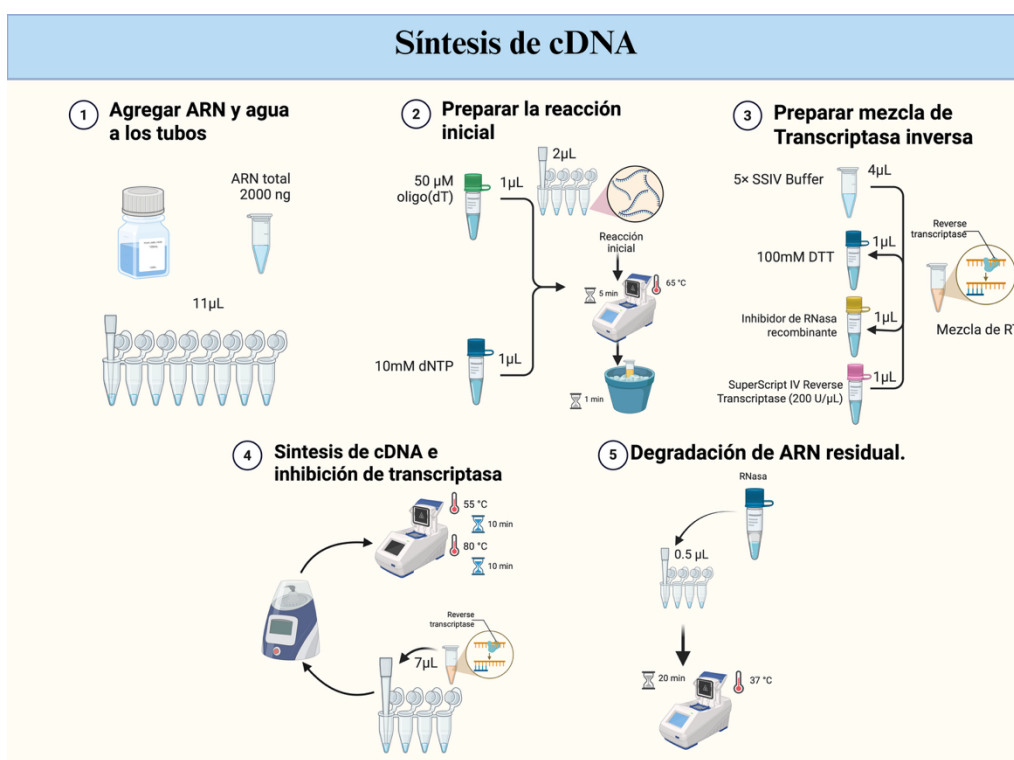
1. 55 °C, 10 min (síntesis de cDNA).

2. 80 °C, 10 min (inactivación de la transcriptasa reversa).

Por ultimo se añadió 0.5 µL de Rnase y se incubó a 37 °C (20 min).

El cDNA resultante se almacenó a -20 °C hasta su uso en la qPCR. Para evitar variaciones, se utilizó la misma preparación de cDNA para todas las reacciones correspondientes a un mismo experimento.

Ilustración 6. Esquema de la síntesis de cDNA a partir de ARN total.



Nota. Esquema de la síntesis de cDNA a partir de ARN total mediante reacción de transcripción reversa, incluyendo preparación de mezcla, incubación y generación de ADN complementario.

6.3 Cuantificación de expresión génica por qPCR (SYBR Green)

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando un sistema basado en SYBR Green (Applied Biosystems). Las reacciones se ejecutaron en un equipo de qPCR (QuantStudio™ 3 Real-Time System, Bio-Rad).

Para garantizar la validez estadística, el sembrado se realizó bajo condiciones de máxima esterilidad. Cada reacción se preparó en un volumen final de 10 µL, utilizando la siguiente composición:

- 2× SYBR Green PCR Master Mix: 5.0 µL
- QN ROX Reference Dye: 1 µL
- Primer forward: 1 µL
- Primer reverse: 1 µL
- cDNA: 1 µL
- Agua libre de nucleasas: 1 µL

Todas las reacciones se prepararon en hielo, en placas ópticas para qPCR (96 pocillos), y se realizaron por triplicado técnico para cada muestra y cada gen, para calcular la desviación estándar experimental.

Condiciones de amplificación en qPCR

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo colocando la placa en el termociclador de tiempo real, selladas con film óptico para evitar la evaporación, bajo el siguiente programa:

1. Activación térmica inicial: 95°C por 2 min
2. Ciclado (40 ciclos):
 - Desnaturalización: 95 °C, 15 s
 - Alineamiento/extensión: 60 °C, 10 s

Al final de los ciclos de amplificación se realizó una curva de disociación (melt curve) para verificar la especificidad del producto amplificado, incrementando la temperatura desde 65 °C hasta 95 °C (a 0.5 °C cada 5–10 s) y registrando la fluorescencia en cada paso.

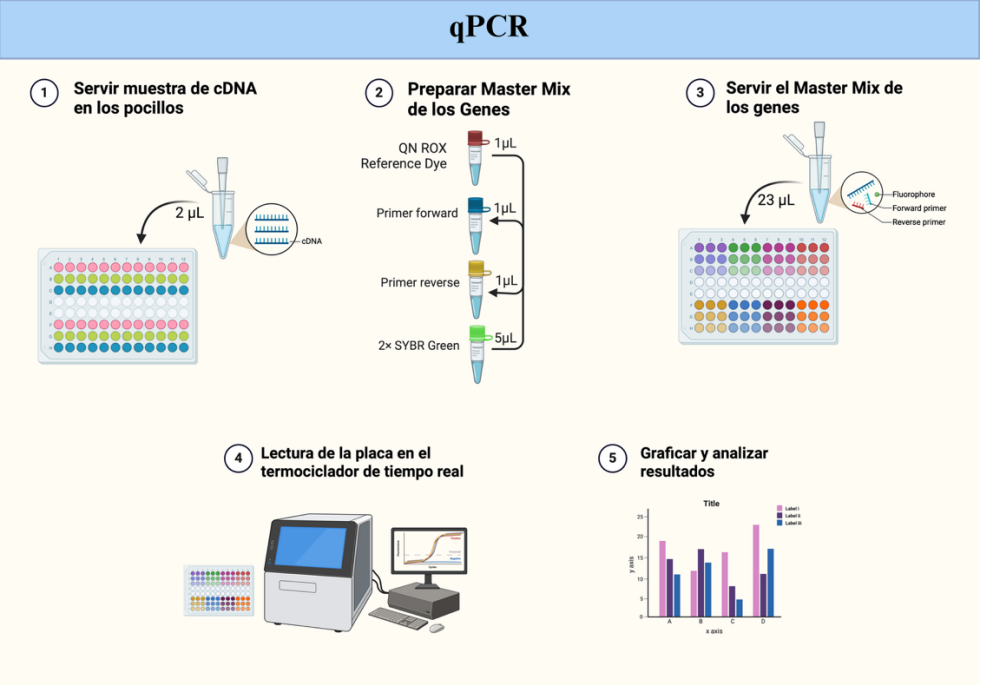
La fluorescencia de SYBR Green se registró en el canal apropiado en cada ciclo, y los valores de Ct (Cycle threshold) se determinaron automáticamente mediante el software del equipo.

Análisis de datos

Los valores de Ct obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo y/o al software de análisis. Se calculó ΔCt para cada muestra ($Ct_{\text{gen_diana}} - Ct_{\text{housekeeping}}$). Posteriormente, se determinó $\Delta\Delta Ct$ tomando como control una condición de referencia (por ejemplo, MCF-7wt

sin tratamiento). La expresión relativa se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados se expresaron como cambio de expresión (fold change) respecto a la línea control.

Ilustración 7. Esquema del análisis de expresión génica mediante qPCR.



Nota. epresentación esquemática del análisis de expresión génica mediante qPCR, que incluye preparación de la mezcla de reacción, amplificación en tiempo real y análisis de los resultados.

Tabla 2. Lista de genes para análisis por qPCR, organizados según la vía biológica.

Vías	Genes
Vía de señalización ATM/ATR	ATRIP, BARD1, BRAC1, CHEK1, FANCD2, RAD9A
Vías de reparación del ADN	ERCC1, LIG1, NTHL1, PCNA, FEN1, MPG, UNG, XRCC1, EXO1, MSH2, BLM, MRE11, RAD51, XRCC2, XRCC6, FANCG, RAD18
Ciclo celular	BRAC1, CHEK1, FANCD2, RAD9A, ERCC1, LIG1, NTHL1, PCNA, FEN1, MPG, UNG, XRCC1, EXO1, MSH2, BLM, MRE11, RAD51, XRCC2, XRCC6, FANCG, RAD18, CDC25A, CDC25C.

Nota. La tabla presenta los genes empleados para el análisis de expresión génica mediante qPCR, clasificados de acuerdo con su participación en la vía de señalización ATM/ATR y en distintos mecanismos de reparación del ADN.

CAPÍTULO III:

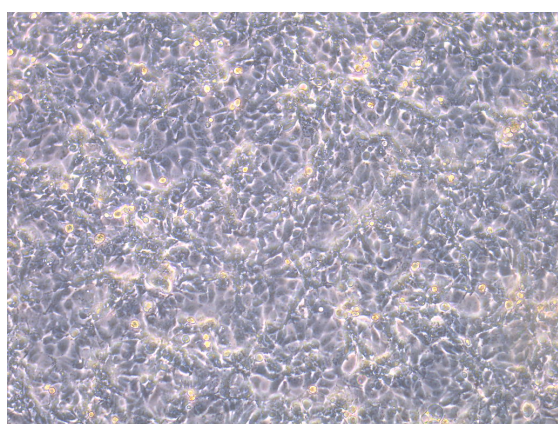
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

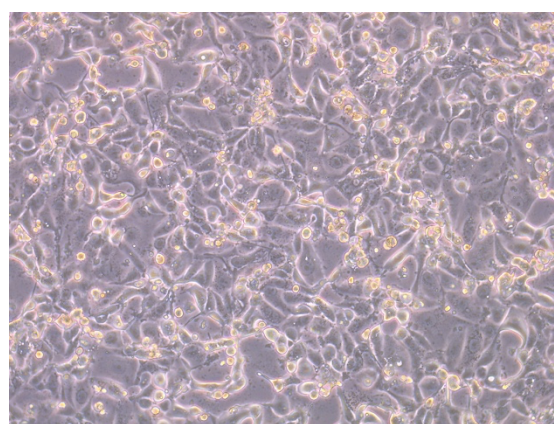
1 Caracterización morfológica de las células MCF-7 tratadas con Topotecán

Al observar las células MCF-7 expuestas a distintas concentraciones de topotecán bajo microscopía óptica, se evidenciaron cambios morfológicos progresivos dependientes de la concentración de topotecán. Las alteraciones observadas sugieren una transición de un estado de proliferación activa hacia estados de arresto del ciclo celular, senescencia y, finalmente, muerte celular programada.

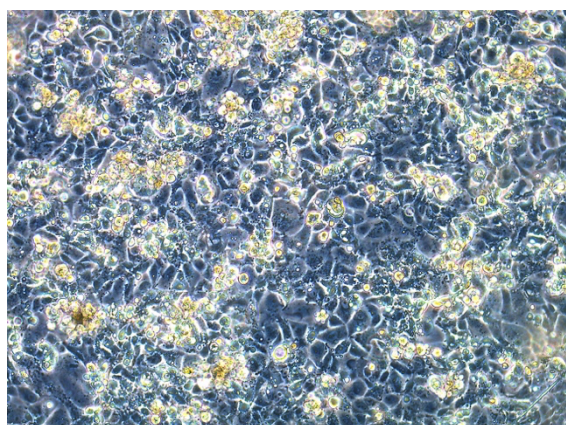
Ilustración 8. Cambios morfológicos inducidos por Topotecán en células MCF-7



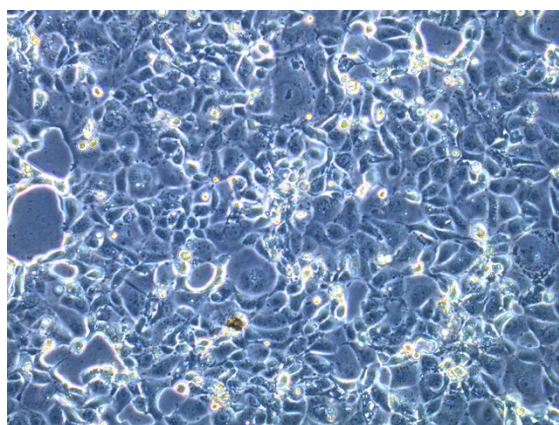
A.



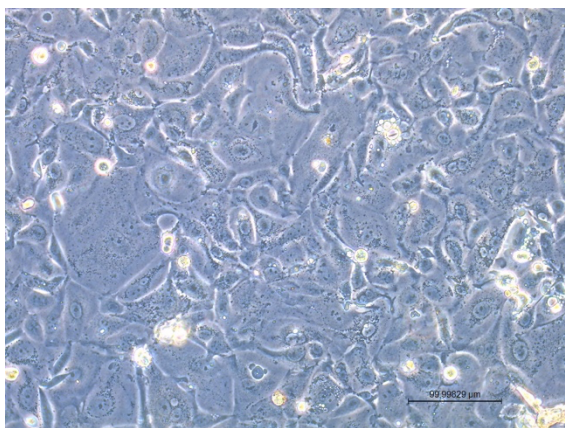
B.



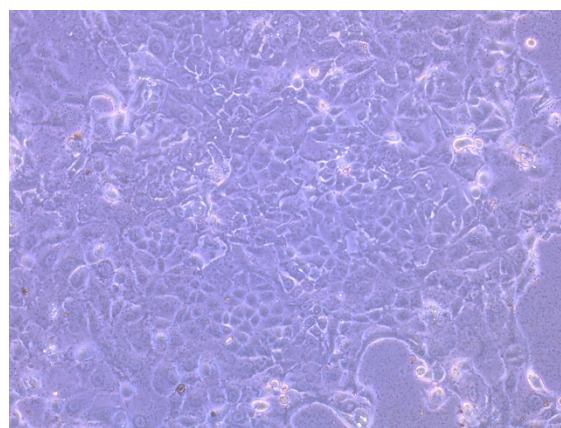
C.



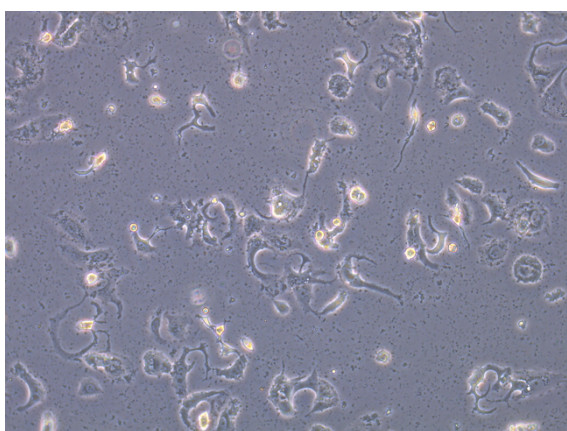
D.



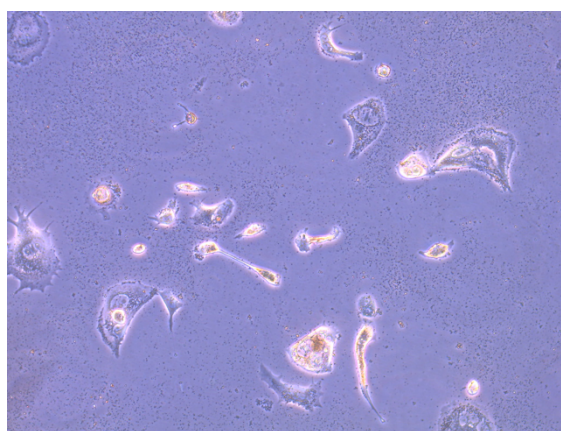
E.



F.



G.



H.

Nota. (A.) Células MCF7 control. (B.) Células MCF7 tratadas con 50nM de Topotecan. (C.) Células MCF7 tratadas con 75nM de Topotecan. (D.) Células MCF7 tratadas con 168.75nM de Topotecan. (E.) Células MCF7 tratadas con 379.68nM de Topotecan. (F.) Células MCF7 tratadas con 569.52nM de Topotecan. (G.) Células MCF7 tratadas con 854.28nM de Topotecan. (H.) Células MCF7 tratadas con 1281.42nM de Topotecan.

En la condición control (Figura A), las células MCF-7 presentaron la morfología epitelial característica de esta línea celular, con un patrón de crecimiento adherente, células poligonales bien definidas, bordes celulares continuos y una alta densidad celular, lo que indica un estado proliferativo activo y una adecuada viabilidad.

Al tratar las células con 50 nM de Topotecán (Figura B), no se observaron cambios morfológicos drásticos respecto al control. Sin embargo, se evidenció una ligera disminución en la confluencia celular y una discreta alteración en la organización del monolayer,

sugiriendo un efecto inicial del fármaco sobre la dinámica celular sin comprometer de manera marcada la viabilidad.

En las células tratadas con 75 nM de Topotecán (Figura C), comenzaron a observarse cambios más evidentes, incluyendo una reducción en la densidad celular, aumento en el redondeamiento de algunas células y la presencia de células con aspecto refringente, indicativo de estrés celular. Aunque aún se mantiene el crecimiento adherente, la organización celular resulta menos homogénea.

A una concentración de 168.75 nM (Figura D), los cambios morfológicos se acentúan notablemente. Se observa una mayor proporción de células redondeadas, pérdida parcial de la adhesión al sustrato y un incremento de células flotantes. La confluencia celular es claramente inferior a la observada en el control, reflejando un impacto significativo del Topotecán sobre la viabilidad y proliferación celular.

En las células expuestas a 379.68 nM de Topotecán (Figura E), se evidencia una marcada alteración morfológica. Predominan células aisladas, con pérdida evidente del patrón epitelial, incremento del redondeamiento celular y disminución notable de la densidad celular. Estos cambios sugieren un efecto citotóxico más pronunciado, posiblemente asociado a daño genómico acumulado.

Al aumentar la concentración a 569.52 nM (Figura F), la población celular muestra una reducción aún mayor, con amplias áreas libres de células adheridas. Las células remanentes presentan morfologías irregulares y signos claros de deterioro estructural, lo que indica una fuerte afectación por el tratamiento.

Finalmente, en las concentraciones más altas de 854.28 nM (Figura G) y 1281.42 nM de Topotecán (Figura H), se observa una pérdida casi total de la confluencia celular. Las células presentes son escasas, mayormente redondeadas, con pobre adhesión al sustrato y morfologías compatibles con estados avanzados de daño celular. En estas condiciones, el

monolayer característico de MCF-7 prácticamente desaparece, evidenciando un efecto citotóxico severo y dependiente de la dosis.

2 Curvas de crecimiento celular

Las curvas de crecimiento celular permitieron evaluar el comportamiento proliferativo de las células MCF-7 en ausencia y presencia de Topotecán 1 μ M a lo largo del tiempo de cultivo, comparando células control con células tratadas con Topotecan (**Gráfica 1**). El análisis se realizó desde el día 0 hasta el día 10, considerando curvas independientes para cada condición experimental.

2.1 Comportamiento proliferativo de las células MCF-7 control

Las células MCF-7 control mostraron un patrón de crecimiento progresivo característico de esta línea celular. Entre los días 0 y 2, la curva evidenció una fase inicial de adaptación, con un incremento moderado en el número de células.

A partir del día 3, las células control iniciaron una fase de crecimiento exponencial, reflejada por un aumento marcado en la cantidad de células en las tres replicas analizadas. Esta tendencia se intensificó entre los días 4 y 8, donde se observó el mayor incremento proliferativo. En particular, una de las réplicas alcanzó su valor máximo alrededor del día 8, con valores cercanos a 55 000 células, mientras que las otras réplicas mantuvieron un crecimiento sostenido hasta el día 10, alcanzando valores aproximados entre 30 000 y 45 000 células.

Hacia los días finales del experimento (días 8–10), algunas réplicas mostraron una desaceleración en el crecimiento o una ligera disminución en el número celular, lo que sugiere la transición hacia una fase estacionaria o el inicio de un declive proliferativo, probablemente asociado a la alta densidad celular y a la limitación de nutrientes. En conjunto, las células MCF-7 control demostraron una alta capacidad proliferativa a lo largo del tiempo de cultivo.

2.2 Comportamiento proliferativo de las células MCF-7 tratadas con Topotecán

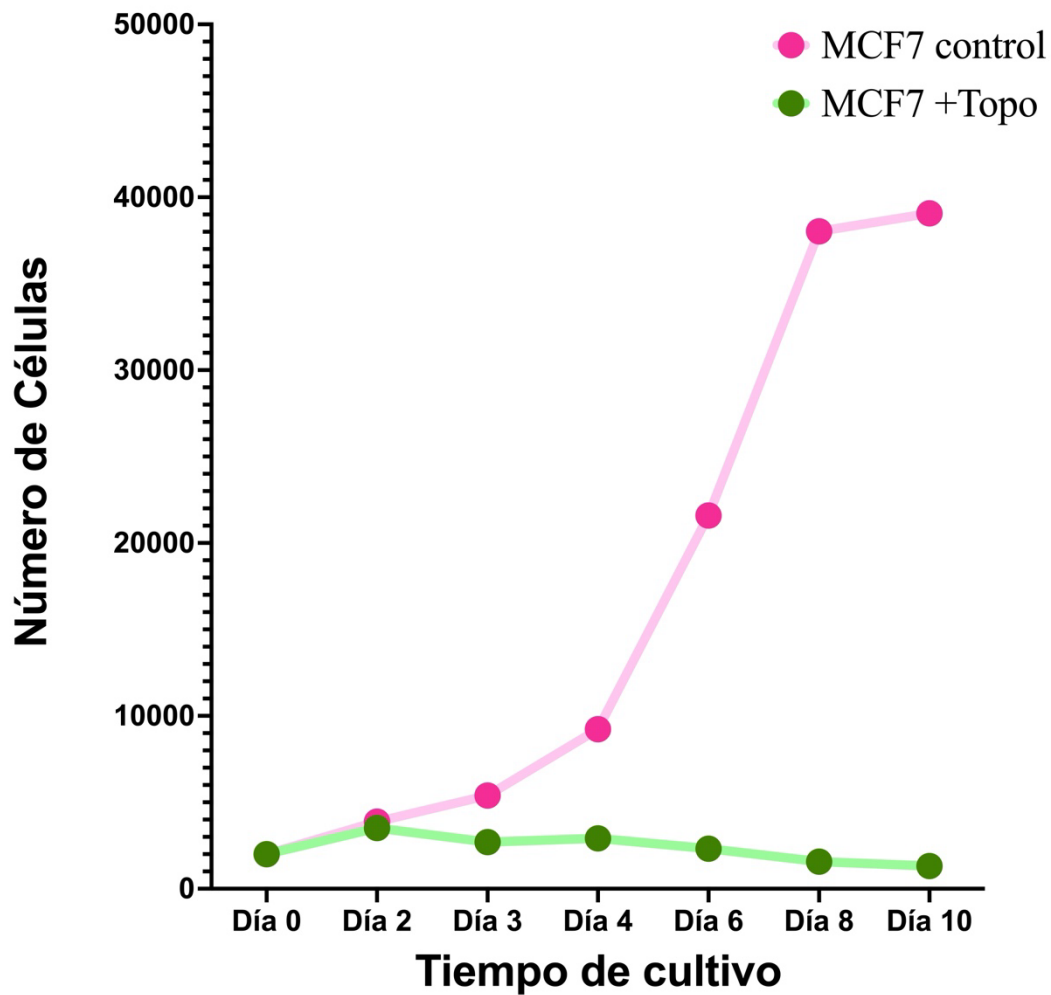
En contraste, las células MCF-7 tratadas con Topotecán presentan un patrón de crecimiento notablemente diferente. Desde los primeros días de cultivo, se observa que el incremento en el número de células es limitado en comparación con el control. Aunque algunas replicas muestran un ligero aumento inicial entre el día 0 y el día 2, este crecimiento no se mantiene en el tiempo. A partir del día 3, la curva correspondiente a las células tratadas tiende a estabilizarse o incluso a disminuir, indicando una marcada reducción en la tasa de proliferación.

Entre los días 4 y 10, las células tratadas con Topotecán mantienen recuentos celulares bajos, sin evidenciar una fase exponencial de crecimiento. En algunas réplicas, se observa una disminución progresiva en el número de células hacia los últimos días del cultivo, lo que sugiere una incapacidad de las células para sostener la proliferación bajo la exposición al fármaco. En ningún caso las réplicas tratadas alcanzan valores comparables a los observados en las células control durante el mismo periodo.

2.3 Comparación entre células MCF-7 control y tratadas con Topotecán

La comparación directa entre ambos grupos evidencia diferencias claras en el comportamiento proliferativo. Mientras que las células MCF-7 control mostraron una transición definida desde la fase de latencia hacia una fase exponencial, seguida de una desaceleración tardía, las células tratadas con Topotecán no lograron sostener un crecimiento activo a lo largo del tiempo. Este comportamiento indica que el tratamiento con Topotecán afecta de manera significativa la dinámica proliferativa de las células MCF-7, limitando su capacidad de crecimiento.

Gráfica 1. Curvas de crecimiento celular de células MCF-7 control vs. tratadas con Topotecán.



Nota. Proliferación celular de la línea MCF7 control vs tratadas con Topotecan. MCF7 control (línea rosada): células no tratadas, con un patrón de crecimiento caracterizado por fase exponencial marcada entre los días 3 y 8. MCF7 + Topotecán 1 μ M (línea verde): células expuestas al fármaco, que mostraron una proliferación reducida durante todo el periodo experimental.

3 Efecto del topotecán sobre la formación de colonias en células MCF-7

Se evaluó la capacidad clonogénica de las células MCF7 control y de las células sometidas a tratamiento con Topotecán (1 μ M) mediante un ensayo de formación de colonias. Este ensayo permite analizar la habilidad de una célula individual para mantener su potencial clonogénico y generar una colonia visible tras un periodo prolongado de cultivo.

Para ello, las células fueron sembradas a baja densidad en placas de cultivo y mantenidas en condiciones controladas de incubación (37 °C, 5% CO₂) durante un período de 10–14 días, permitiendo el crecimiento de colonias a partir de células individuales. Finalizado el periodo de cultivo, las colonias se fijaron y tiñeron con cristal violeta, siendo posteriormente cuantificadas para determinar diferencias en la capacidad proliferativa a largo plazo.

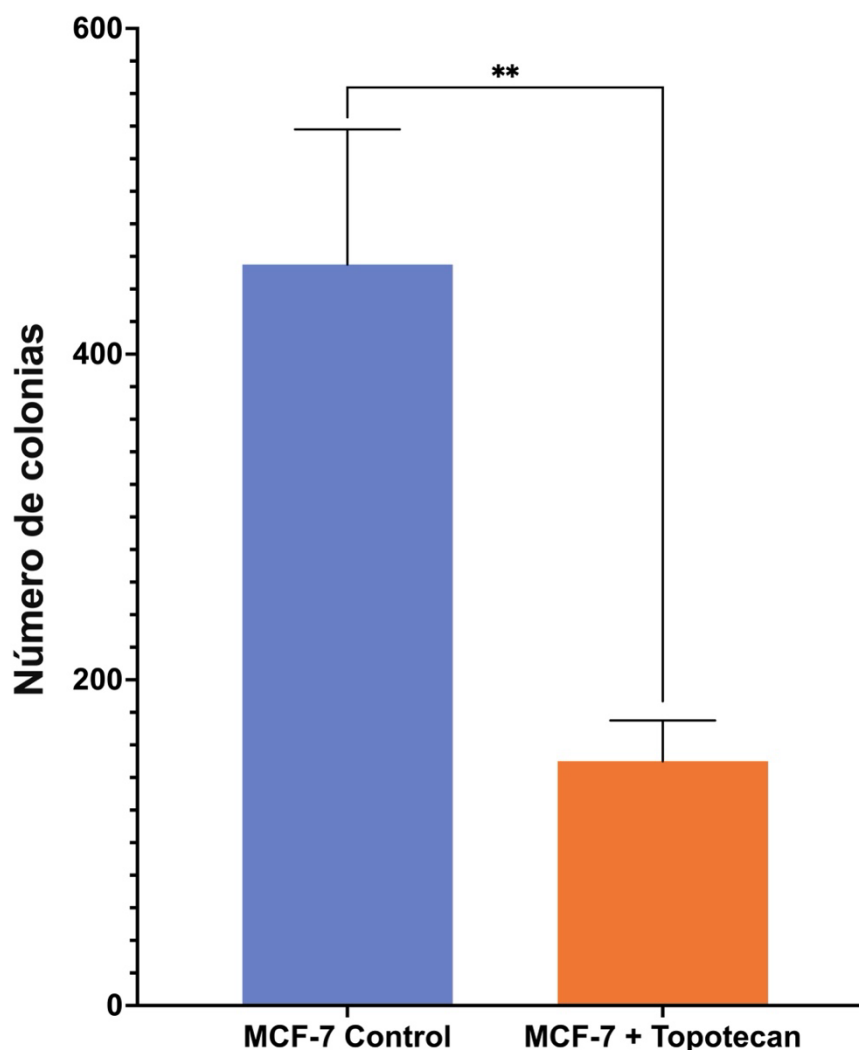
Los resultados obtenidos (**Gráfica 2**) mostraron una diferencia marcada entre ambos grupos. En el grupo MCF7 control, el número de colonias fue consistentemente mayor en todas las réplicas biológicas, con un promedio de 482 colonias. Estas colonias se caracterizaron por ser numerosas, compactas y de bordes bien definidos, presentando un tamaño homogéneo y una distribución regular en la superficie de cultivo, lo que refleja una elevada capacidad de proliferación y supervivencia a largo plazo.

En contraste, en el grupo MCF7 tratado con Topotecán, se observó una reducción marcada en el número de colonias formadas con un promedio de colonias que descendió a 149. En esta condición, se observó una disminución evidente en la eficiencia clonogénica en comparación con el grupo control. Aunque se formaron colonias en todas las réplicas, el número total fue considerablemente menor, con colonias menos densas y con morfología heterogénea, indicando que una proporción significativa de las células tratadas perdió la capacidad de sobrevivir y proliferar tras la exposición al fármaco.

La comparación réplica por réplica evidencia que en cada uno de los ensayos el tratamiento con Topotecán redujo significativamente el número de colonias formadas con relación al control, lo que confirma que el fármaco impacta directamente la capacidad de las células para generar clones estables y mantener su viabilidad en el tiempo. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que el Topotecán ejerce una presión selectiva que elimina gran parte de la población sensible, favoreciendo la supervivencia únicamente de subpoblaciones con características adaptativas.

El análisis estadístico evidenció una disminución significativa en el número de colonias en las células tratadas con Topotecán en comparación con el grupo control ($p= 0.0015$), lo que confirma que el tratamiento tiene un efecto inhibitorio sobre la capacidad clonogénica de las células MCF-7.

Gráfica 2. Formación de colonias en células MCF7 control y tratadas con Topotecán (1 μ M)



Nota. Ensayo de formación de colonias en células MCF7 control y MCF7 tratadas con Topotecán (1 μ M). MCF7 control (barra azul): presentaron un número promedio de colonias elevado y consistente entre las réplicas biológicas. MCF7 + Topotecán (barra naranja): mostraron una reducción significativa en el número de colonias. $p=0.0015$

4 Evaluación del impacto del Topotecán sobre la proliferación y supervivencia de células MCF-7 mediante ensayo MTT

Con el propósito de evaluar el efecto antiproliferativo del Topotecán sobre células MCF-7, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante MTT. Las células fueron preincubadas durante 96 horas y posteriormente expuestas al fármaco durante 72 horas a dos concentraciones (1 μ M y 2.5 μ M), incluyendo un grupo control sin tratamiento.

Los resultados mostraron una reducción clara de la viabilidad celular en respuesta al tratamiento, evidenciando un efecto dependiente de la concentración.

4.1 Viabilidad celular

El grupo control presentó una viabilidad del 100%, estableciendo el valor de referencia para la comparación.

Tras la exposición a 1 μM de Topotecán, la viabilidad se redujo aproximadamente al 52%, lo que representa una disminución cercana al 48% con respecto al control. Este resultado indica que incluso a una concentración moderada, el Topotecán ejerce un efecto inhibitorio considerable sobre la proliferación celular en MCF-7.

El efecto fue más pronunciado al incrementar la concentración a 2.5 μM , donde la viabilidad descendió hasta aproximadamente 27%, lo que corresponde a una reducción cercana al 73% respecto al grupo control.

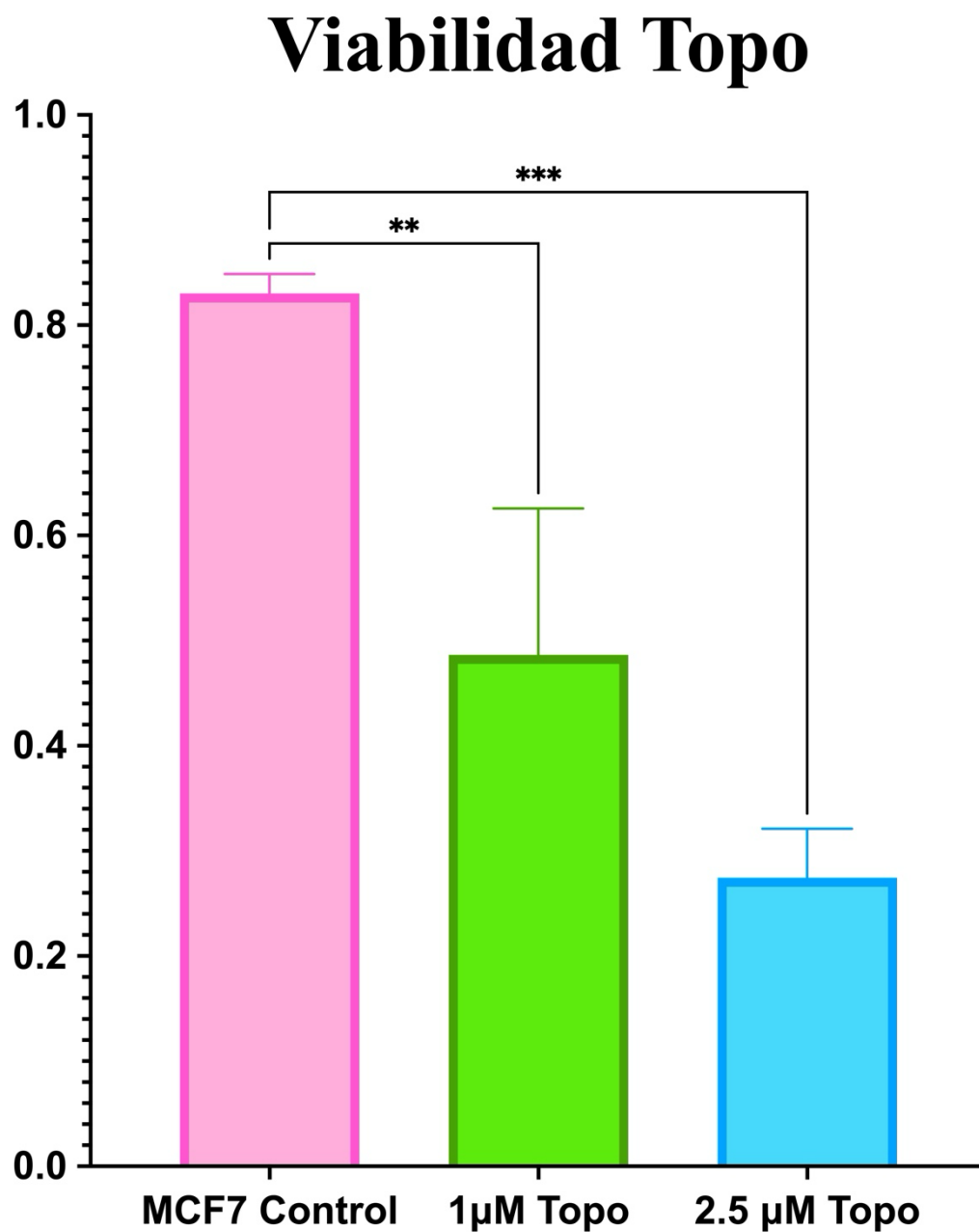
Esta disminución progresiva confirma una relación dosis-respuesta, característica de agentes quimioterapéuticos con actividad citotóxica directa sobre células tumorales. El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett, reveló diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y ambas condiciones de tratamiento. Específicamente, la comparación entre el grupo control y 1 μM de Topotecán mostró una diferencia significativa ($p = 0.0048$), mientras que la concentración de 2.5 μM presentó una diferencia altamente significativa ($p = 0.0004$).

4.2 Citotoxicidad celular

El análisis complementario de citotoxicidad mostró un comportamiento inversamente proporcional al observado en la viabilidad celular.

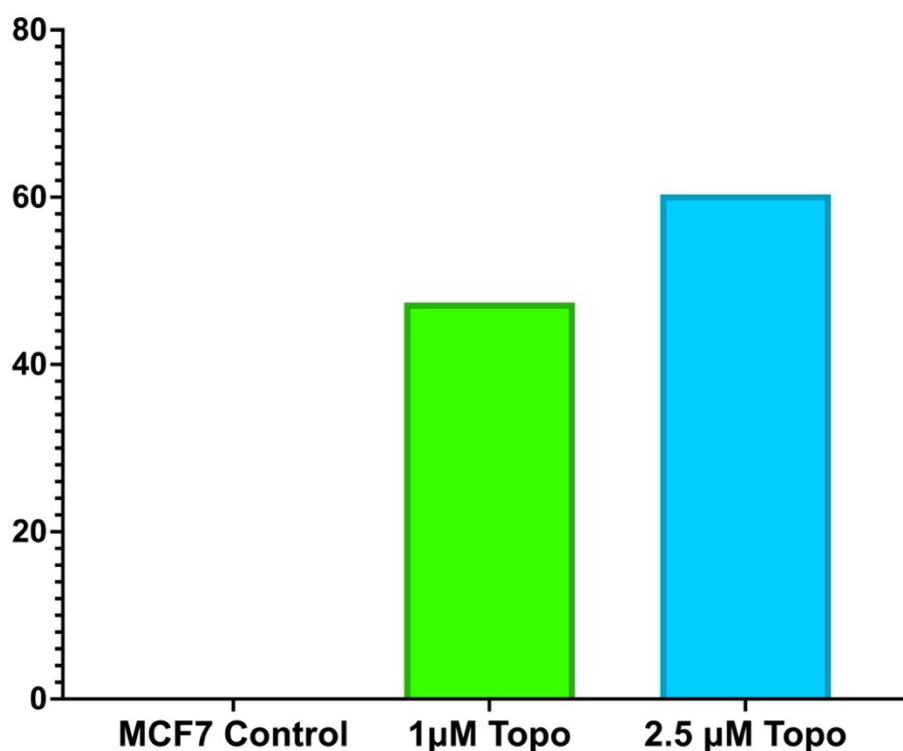
Mientras que el grupo control no presentó citotoxicidad detectable, el tratamiento con 1 μM de Topotecán indujo aproximadamente un 48% de citotoxicidad. Este valor aumentó hasta alrededor del 60% en la concentración de 2.5 μM , evidenciando un incremento del daño celular conforme aumenta la dosis del fármaco.

Gráfica 3. Viabilidad celular en células MCF-7 tratadas con Topotecán



Nota. Representación gráfica de la viabilidad celular determinada mediante ensayo MTT en células MCF-7 tras 96 h de preincubación y 72 h de exposición al Topotecan. En el eje X se muestran las condiciones experimentales: control sin tratamiento (barra rosada), 1 µM de Topotecán (barra verde) y 2.5 µM de Topotecán (barra celeste). El eje Y indica la viabilidad celular relativa. Los valores fueron normalizados respecto al grupo control, el cual se estableció como 100%. Cada condición fue evaluada en triplicado técnico ($n = 3$) y los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (SD). La significancia estadística fue determinada mediante ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Gráfica 4. Citotoxicidad inducida por Topotecán en células MCF-7



Nota. Porcentaje de citotoxicidad calculado a partir del ensayo MTT en células MCF-7 preincubadas durante 96 horas y tratadas durante 72 horas con Topotecán (1 μ M y 2.5 μ M).. En el eje X se indican las condiciones experimentales: control sin tratamiento (barra rosada), 1 μ M de Topotecán (barra verde) y 2.5 μ M de Topotecán (barra celeste). El eje Y corresponde al porcentaje de citotoxicidad. El grupo control se utilizó como referencia basal.

5 Perfil de expresión génica mediante qPCR y evaluación de la resistencia cruzada

Con el objetivo de evaluar el impacto del tratamiento con Topotecán y la posible adquisición de un fenotipo de resistencia multidroga (MDR), se analizó la expresión relativa de 25 genes clave (**Tabla 2**) asociados a las vías de señalización de daño al ADN (ATM/ATR), mecanismos de reparación (HR y NER), control del ciclo celular y eflujo de drogas; mediante qPCR en células MCF-7 bajo tres condiciones: control, tratadas con Topotecán (Topo) y tratadas con la combinación Topotecán + Paclitaxel (Topo + PTX).

Los niveles de expresión génica fueron normalizados utilizando el gen de referencia Beta-Actina y expresados como fold change mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las diferencias estadísticas se determinaron a partir de los valores de Ct.

Las gráficas A–D muestran estos cambios organizados según su función biológica.

5.1 Señalización de daño en el ADN (Gráfica A)

En este grupo se evaluaron genes involucrados en la detección y señalización del daño en el ADN: ATRIP, BARD1, BRCA1, CHEK1, FANCD2 y RAD9A.

En células tratadas con Topotecán, se observó:

- Disminuciones significativas en BARD1, CHEK1 y FANCD2 respecto al control.
- Cambios significativos en BRCA1.
- ATRIP no presentó diferencias significativas bajo esta condición.
- Por otro lado, RAD9A evidenció un incremento significativo en su expresión en comparación con el control.

En contraste, la combinación Topo + PTX indujo una activación significativamente mayor de esta vía.

- Sobreexpresión notable de ATRIP (~4 veces)
- BRCA1 (~2.5 veces)
- CHEK1 (~1.5 veces)
- RAD9A (~3.8 veces)

Mientras que BARD1 y FANCD2 mostraron incrementos moderados respecto al tratamiento con Topotecán solo.

Este patrón sugiere que la señalización de daño al ADN es más pronunciada bajo tratamiento combinado.

5.2 Genes asociados a reparación del ADN (Gráficas B y C)

Reparación por escisión y mantenimiento genómico (Gráfica B):

Se evaluaron ERCC1, LIG1, NTHL1, PCNA, FEN1 y MPG

En células tratadas con Topotecán, se observó:

- Incremento significativo en ERCC1, NTHL1 y MPG
- Disminución significativa en LIG1, PCNA y FEN1 respecto al control.

En la condición Topo + PTX, se observó un aumento significativo en la expresión de todos los genes evaluados:

- ERCC1 (~1.3 veces)

- NTHL1 (~1.7 veces)
- PCNA (~1.4 veces)
- Incremento más evidente en MPG (~2 veces)
- Mientras que LIG1 mostró recuperación parcial respecto a Topotecán solo.

Reparación por recombinación y estabilidad del ADN (Gráfica C):

Incluyó los genes UNG, XRCC1, MSH2, BLM, MRE11 y RAD51.

En células tratadas con Topotecán:

- Aumento en UNG y MRE11
- Cambios mínimos en XRCC1
- Disminución significativa en MSH2, BLM y RAD51, respecto al control.

En la condición Topo + PTX, varios genes mostraron incrementos más pronunciados:

- UNG (~4 veces)
- XRCC1 (~2 veces)
- MSH2 (~1.6 veces)
- BLM (~1.3 veces)
- MRE11 (~3 veces)
- Mientras que RAD51 presentó recuperación respecto al tratamiento con Topotecán solo.

5.3 Regulación del ciclo celular y puntos de control (Gráfica D)

Se evaluaron XRCC2, XRCC6, FANCG, RAD18, CDC25A y CDC25C.

En células tratadas con Topotecán:

- Incremento en XRCC6 y FANCG
- Expresión elevada de CDC25A (~2.4 veces)
- Disminución en XRCC2 y RAD18
- Expresión mínima de CDC25C

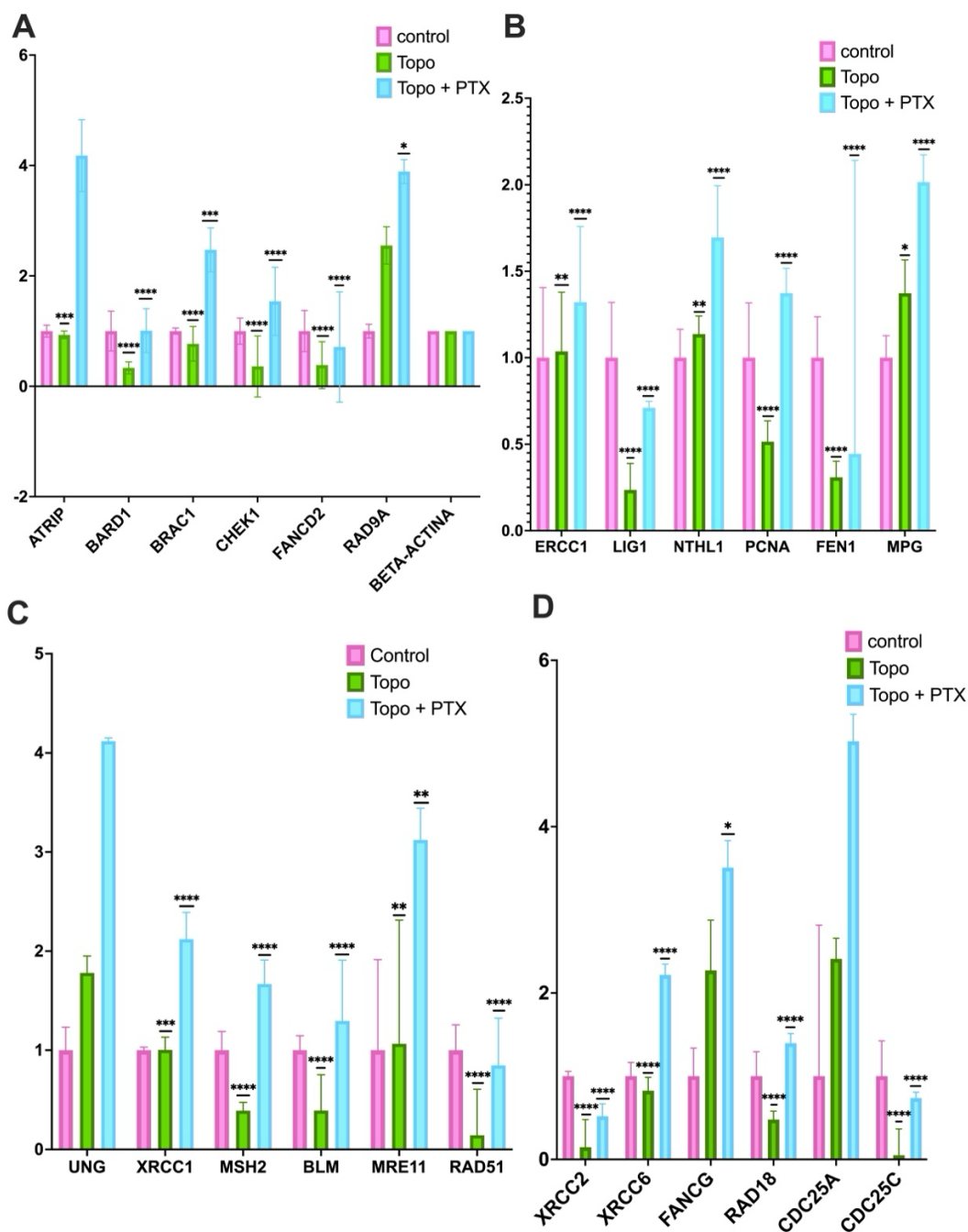
En la condición Topo + PTX, se evidenció una sobreexpresión generalizada en:

- XRCC6 (~2.2 veces)

- FANCG (~3.5 veces)
- RAD18 (~1.4 veces)
- CDC25A (~5 veces)

Recuperación parcial de CDC25C

Gráfica 5. Expresión relativa de genes en células MCF-7 control, tratadas con Topotecán y Topotecán + Paclitaxel.



Nota. Análisis de expresión génica relativa (fold change) mediante qPCR en células MCF-7 bajo tres condiciones experimentales. MCF7 control (barras rosadas); MCF7 + 1 μ M Topotecán (barras verdes); MCF7 + 1 μ M Topotecán + 130nM Paclitaxel (barras celestes).

(A) Genes involucrados en la señalización de daño en el ADN: ATRIP, BARD1, BRCA1, CHEK1, FANCD2 y RAD9A.

(B) Genes asociados a mecanismos de reparación por escisión y mantenimiento de la integridad genómica: ERCC1, LIG1, NTHL1, PCNA, FEN1 y MPG.

(C) Genes relacionados con procesos de reparación del ADN y estabilidad del genoma: UNG, XRCC1, MSH2, BLM, MRE11 y RAD51.

(D) Genes implicados en la regulación del ciclo celular y puntos de control: XRCC2, XRCC6, FANCG, RAD18, CDC25A y CDC25C.

DISCUSIÓN

1. Caracterización morfológica de células MCF-7 tratadas con Topotecán

Los cambios morfológicos observados en las células MCF-7 tras la exposición a Topotecán reflejan una respuesta celular asociada al estrés genotóxico inducido por la inhibición de la topoisomerasa I. En las micrografías obtenidas durante el experimento se evidenció una transición desde la morfología epitelial característica de esta línea celular —células poligonales, bien adheridas entre sí y con una organización relativamente homogénea— hacia poblaciones con mayor heterogeneidad estructural, incremento del tamaño celular, irregularidad citoplasmática y alteraciones en la confluencia de la monocapa. Este tipo de cambios morfológicos ha sido descrito previamente en células sometidas a agentes que inducen daño en el ADN y suele asociarse con activación de la respuesta celular frente a estrés replicativo.

El mecanismo de acción de Topotecán explica en gran medida estas alteraciones. Este fármaco estabiliza el complejo Topoisomerasa I–ADN, impidiendo la religación de roturas monocatenarias generadas durante la relajación del ADN. Cuando las horquillas replicativas encuentran estos complejos estabilizados, las roturas monocatenarias pueden convertirse en roturas de doble cadena (DSBs), lo que activa sensores de daño como ATM y ATR y desencadena la fosforilación de H2AX (γ H2AX), un marcador temprano de daño en el ADN (Pommier, 2006). La activación de estas rutas de señalización conduce a la activación de checkpoints del ciclo celular y al reclutamiento de proteínas involucradas en reparación del ADN.

La persistencia de este estrés replicativo puede provocar arrestos prolongados del ciclo celular, particularmente en fase S o G2/M, lo que podría explicar el aumento del tamaño celular observado en las células tratadas. Bajo estas condiciones, las células continúan acumulando masa citoplasmática sin completar la división celular, generando un fenotipo caracterizado por expansión celular y alteraciones morfológicas. Este tipo de respuesta ha sido ampliamente descrito en contextos de estrés replicativo crónico y constituye un mecanismo adaptativo que permite a la célula activar procesos de reparación antes de reanudar la proliferación (Zeman & Cimprich, 2014; Rodier & Campisi, 2011).

Adicionalmente, la coexistencia de células con morfología alterada junto con células que conservan parcialmente su arquitectura epitelial sugiere que el tratamiento con Topotecán no produce una eliminación inmediata de toda la población celular, sino que genera presión selectiva que favorece la supervivencia de subpoblaciones con mayor capacidad de tolerar el daño genómico (McGranahan & Swanton, 2017). En el caso de las células MCF-7, que pertenecen al subtipo luminal A y expresan el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), la señalización estrogénica puede modular genes implicados en proliferación y reparación del ADN, contribuyendo a la adaptación frente al estrés replicativo (Pedram et al., 2009).

2. Curvas de crecimiento: inhibición sostenida de la tasa proliferativa

El análisis de las curvas de crecimiento permitió evaluar el impacto del tratamiento con Topotecán sobre la dinámica proliferativa de las células MCF-7. En el grupo control se observó el patrón típico de crecimiento celular caracterizado por una fase inicial de latencia seguida de una fase exponencial bien definida, lo que refleja la capacidad proliferativa basal de esta línea celular. Este comportamiento es consistente con el fenotipo luminal de las células MCF-7, cuya proliferación está regulada principalmente por la señalización mediada por el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) y por la activación de vías asociadas al control del ciclo celular, como el eje ciclina D1–CDK4/6–E2F (Jeselsohn et al., 2015). La progresión ordenada de estas fases en las células control confirma la estabilidad del sistema experimental y proporciona una referencia adecuada para evaluar los efectos del tratamiento.

En contraste, las células tratadas con Topotecán mostraron una alteración evidente en su patrón de crecimiento. La reducción en la pendiente de la fase exponencial indica una disminución en la tasa proliferativa, lo cual sugiere que el fármaco interfiere con la

progresión normal del ciclo celular. Como consecuencia, la proliferación celular se ralentiza, lo cual se refleja directamente en las curvas de crecimiento observadas.

Otro aspecto relevante del comportamiento proliferativo observado en las células tratadas es que, aunque la tasa de crecimiento disminuye, la población celular no se elimina completamente. Esto sugiere que una fracción de las células logra sobrevivir al tratamiento, posiblemente mediante la activación de mecanismos compensatorios de reparación del ADN o adaptación al estrés replicativo. La activación sostenida de rutas de reparación, como la recombinación homóloga y la reparación de roturas de doble cadena, puede permitir que algunas células continúen proliferando a pesar del daño inducido por el fármaco (Helleday et al., 2014). Este fenómeno ha sido descrito en diversos modelos celulares tratados con inhibidores de topoisomerasas, donde la presión farmacológica favorece la supervivencia de subpoblaciones celulares con mayor capacidad de tolerar el daño genómico.

3. Ensayo de formación de colonias

El ensayo de formación de colonias permitió evaluar el impacto del tratamiento sobre la capacidad proliferativa a largo plazo de las células MCF-7. A diferencia de otros ensayos de viabilidad celular que miden respuestas metabólicas en periodos cortos, el ensayo clonogénico determina la capacidad de una célula individual para mantener su potencial reproductivo y generar una colonia estable tras varias rondas de división celular.

En los resultados obtenidos se observó una disminución marcada en el número de colonias formadas en las células tratadas con Topotecán en comparación con el grupo control. Esta reducción indica que el tratamiento afecta la capacidad de las células para mantener su integridad reproductiva, incluso en aquellas que logran sobrevivir al estrés inicial inducido por el fármaco. Diversos estudios han demostrado que el ensayo clonogénico es particularmente sensible para detectar la denominada “muerte reproductiva”, un estado en el cual las células permanecen metabólicamente activas pero pierden la capacidad de dividirse indefinidamente y generar nuevas poblaciones celulares (Guzmán, C., et al., 2014).

La disminución en la formación de colonias también puede interpretarse como consecuencia de alteraciones en la estabilidad genómica y en la regulación del ciclo celular. Cuando las células experimentan daño genómico significativo, se activan mecanismos de control que pueden limitar su capacidad proliferativa para evitar la propagación de mutaciones. En este

contexto, la pérdida del potencial clonogénico refleja la incapacidad de una fracción importante de la población celular para completar múltiples ciclos de división de manera estable, lo que se traduce en una reducción del número y tamaño de las colonias observadas en el ensayo (Franken et al., 2006).

4. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Los resultados del ensayo de viabilidad celular mostraron una disminución significativa en la viabilidad de las células MCF-7 tratadas con Topotecán en comparación con el grupo control, evidenciando un efecto citotóxico dependiente de la concentración. Las células expuestas a 1 μM y 2.5 μM de Topotecán presentaron una reducción progresiva en la viabilidad celular, lo que indica que el incremento en la concentración del fármaco afecta de manera directa la capacidad de la población celular para mantener su actividad metabólica y proliferativa. Este comportamiento dosis-dependiente coincide con lo reportado en estudios que han evaluado la respuesta de células de cáncer de mama a inhibidores de topoisomerasa, donde el aumento en la concentración del compuesto se asocia con una reducción significativa en la viabilidad celular en líneas como MCF-7 y otras líneas tumorales sensibles a este tipo de agentes citotóxicos (Pommier et al., 2010).

Por otra parte, el incremento en los niveles de citotoxicidad calculados a partir de los datos de viabilidad confirma que el efecto del tratamiento no se limita a una disminución temporal en la actividad metabólica, sino que también refleja un impacto más amplio sobre la supervivencia celular. La relación inversa entre viabilidad y citotoxicidad observada en los resultados indica que el aumento en la concentración del fármaco genera un mayor porcentaje de células afectadas dentro de la población (Helleday et al., 2014).

Adicionalmente, la tendencia observada en los resultados sugiere que, aunque una fracción importante de la población celular se ve afectada por el tratamiento, algunas células mantienen cierto nivel de viabilidad incluso en las concentraciones más altas evaluadas. Este fenómeno suele atribuirse a la heterogeneidad funcional dentro de la población celular, donde subpoblaciones con mayor capacidad adaptativa pueden sobrevivir a condiciones de estrés inducidas por el tratamiento farmacológico (McGranahan & Swanton, 2017). En este contexto, la persistencia de células viables dentro de la población tratada podría reflejar la activación de mecanismos celulares que permiten tolerar parcialmente el daño inducido por el fármaco.

5. Perfil de expresión génica y evaluación de resistencia cruzada

El análisis de expresión génica mostró que las células tratadas con Topotecán presentaron una activación moderada de genes asociados a la respuesta al daño en el ADN, mientras que la combinación Topotecán + Paclitaxel generó una inducción molecular mucho más intensa en múltiples rutas de reparación genómica y regulación del ciclo celular. Este patrón sugiere que la exposición combinada amplificó la respuesta celular al estrés genotóxico, promoviendo una activación coordinada de genes implicados en señalización de daño, reparación del ADN y control del ciclo celular. Estudios previos han demostrado que los agentes que inducen estrés replicativo pueden activar simultáneamente múltiples redes de reparación genómica, generando una respuesta transcripcional más robusta cuando se combinan con fármacos que alteran la dinámica mitótica (Zeman & Cimprich, 2014; Helleday et al., 2014).

5.1 Señalización de daño en el ADN

Dentro del grupo de genes asociados a señalización de daño genómico, ATRIP y RAD9A mostraron una inducción particularmente marcada en las células tratadas con la combinación Topotecán + Paclitaxel, alcanzando niveles de expresión superiores a los observados con Topotecán solo. ATRIP es un componente clave del complejo ATR-ATRIP responsable de detectar estrés replicativo y activar checkpoints del ciclo celular, mientras que RAD9A forma parte del complejo 9-1-1 que participa en la amplificación de la señal de daño en el ADN. La sobreexpresión observada en estos genes sugiere que las células activaron mecanismos de vigilancia genómica más robustos frente al estrés inducido por el tratamiento combinado. Este comportamiento coincide con estudios que reportan que el estrés replicativo sostenido activa de manera significativa las vías ATR-dependientes como estrategia para estabilizar las horquillas de replicación y evitar el colapso replicativo (Cimprich & Cortez, 2008).

Por otro lado, genes como BRCA1 y CHEK1 mostraron una expresión relativamente moderada en las células tratadas únicamente con Topotecán, pero aumentaron significativamente en la condición combinada. Este patrón sugiere que la presencia de Paclitaxel podría intensificar la activación de mecanismos de control del ciclo celular y reparación genómica. En cáncer de mama, BRCA1 ha sido ampliamente descrito como un regulador central en la respuesta a daño replicativo y su inducción suele correlacionarse con

la activación de recombinación homóloga como mecanismo de tolerancia al daño genómico (Roy et al., 2012).

5.2 Genes asociados a reparación del ADN

El análisis de genes relacionados con reparación del ADN también reveló una activación diferencial dependiendo del tratamiento. En particular, genes como ERCC1, NTHL1 y PCNA mostraron un incremento notable en la condición Topotecán + Paclitaxel, superando claramente los niveles observados en las células tratadas únicamente con Topotecán. ERCC1 es un componente esencial del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), mientras que NTHL1 participa en reparación por escisión de bases (BER), dos mecanismos fundamentales para corregir distintos tipos de lesiones genómicas.

La sobreexpresión simultánea de estos genes sugiere que las células activaron múltiples rutas de reparación como estrategia adaptativa frente al daño inducido por el tratamiento combinado. Estudios en modelos tumorales han demostrado que la activación coordinada de NER y BER constituye un mecanismo importante de tolerancia celular frente a agentes que generan daño replicativo y estrés genómico persistente (Lord & Ashworth, 2012). Este patrón de activación múltiple también ha sido descrito en células tumorales que desarrollan resistencia adaptativa frente a agentes quimioterapéuticos.

Asimismo, la inducción de MPG observada en la condición combinada refuerza la idea de que el tratamiento promueve una activación amplia de rutas de reparación. MPG es una glucosilasa implicada en la eliminación de bases dañadas durante el proceso de reparación por escisión de bases. Su incremento en la expresión sugiere que las células podrían estar incrementando su capacidad de remover lesiones genómicas antes de que estas interfieran con la replicación celular.

5.3 Regulación del ciclo celular y puntos de control

En relación con los genes asociados a regulación del ciclo celular, FANCG y CDC25A mostraron los niveles de inducción más elevados en las células tratadas con la combinación Topotecán + Paclitaxel. FANCG forma parte de la vía de anemia de Fanconi, implicada en

la reparación de lesiones replicativas complejas, mientras que CDC25A regula la progresión del ciclo celular mediante la activación de quinasas dependientes de ciclina. La marcada inducción de estos genes sugiere que las células activaron simultáneamente mecanismos de reparación y control del ciclo celular con el objetivo de mantener la estabilidad genómica bajo condiciones de estrés.

Este tipo de activación coordinada ha sido descrita en células tumorales sometidas a estrés replicativo intenso, donde las rutas de reparación del ADN se integran con los mecanismos de control del ciclo celular para permitir la supervivencia celular frente al daño acumulado (Bartek & Lukas, 2007). La activación de CDC25A en particular ha sido asociada con intentos de las células por reanudar la proliferación tras periodos de arresto del ciclo celular inducidos por daño genómico.

Finalmente, genes como XRCC6 y RAD18 mostraron aumentos moderados en la expresión bajo tratamiento combinado, lo que sugiere que las células también podrían estar activando mecanismos adicionales de reparación y tolerancia al daño genómico. XRCC6 participa en reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), mientras que RAD18 está asociado con procesos de tolerancia al daño durante la replicación. La activación de estas rutas sugiere que la respuesta celular al tratamiento implica una reorganización compleja de múltiples redes de reparación genómica.

LIMITACIONES

Aunque este estudio permitió caracterizar cambios fenotípicos y moleculares asociados a la exposición prolongada a topotecán en células MCF-7, existen algunas limitaciones inherentes al diseño experimental que deben considerarse al interpretar los resultados. En primer lugar, el modelo experimental utilizado corresponde a un sistema *in vitro* basado en una única línea celular, por lo que los resultados reflejan el comportamiento específico de este modelo bajo condiciones controladas de cultivo. A pesar de que MCF-7 es ampliamente utilizada para el estudio del cáncer de mama ER α +, este modelo no reproduce completamente la complejidad del microambiente tumoral presente *in vivo*, donde intervienen múltiples tipos celulares, señales paracrinas y gradientes metabólicos que pueden influir en la respuesta a los fármacos.

Otra limitación está asociada al proceso de selección de resistencia inducida mediante exposición prolongada a topotecán. Aunque este enfoque permite modelar experimentalmente la adquisición de resistencia farmacológica, el proceso de adaptación celular puede favorecer la aparición de subpoblaciones con características clonales específicas del sistema de cultivo, lo que podría generar variabilidad en la respuesta celular observada.

Adicionalmente, los ensayos funcionales empleados, como curvas de crecimiento celular, ensayo de formación de colonias y ensayo de viabilidad MTT, permiten evaluar cambios en proliferación y supervivencia celular, pero no identifican directamente los mecanismos moleculares responsables de estos efectos. Del mismo modo, el análisis de expresión génica mediante qPCR se limita al nivel transcripcional, por lo que no permite determinar si las variaciones en la expresión génica se traducen en cambios funcionales a nivel proteico o en la actividad de las rutas de señalización correspondientes.

Finalmente, el estudio se enfocó en un conjunto específico de genes asociados a señalización de daño en el ADN, reparación genómica y control del ciclo celular. Si bien estos genes representan rutas clave implicadas en la respuesta al estrés genotóxico, es posible que otros mecanismos moleculares no evaluados también participen en los procesos de adaptación celular y resistencia cruzada observados.

CAPÍTULO IV:

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se logró establecer un modelo experimental de células MCF-7 expuestas de manera prolongada a topotecán, lo que permitió generar una población celular con características adaptativas frente a este agente quimioterapéutico. La exposición escalonada al fármaco durante varios meses favoreció la selección de células capaces de tolerar concentraciones progresivamente mayores, permitiendo así desarrollar un modelo adecuado para estudiar los procesos celulares asociados a la adaptación y resistencia adquirida en cáncer de mama ER α +

El análisis del comportamiento proliferativo mediante curvas de crecimiento celular evidenció diferencias entre las células control y aquellas expuestas a topotecán, lo que sugiere que la presión farmacológica puede alterar la dinámica de proliferación celular. Estos cambios reflejan ajustes funcionales en los procesos de crecimiento y adaptación celular frente al estrés inducido por el tratamiento.

De manera consistente, los ensayos de formación de colonias y viabilidad celular mediante MTT permitieron evaluar la capacidad de supervivencia celular bajo condiciones de exposición al fármaco. Los resultados mostraron variaciones en la proliferación y en la viabilidad metabólica de las células tratadas en comparación con el grupo control, lo que indica que la exposición prolongada al topotecán afecta la capacidad clonogénica y la respuesta metabólica celular frente a agentes citotóxicos.

Por otra parte, el análisis de expresión génica mediante qPCR reveló alteraciones en genes asociados a la señalización de daño en el ADN, reparación genómica y regulación del ciclo celular. Estos cambios sugieren que las células expuestas al tratamiento activan mecanismos moleculares vinculados a la respuesta al daño genético y al control de la proliferación celular, procesos que podrían contribuir a la adaptación celular frente a la presión farmacológica.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la exposición prolongada a topotecán en células MCF-7 induce modificaciones tanto funcionales como moleculares que reflejan procesos de adaptación celular frente al estrés farmacológico. Si bien el presente estudio se desarrolló en un modelo *in vitro*, los hallazgos aportan información relevante para comprender cómo las células tumorales pueden responder y ajustarse a la presión

terapéutica. En este sentido, el modelo experimental desarrollado constituye una herramienta útil para el estudio de los mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos y establece una base para futuras investigaciones orientadas a profundizar en los procesos de resistencia farmacológica y en el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas en cáncer de mama ER α +

RECOMENDACIONES

1. Evaluar los resultados en otras líneas celulares de cáncer de mama.

Se recomienda replicar los experimentos en otras líneas celulares, tanto ER α +

 como de otros subtipos moleculares, con el fin de determinar si los patrones de respuesta observados en las células MCF-7 también se presentan en otros modelos celulares.

2. Complementar el análisis molecular con estudios a nivel proteico.

Sería importante realizar análisis adicionales, como western blot u otras técnicas proteómicas, para confirmar si los cambios observados en la expresión génica se reflejan también en modificaciones a nivel de proteínas y en la actividad de las rutas celulares estudiadas.

3. Profundizar en el estudio de la resistencia cruzada con taxanos.

Se recomienda realizar experimentos adicionales que permitan evaluar con mayor detalle la posible resistencia cruzada entre topotecán y taxanos, analizando factores como la expresión de transportadores de eflujo de fármacos o cambios en proteínas asociadas a la dinámica de los microtúbulos.

4. Validar los resultados en modelos experimentales más complejos.

Para fortalecer la relevancia biológica de los hallazgos, se recomienda validar los resultados obtenidos en sistemas más cercanos a las condiciones fisiológicas, como cultivos tridimensionales, organoides tumorales o modelos in vivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, H., Solé, X., Bonifaci, N., Serra-Musach, J., Islam, A., López-Bigas, N., Méndez-Pertuz, M., Beijersbergen, R. L., Lázaro, C., Urruticoechea, A., & Pujana, M. A. (2010). Biological reprogramming in acquired resistance to endocrine therapy of breast cancer. *Oncogene*, 29(45), 6071–6083. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.333>
- Alshammari, M. K., Alghazwani, M. K., Alharbi, A. S., Alqurashi, G. G., Kamal, M., Alnufaie, S. R., Alshammari, S. S., Alshehri, B. A., Tayeb, R. H., Bougeis, R. J. M., Aljehani, A. A., Alotaibi, N. M., Abida, A., & Imran, Mohd. (2022). Nanoplatform for the Delivery of Topotecan in the Cancer Milieu: An Appraisal of its Therapeutic Efficacy. *Cancers*, 15(1), 65. <https://doi.org/10.3390/cancers15010065>
- Al-thoubaity, F. K. (2020). Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, 49, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.11.021>
- Anbalagan, M., & Rowan, B. G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.016>
- Aniogo, E. C., George, B. P., & Abrahamse, H. (2022). Characterization of resistant MCF-7 breast cancer cells developed by repeated cycles of photodynamic therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.964141>
- Arellano Acosta, S. M. (11 de 6 de 2021). Análisis de variantes en genes implicados en la ruta del receptor de estrógenos y su posible asociación con cáncer de mama en mujeres jóvenes. Obtenido de <https://hdl.handle.net/11285/639683>
- Azarenko, O., Smiyun, G., Mah, J., Wilson, L., & Jordan, M. A. (2014). Antiproliferative Mechanism of Action of the Novel Taxane Cabazitaxel as Compared with the Parent Compound Docetaxel in MCF7 Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(8), 2092–2103. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0265>

- Barbosa Gómez, J. (Septiembre de 2022). ANÁLISIS DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS METILTRANSFERASAS DE M6A METTL3, METTL14, METTL16 Y DE LAS PROTEÍNAS LECTORAS YTHDF1-3, YTHDC1-2 EN LA LINEA CELULAR MCF-7 SENSIBLE Y RESISTENTE AL TAMOXIFENO Y EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA . Obtenido de <https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/b20e10c0-f00d-487a-a5de-99845f0f7167/content>
- Bartek, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nrm2231>
- Beretta, G. L., Cassinelli, G., Rossi, G., Azzariti, A., Corbeau, I., Tosi, D., & Perego, P. (2025). Novel insights into taxane pharmacology: An update on drug resistance mechanisms, immunomodulation and drug delivery strategies. *Drug Resistance Updates*, 81, 101223. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2025.101223>
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*, 11(10), 1618. <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>
- Burstein, H. J., & Winer, E. P. (2000). Primary Care for Survivors of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 343(15), 1086–1094. <https://doi.org/10.1056/NEJM200010123431506>
- Carbonell, Y. (2023). Prevalencia de respuesta patológica completa en pacientes triple negativo tratadas con neoadyuvancia en el Instituto de Oncología Doctor Heriberto Pieter, 2017-2021. Obtenido de <https://repositorio.unphu.edu.do/handle/123456789/5297>

- Castellanos Ledesma Beatriz Alejandra. (2018). ANALISIS DE LA TASA DE RESPUESTA PATOLÓGICA COMPLETA DEL ESQUEMA TAXANO 5437 ANTRACICLINA 1666 COMO NEOADYUVANCIA EN LAS PACIENTES CON CANCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO.
- Chen, G., Liu, W., & Yan, B. (2022). Breast Cancer MCF-7 Cell Spheroid Culture for Drug Discovery and Development. *Journal of Cancer Therapy*, 13(03), 117–130. <https://doi.org/10.4236/jct.2022.133009>
- Chen, H., Zhang, M., & Deng, Y. (2023). Long Noncoding RNAs in Taxane Resistance of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12253. <https://doi.org/10.3390/ijms241512253>
- Chen, P., Li, B., & Ou-Yang, L. (2022). Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 839005. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.839005>
- Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 616–627. <https://doi.org/10.1038/nrm2450>
- Diana Schlamadinger. (n.d.). Understanding the Molecular Subtypes of Breast Cancer. Breast Cancer Research Foundation. Retrieved October 29, 2025, from <https://www.bcrf.org/about-breast-cancer/molecular-subtypes-breast-cancer/>
- Díaz Pérez, R. F., & Arriciaga Vázquez, J. A. (2022). Utilidad de la mamografía y la ecografía en tejido fibroglandular denso como tamizaje de cáncer de mama. *Oncología (Ecuador)*, 32(3), 310–319.
- Dong, C., Wu, J., Chen, Y., Nie, J., & Chen, C. (2021). Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628690>

- Duran, G. E., Wang, Y. C., Francisco, E. B., Rose, J. C., Martinez, F. J., Collier, J., Brassard, D., Vrignaud, P., & Sikic, B. I. (2015). Mechanisms of Resistance to Cabazitaxel. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(1), 193–201. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0155>
- Fiocchetti, M., Nuzzo, M. T., Totta, P., Acconcia, F., Ascenzi, P., & Marino, M. (2014). Neuroglobin, a pro-survival player in estrogen receptor α -positive cancer cells. *Cell Death & Disease*, 5(10), e1449–e1449. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.418>
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2020). In vitro cytotoxicity assays: The MTT assay and its derivatives. *Methods in Molecular Biology*, 2118, 57–68. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0270-6_5
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Gautam, S., Maurya, R., Vikal, A., Patel, P., Thakur, S., Singh, A., Gupta, G. Das, & Kurmi, B. Das. (2025). Understanding drug resistance in breast cancer: Mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Medicine in Drug Discovery*, 26, 100210. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2025.100210>
- González-Suárez, E., López-Fernández, L.A., & Pérez-Moreno P. (2020). Resistance mechanisms in breast cancer: A review of the literature. *Breast Cancer Research and Treatment*, 182(3), 619-634.
- Gourley, C., et al. (2019). Molecular subtypes and therapeutic strategies in breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(6), 369–386.
- Grimsley, H. E., Antczak, M., Reddin, I. G., Weiler, N., McLaughlin, K.-M., Rothweiler, F., Haas, J., Nist, A., Mernberger, M., Stiewe, T., Fenton, T. R., Speidel, D., Harper-Wynne, C., Cox, K., Heckl, D., Cinatl, J., Wass, M. N., Garrett, M. D., & Michaelis, M. (2025). Using a novel panel of drug-resistant triple-negative breast cancer cell lines to

identify candidate therapeutic targets and biomarkers. *Cancer Letters*, 624, 217754. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217754>

- Gu, Y., Yang, R., Zhang, Y., Guo, M., Takehiro, K., Zhan, M., Yang, L., & Wang, H. (2025). Molecular mechanisms and therapeutic strategies in overcoming chemotherapy resistance in cancer. *Molecular Biomedicine*, 6(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s43556-024-00239-2>
- Guzmán, C., et al. (2014). An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS ONE*, 9(3), e92444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092444>
- Helleday, T., Eshtad, S., & Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 585–598. <https://doi.org/10.1038/nrg3729>
- Hessami, A., Ghadirzadeh, E., Ashrafi, S., Taghavi, F., Elyasi, F., Gheibi, M., Zaboli, E., Alizadeh-Navaei, R., Akbari Gelvardi, F., Hedayatizadeh-Omran, A., & Moosazadeh, M. (2025). Depression, anxiety, and stress in breast cancer patients: prevalence, associated risk factors, and clinical correlates. *Scientific Reports*, 15(1), 31084. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-17285-7>
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*, 6(3), 1769–1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>
- Huang, W., Ding, L., Wang, Y., Sun, L., Zhang, S., & Zhou, X. (2021). Breast cancer cell viability and drug response assessment using tetrazolium-based assays. *Frontiers in Oncology*, 11, 652098. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.652098>
- Iida, K., & Okada, M. (2024). Identifying Key Regulatory Genes in Drug Resistance Acquisition: Modeling Pseudotime Trajectories of Breast Cancer Single-Cell Transcriptome. *Cancers*, 16(10), 1884. <https://doi.org/10.3390/cancers16101884>

- Jamie DePolo. (2024). Molecular Subtypes of Breast Cancer. <https://www.breastcancer.org/types/molecular-subtypes>
- Jeselsohn, R., Buchwalter, G., De Angelis, C., Brown, M., & Schiff, R. (2015). ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(10), 573–583. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.117>
- Jeselsohn, R., et al. (2022). ESR1 mutations—A mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(9), 545–561.
- Johnson, R., & Lee, T. (2022). Targeting the estrogen receptor in breast cancer therapy: Current strategies and future directions. *Clinical Cancer Research*, 28(12), 2456-2465.
- 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>
- Kinnel, B., Singh, S. K., Oprea-Ilie, G., & Singh, R. (2023). Targeted Therapy and Mechanisms of Drug Resistance in Breast Cancer. *Cancers*, 15(4), 1320. <https://doi.org/10.3390/cancers15041320>
- Kollmannsberger, C., Mross, K., Jakob, A., Kanz, L., & Bokemeyer, C. (1999). Topotecan – A Novel Topoisomerase I Inhibitor: Pharmacology and Clinical Experience. *Oncology*, 56(1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000011923>
- Kulkoyluoglu, E., & Madak-Erdogan, Z. (2016). Nuclear and extranuclear-initiated estrogen receptor signaling crosstalk and endocrine resistance in breast cancer. *Steroids*, 114, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.06.007>
- Li, H., Prever, L., Hirsch, E., & Gulluni, F. (2021). Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer. *Cancers*, 13(14), 3517. <https://doi.org/10.3390/cancers13143517>

- Liao, X., Lu, D., Wang, N., Liu, L., Wang, Y., Li, Y., Yan, T., Sun, X., Hu, P., & Zhang, T. (2014). Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. *The FEBS Journal*, 281(3), 927–942. <https://doi.org/10.1111/febs.12658>
- Liu, Y., Ma, H., & Yao, J. (2020). ER α , A Key Target for Cancer Therapy: A Review. *OncoTargets and Therapy*, 13, 2183–2191. <https://doi.org/10.2147/OTT.S236532>
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481, 287–294.
- Maloney, S. M., Hoover, C. A., Morejon-Lasso, L. V., & Prosperi, J. R. (2020). Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers*, 12(11), 3323. <https://doi.org/10.3390/cancers12113323>
- Martinez, A., Lozano Arrazola, A., Rodríguez Velázquez, A., & Galindo Vázquez, O. (2015). Impacto psicológico del cáncer de mama y la mastectomía. . Obtenido de 10.13140/RG.2.1.3905.6725.
- McDermott, M., Eustace, A. J., Busschots, S., Breen, L., Crown, J., Clynes, M., Oâ€™MDonovan, N., & Stordal, B. (2014). In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in Oncology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00040>
- McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal heterogeneity and tumor evolution. *Cell*, 168(4), 613–628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>
- 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>

- Nami, B., & Wang, Z. (2018). Genetics and Expression Profile of the Tubulin Gene Superfamily in Breast Cancer Subtypes and Its Relation to Taxane Resistance. *Cancers*, 10(8), 274. <https://doi.org/10.3390/cancers10080274>
- Nascimento, R. G. do, & Otoni, K. M. (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*, 30. <https://doi.org/10.29289/25945394202020200024>
- Neophytou, C. M., Trougakos, I. P., Erin, N., & Papageorgis, P. (2021). Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers*, 13(17), 4363. <https://doi.org/10.3390/cancers13174363>
- Palacios Navarro, L. M. (2022). EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA Y LOS PROCESOS CELULARES ASOCIADOS A LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA.
- Pedram, A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2009). Estrogen receptor signaling and DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5527–5532. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813149106>
- Penberthy, J. K., Stewart, A. L., Centeno, C. F., & Penberthy, D. R. (2023). Psychological Aspects of Breast Cancer. *Psychiatric Clinics of North America*, 46(3), 551–570. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2023.04.010>
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789–802. <https://doi.org/10.1038/nrc1977>
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer drugs. *Chemical Biology*, 17(5), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.012>

- Porras, L., Ismail, H., & Mader, S. (2021). Positive Regulation of Estrogen Receptor Alpha in Breast Tumorigenesis. *Cells*, 10(11), 2966. <https://doi.org/10.3390/cells10112966>
- 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>
- Procuraduría Federal del Consumidor. (2021). Informe sobre el cáncer en México. México: Procuraduría Federal del Consumidor.
- Rafehi, H., et al. (2020). Methods for assessing long-term treatment effects in cancer cell lines: The colony formation assay revisited. *Scientific Reports*, 10, 12340.
- Reed, A. E. M., Kutasovic, J. R., Lakhani, S. R., & Simpson, P. T. (2015). Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research*, 17(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0519-x>
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Rosa, R., Monteleone, F., Zambrano, N., & Bianco, R. (2014). In vitro and in vivo models for analysis of resistance to anticancer molecular therapies. *Current Medicinal Chemistry*, 21(14), 1595–1606. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990226>
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in DNA repair. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 68–78.
- Saha, T., & Lukong, K. E. (2025). Decoding estrogen receptor and GPER biology: structural insights and therapeutic advances in ER α -positive breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1513225>

- Seliger, B., Al-Samadi, A., Yang, B., Salo, T., & Wickenhauser, C. (2022). In vitro models as tools for screening treatment options of head and neck cancer. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.971726>
- Sellitto, A., D'Agostino, Y., Alexandrova, E., Lamberti, J., Pecoraro, G., Memoli, D., Rocco, D., Coviello, E., Giurato, G., Nassa, G., Tarallo, R., Weisz, A., & Rizzo, F. (2020). Insights into the Role of Estrogen Receptor β in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, 12(6), 1477. <https://doi.org/10.3390/cancers12061477>
- Sharma, N. K., Bahot, A., Sekar, G., Bansode, M., Khunteta, K., Sonar, P. V., Hebale, A., Salokhe, V., & Sinha, B. K. (2024). Understanding Cancer's Defense against Topoisomerase-Active Drugs: A Comprehensive Review. *Cancers*, 16(4), 680. <https://doi.org/10.3390/cancers16040680>
- Smith, J., Brown, A., & Green T. (2019). Hormonal signaling in breast cancer: Implications for therapy. *Journal of Cancer Research*, 110(5), 1234-1245.
- Soragni, A., Knudsen, E. S., O'Connor, T. N., Tognon, C. E., Tyner, J. W., Gini, B., Kim, D., Bivona, T. G., Zang, X., Witkiewicz, A. K., Goodrich, D. W., Jiang, D., Gammon, S. T., Willey, C. D., Boutros, P. C., Sandulache, V. C., Osman, A. A., Myers, J. N., Mehla, K., ... National Cancer Institute (NCI) Acquired Resistance to Therapy Network (ARTNet). (2025). Acquired resistance in cancer: towards targeted therapeutic strategies. *Nature Reviews. Cancer*, 25(8), 613–633. <https://doi.org/10.1038/s41568-025-00824-9>
- Sprague, B. L., Trentham-Dietz, A., Gangnon, R. E., Ramchandani, R., Hampton, J. M., Robert, S. A., Remington, P. L., & Newcomb, P. A. (2011). Socioeconomic status and survival after an invasive breast cancer diagnosis. *Cancer*, 117(7), 1542–1551. <https://doi.org/10.1002/cncr.25589>
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.001>

- Tecalco-Cruz, A. C., Macías-Silva, M., Ramírez-Jarquín, J. O., & Ramírez-Jarquín, U. N. (2022). Decoding the Therapeutic Implications of the ER α Stability and Subcellular Distribution in Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.867448>
- Toker, P., Ayten, H., Demiralay, Ö. D., Bınarcı, B., Turan, G., Olgun, Ç. E., Yaşar, P., Akman, H. B., & Muyan, M. (2025). A reappraisal of cell cycle phase enrichment in synchronized estrogen receptor-positive cell models derived from breast adenocarcinomas. *Scientific Reports*, 15(1), 5949. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90456-8>
- Tosca, E. M., Ronchi, D., Facciolo, D., & Magni, P. (2023). Replacement, Reduction, and Refinement of Animal Experiments in Anticancer Drug Development: The Contribution of 3D In Vitro Cancer Models in the Drug Efficacy Assessment. *Biomedicines*, 11(4), 1058. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041058>
- Urzì, O., Gasparro, R., Costanzo, E., De Luca, A., Giavaresi, G., Fontana, S., & Alessandro, R. (2023). Three-Dimensional Cell Cultures: The Bridge between In Vitro and In Vivo Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12046. <https://doi.org/10.3390/ijms241512046>
- Valdez, E. R. (2020). Perfil inmunohistoquímico del cáncer de mama en mujeres tratadas en el Instituto Oncológico y Especialidades del Nordeste, San Francisco de Macoris, prov. Duarte, República Dominicana, mayo 2015-mayo 2020. Obtenido de <https://repositorio.unphu.edu.do/handle/123456789/3823>
- Vaz, S. C., Woll, J. P. P., Cardoso, F., Groheux, D., Cook, G. J. R., Ulaner, G. A., Jacene, H., Rubio, I. T., Schoones, J. W., Peeters, M.-J. V., Poortmans, P., Mann, R. M., Graff, S. L., Dibble, E. H., & de Geus-Oei, L.-F. (2024). Joint EANM-SNMMI guideline on the role of 2-[18F]FDG PET/CT in no special type breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 51(9), 2706–2732. <https://doi.org/10.1007/s00259-024-06696-9>

- Wang, W., Zhang, Y., & Liu, Q. (2017). Mechanisms of resistance to topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. *Cancer Letters*, 392, 45-54.
- World Health Organization. (2021). Breast cancer. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Yang, C.-H., Schneider, E., Kuo, M.-L., Volk, E. L., Rocchi, E., & Chen, Y.-C. (2000). BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 60(6), 831–837. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00396-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00396-8)
- Yakkala, P. A., Penumallu, N. R., Shafi, S., & Kamal, A. (2023). Prospects of Topoisomerase Inhibitors as Promising Anti-Cancer Agents. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1456. <https://doi.org/10.3390/ph16101456>
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, 16(1), 2–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>
- Zheng, H.-C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>

ANEXOS

ANEXO A. Protocolo de Preparación de Medio de Cultivo DMEM High Glucose

Protocolo de Preparación de Medio de Cultivo DMEM High Glucose para células MCF-7

Objetivo: Preparar 1 litro de medio DMEM High Glucose suplementado para mantenimiento celular.

Materiales:

- DMEM High Glucose en polvo
- Agua destilada estéril
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Piruvato de sodio 100 mM
- Hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) para ajuste de pH
- Filtro estéril de 0.22 μm
- Suero fetal bovino (FBS)
- Penicilina/Estreptomicina (P/S)
- pH-metro calibrado

Procedimiento:

1. Disolver el contenido del medio DMEM en polvo en aproximadamente 1 L de agua destilada.
2. Agregar 3.703 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y mezclar hasta su completa disolución.
3. Añadir piruvato de sodio para una concentración final de 1 mM. Si se utiliza stock 100 mM, agregar 10 mL por cada litro de medio.
4. Homogeneizar la mezcla mediante agitación continua.
5. Calibrar el pH-metro con soluciones buffer pH 4, 7 y 10.
6. Medir el pH del medio y ajustarlo cuidadosamente con NaOH o HCl hasta obtener un pH final entre 7.2 y 7.4.
7. Filtrar el medio en cámara de flujo laminar usando filtro estéril de 0.22 μm .
8. Almacenar el medio base a 4 °C.
9. Antes de usar con células, templar el medio a baño María a 37 °C para evitar choque térmico.
10. En la primera preparación, suplementar con 10% FBS y 1% Penicilina/Estreptomicina.
11. En usos posteriores, si el medio ya fue suplementado, solo calentar a 37 °C antes de utilizar.

Condiciones de uso:

- Incubación celular: 37 °C, 5% CO_2 .
- Mantener condiciones estériles durante todo el procedimiento.

Notas:

- Etiquetar con fecha de preparación, nombre del medio y si fue suplementado.
- Descartar si presenta turbidez, precipitados anormales o cambio de color no esperado.

ANEXO B. Datos de las curva de crecimiento celular

Curva de crecimiento N°1 MCF7 sin Topo		Tubo 1		Tubo 2		Tubo 3		Tubo 4		Gran Total
		A	B	A	B	A	B	A	B	
Día 0	Conteo									2000
	Promedio Total células									
Día 2	Conteo	39	31	37	28	10	14	17	31	6468.75
	Promedio	35		32.5		12		24		
	Total células	8750		8125		3000		6000		
Día 3	Conteo	56	35	31	51	50	41	27	24	9843.75
	Promedio	45.5		41		45.5		25.5		
	Total células	11375		10250		11375		6375		
Día 4	Conteo	71	67	100	90	56	63	77	64	18375
	Promedio	69		95		59.5		70.5		
	Total células	17250		23750		14875		17625		
Día 6	Conteo	153	126	139	157	153	200	110	121	36218.75
	Promedio	139.5		148		176.5		115.5		
	Total células	34875		37000		44125		28875		
Día 8	Conteo	224	192	299	286	232	192	190	212	57093.75
	Promedio	208		292.5		212		201		
	Total células	52000		73125		53000		50250		
Día 10	Conteo	126	155	208	242	178	194	145	131	43093.75
	Promedio	140.5		225		186		138		
	Total células	35125		56250		46500		34500		

Curva de crecimiento N°1 MCF7+ Topo 1uM		Tubo 1		Tubo 2		Tubo 3		Tubo 4		Gran Total
		A	B	A	B	A	B	A	B	
Día 0	Conteo									2000
	Promedio Total células									
Día 2	Conteo	21	26	17	21	22	41	27	13	5875
	Promedio	23.5		19		31.5		20		
	Total células	5875		4750		7875		5000		
Día 3	Conteo	18	25	18	16	15	23	24	25	5125
	Promedio	21.5		17		19		24.5		
	Total células	5375		4250		4750		6125		
Día 4	Conteo	22	21	20	30	22	17	30	23	5781.25
	Promedio	21.5		25		19.5		26.5		
	Total células	5375		6250		4875		6625		
Día 6	Conteo	9	16	10	17	22	12	18	18	3812.5
	Promedio	12.5		13.5		17		18		
	Total células	3125		3375		4250		4500		
Día 8	Conteo	5	13	18	15	10	11	10	12	2937.5
	Promedio	9		16.5		10.5		11		
	Total células	2250		4125		2625		2750		
Día 10	Conteo	10	7	5	15	14	16	4	11	2562.5
	Promedio	8.5		10		15		7.5		
	Total células	2125		2500		3750		1875		

Curva de crecimiento N°2		Tubo 1		Tubo 2		Tubo 3		Tubo 4		Gran Total
MCF7 sin Topo		A	B	A	B	A	B	A	B	
Día 0	Conteo									2000
	Promedio									
	Total células									
Día 2	Conteo	10	9	7	12	11	4	15	18	2687.5
	Promedio	9.5		9.5		7.5		16.5		
	Total células	2375		2375		1875		4125		
Día 3	Conteo	7	12	5	17	14	10	19	14	3062.5
	Promedio	9.5		11		12		16.5		
	Total células	2375		2750		3000		4125		
Día 4	Conteo	11	24	30	15	18	15	11	18	4437.5
	Promedio	17.5		22.5		16.5		14.5		
	Total células	4375		5625		4125		3625		
Día 6	Conteo	53	68	62	67	58	50	55	52	14531.25
	Promedio	60.5		64.5		54		53.5		
	Total células	15125		16125		13500		13375		
Día 8	Conteo	111	95	119	125	109	89	117	107	27250
	Promedio	103		122		99		112		
	Total células	25750		30500		24750		28000		
Día 10	Conteo	111	133	199	209	200	156	187	201	43625
	Promedio	122		204		178		194		
	Total células	30500		51000		44500		48500		

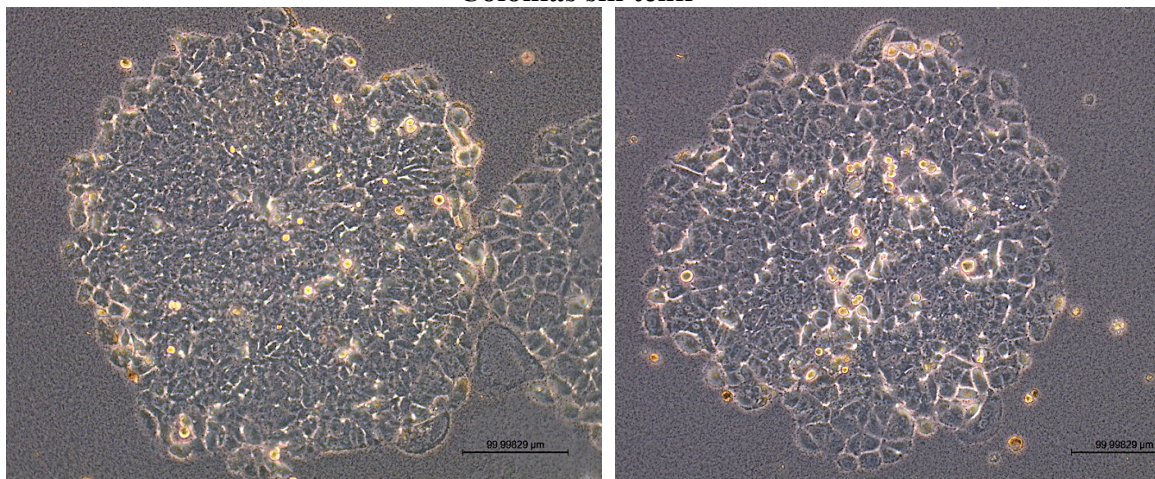
Curva de crecimiento N°2		Tubo 1		Tubo 2		Tubo 3		Tubo 4		Gran Total
MCF7+ Topo 1uM		A	B	A	B	A	B	A	B	
Día 0	Conteo									2000
	Promedio									
	Total células									
Día 2	Conteo	6	5	7	10	7	7	9	9	1875
	Promedio	5.5		8.5		7		9		
	Total células	1375		2125		1750		2250		
Día 3	Conteo	5	10	9	4	7	8	4	7	1687.5
	Promedio	7.5		6.5		7.5		5.5		
	Total células	1875		1625		1875		1375		
Día 4	Conteo	3	3	3	4	4	8	5	5	1093.75
	Promedio	3		3.5		6		5		
	Total células	750		875		1500		1250		
Día 6	Conteo	6	8	10	5	2	9	5	8	1656.25
	Promedio	7		7.5		5.5		6.5		
	Total células	1750		1875		1375		1625		
Día 8	Conteo	1	2	8	1	6	1	2	4	781.25
	Promedio	1.5		4.5		3.5		3		
	Total células	375		1125		875		750		
Día 10	Conteo	6	2	2	1	3	3	1	2	625
	Promedio	4		1.5		3		1.5		
	Total células	1000		375		750		375		

Curva de crecimiento N°3		Tubo 1		Tubo 2		Tubo 3		Tubo 4		Gran Total
MCF7 sin Topo		A	B	A	B	A	B	A	B	
Día 0	Conteo									2000
	Promedio									
	Total células									
Día 2	Conteo	12	14	7	10	14	6	8	9	2500
	Promedio	13		8.5		10		8.5		
	Total células	3250		2125		2500		2125		
Día 3	Conteo	26	19	7	9	8	16	7	13	3281.25
	Promedio	22.5		8		12		10		
	Total células	5625		2000		3000		2500		
Día 4	Conteo	16	14	17	23	16	20	18	32	4875
	Promedio	15		20		18		25		
	Total células	3750		5000		4500		6250		
Día 6	Conteo	59	52	36	60	61	43	72	66	14031.25
	Promedio	55.5		48		52		69		
	Total células	13875		12000		13000		17250		
Día 8	Conteo	107	114	138	140	118	107	119	109	29750
	Promedio	110.5		139		112.5		114		
	Total células	27625		34750		28125		28500		
Día 10	Conteo	71	53	155	186	97	168	132	113	30468.75
	Promedio	62		170.5		132.5		122.5		
	Total células	15500		42625		33125		30625		

Curva de crecimiento N°3		Tubo 1		Tubo 2		Tubo 3		Tubo 4		Gran Total
MCF7+ Topo 1uM		A	B	A	B	A	B	A	B	
Día 0	Conteo									2000
	Promedio									
	Total células									
Día 2	Conteo	16	9	10	6	11	10	9	18	2781.25
	Promedio	12.5		8		10.5		13.5		
	Total células	3125		2000		2625		3375		
Día 3	Conteo	7	4	4	6	7	2	1	10	1281.25
	Promedio	5.5		5		4.5		5.5		
	Total células	1375		1250		1125		1375		
Día 4	Conteo	11	6	7	6	10	5	9	6	1875
	Promedio	8.5		6.5		7.5		7.5		
	Total células	2125		1625		1875		1875		
Día 6	Conteo	5	4	5	6	8	9	8	2	1468.75
	Promedio	4.5		5.5		8.5		5		
	Total células	1125		1375		2125		1250		
Día 8	Conteo	3	3	8	4	4	5	1	4	1000
	Promedio	3		6		4.5		2.5		
	Total células	750		1500		1125		625		
Día 10	Conteo	5	3	5	2	1	4	2	2	750
	Promedio	4		3.5		2.5		2		
	Total células	1000		875		625		500		

ANEXO C. Fotografías microscópicas de Colonias

Colonias sin teñir



Colonias Teñidas

