



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Odontología

Centro de Investigación y Estudios

Avanzados “Dr.Keisaburo Miyata”

“Cambios en la expresión del receptor de la vitamina D en células de cáncer de mama suplementadas con vitamina D y dexametasona y su efecto en la muerte celular”

TESIS

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

MCS. Guadalupe Ortiz Cabrera

Directora:

Irazú Contreras García, Ph. D

Codirector:

José Antonio Estrada Guadarrama, Ph.D

Asesor:

Dr. en C. Saúl González Guzmán

Toluca, Estado de México, noviembre 2024.



INDICE

Portada	<i>Pág.</i>
Índice	2
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	
1. Marco teórico	
1.1 Cáncer de mama	7
1.2 Cáncer de mama y vitamina D	13
1.3 Cáncer de mama y glucocorticoides	15
1.4 Señalización de la vitamina D a través del receptor VDR	17
1.5 ¿Cómo afectan los glucocorticoides la señalización del VDR?	20
1.6 ¿Cómo afectan los glucocorticoides y la vitamina D a la muerte celular?	23
2. Planteamiento del problema	26
3. Justificación	28
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	31
6. Diseño metodológico	
6.1 Diseño de estudio	32
6.2 Universo y muestra	32
6.3 Criterios de inclusión y exclusión	32
6.4 Variables	33
6.5 Procedimientos	36
6.6 Análisis de datos	45
6.7 Aspectos éticos	46
7. Resultados	47
7.1 Artículo aceptado	48
7.1.1 Título del artículo aceptado	
7.1.2 Página frontal del manuscrito	

7.1.3 Carta de aceptación	
7.1.4 Resumen	
7.1.5 Acuse de recibido del segundo artículo	
7.1.6 Resumen del artículo	
8. Discusión general	49
9. Conclusiones	51
10. Bibliografía	52
11. Anexos	
11.1 Ficha de la línea celular T47-D	56
11.2 Soluciones para western blot	57
11.3 Soluciones para preparar geles de acrilamida para electroforesis SDS-PAGE	58 59
11.4 Soluciones para transferencia de proteínas	60
Otras soluciones	

Resumen

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en la mujer. El tratamiento suele ser efectivo siempre y cuando exista un diagnóstico oportuno, actualmente las intervenciones nutricionales se han utilizado como adyuvantes al tratamiento tradicional, ya que las terapias combinadas ofrecen una mejor probabilidad de éxito. La suplementación con vitamina D se ha propuesto como un tratamiento preventivo o adyuvante en varios tipos de cáncer, mientras que los glucocorticoides se utilizan a menudo como tratamientos inmunomoduladores para el cáncer de mama. Se ha informado que estas moléculas afectan la viabilidad y proliferación celular en diferentes tipos de cáncer. El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en la expresión del receptor VDR, el ciclo y viabilidad celular de una línea celular de cáncer de mama humano suplementada con vitamina D (10,40 y 100 μM), dexametasona (5,10,40) μM o la combinación (40 μM dexametasona/100 μM vitamina D), por 24, 48 y 72 horas. La expresión de VDR, la viabilidad, la progresión del ciclo, muerte celular y la expresión de la proteína pro-apoptótica caspasa 3 activa, se analizaron mediante una combinación de espectrofotometría, citometría de flujo y Western Blot. Los resultados muestran que la expresión del receptor VDR y la muerte celular aumentaron significativamente después de la suplementación con dexametasona, los datos sugieren que la muerte celular ocurre mayormente por necrosis aun cuando también se observó una mayor expresión de la caspasa 3 activa, por otro lado, los estímulos con vitamina D indujeron un efecto menor. La combinación de ambos estímulos mostró resultados similares a la estimulación con dexametasona sola. Estos datos sugieren que la estimulación con dexametasona, pero no con vitamina D, aumenta la expresión del receptor VDR, al tiempo que disminuye la viabilidad celular de las células de cáncer de mama humano *in vitro*, además de posiblemente generar muerte celular.

Palabras clave: Cáncer de mama; Vitamina D; Dexametasona; Viabilidad; Muerte celular

Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer in women. Treatment is usually effective if there is an early diagnosis, currently, nutritional interventions have been used as adjuvants to traditional treatment, since combined therapies offer a better probability of success. Vitamin D supplementation has been proposed as a preventive or adjuvant treatment in several types of cancer, while glucocorticoids are often used as immunomodulatory treatments for breast cancer. These molecules have been reported to affect cell viability and proliferation in different types of cancer. The aim of this study was to evaluate the changes in VDR receptor expression, cell cycle and viability in a human breast cancer cell line supplemented with vitamin D (10, 40 and 100 μM), dexamethasone (5, 10, 40 μM or the combination (40 μM dexamethasone/100 μM vitamin D), for 24, 48 and 72 hours. VDR expression, viability, cell cycle progression and cell death were analyzed by spectrophotometry, flow cytometry and western blotting, respectively. The results show that VDR receptor expression and cell death were significantly increased after dexamethasone supplementation, in this case cell death was mostly by necrosis, however there was also a higher expression of active caspase 3, while the stimuli with vitamin D had a minor effect. The combination of both stimuli showed similar results to stimulation only with dexamethasone alone. These data suggest that stimulation with dexamethasone, but not with vitamin D, increases VDR receptor expression, while decreasing the proliferative capacity and viability of human breast cancer cells in vitro, in addition to induce cell death.

Keywords: Breast cancer; Vitamin D; Dexamethasone; Viability; Cell death

Introducción

El cáncer de mama suele desarrollarse principalmente en las células del revestimiento epitelial de los conductos, y en menor medida, en los lóbulos del tejido glandular de la mama. Al inicio, el tumor canceroso suele permanecer en el conducto o lóbulo, donde llega a causar síntomas y tiene un mínimo potencial de metástasis¹. Sin embargo, conforme avanza el tiempo, este tumor localizado en el conducto o lóbulo puede avanzar e invadir el tejido mamario circundante, así como migrar a los ganglios linfáticos cercanos u a otros órganos.

El cáncer de mama ocupa el primer lugar de muerte en el mundo. En México, en el año 2022 se registraron 7,800 defunciones por cáncer de mama, de las cuales 700 de los casos presentados fueron por tumores metastásicos². De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de esta enfermedad incrementa conforme avanza la edad debido a los factores de riesgo que aumentan y que se combinan con la disminución en los mecanismos de reparación celular^{1, 2}, por lo tanto, la OMS se ha planteado el objetivo de reducir la mortalidad por este padecimiento entre los años 2020 y 2040 con tres pilares a alcanzar: la promoción de la salud; el diagnóstico oportuno y la gestión integral del cáncer de mama

Actualmente, el tratamiento del cáncer de mama puede ser eficaz siempre y cuando la enfermedad se detecte oportunamente. En particular, el tratamiento consiste en una combinación entre la extirpación quirúrgica, radioterapia, terapia hormonal, quimioterapia y/o terapia biológica dirigida. De esta manera, el tratamiento puede detener la progresión y diseminación del cáncer de mama¹.

A pesar de que existe un tratamiento para controlar el cáncer de mama, lamentablemente los factores de riesgo no son controlables en su totalidad y aunque fueran potencialmente modificables, el riesgo de padecer cáncer de mama solo se reduciría en un 30% en los próximos 20 años². Por otro lado, el pertenecer al sexo femenino es el principal factor de riesgo de cáncer de mama, pues solo entre el 0.5% y el 1% de los casos de cáncer de mama afectan a varones¹.

Es importante destacar que la elección del tratamiento para el cáncer de mama será de acuerdo con el estadio en el que se encuentre la enfermedad y que, hasta la fecha, ha tenido buenos resultados cuando se detecta en estadios tempranos. Sin embargo, el poder prevenir un estadio grave es un reto para la salud pública.

De modo que, la evidencia del uso de vitamina D y glucocorticoides en algunos tipos de cáncer, refleja que pudieran estar disminuyendo la progresión de los tumores, esto pareciera una buena opción para prevenir la gravedad y el tratamiento radical de la enfermedad. Para ello, se necesita de más investigación que pueda apoyar esta opción de prevención o tratamiento adyuvante. Es por ello, que en la presente investigación se evaluaron los cambios en la expresión del receptor VDR en la línea celular T47-D suplementada con vitamina D y dexametasona y su relación con la muerte celular con la finalidad de encontrar algunos de los mecanismos del efecto de la vitamina D y dexametasona sobre el desarrollo del cáncer de mama.

1. Marco teórico

1.1 Cáncer de mama

Anatomía e histología de la mama

La mama está formada principalmente por tejido adiposo y por la glándula mamaria ³, esta estructura se modifica durante los cambios hormonales y el embarazo, el tejido que predomina es el glandular, mientras que, durante la menopausia, la glándula se atrofia y el volumen de la mama ahora depende del tejido adiposo. La glándula está formada por diferentes lobulillos glandulares, entre 15 y 20 aproximadamente, de los cuales yacen los conductos galactóforos que se unen en el seno galactóforo. Por su parte, el seno galactóforo se conecta del interior de la mama con el exterior a través del pezón, por donde se expulsa la leche durante la lactancia materna ³.

Anatómicamente, la mama se localiza a partir de la 2ª hasta la 6ª costilla, medialmente hasta el esternón y lateralmente hasta la línea media axilar. Se inserta a la fascia del músculo pectoral mayor mediante los ligamentos de Cooper ³. La cola de la mama o cola de Spence, hace que se extienda la mama oblicuamente hacia la axila.

Por otro lado, la vasculatura del tejido mamario está a cargo de los vasos de la arteria y vena mamaria interna, localizados al lado del esternón. De la misma manera, recibe irrigación sanguínea de los vasos torácicos laterales de la rama de la arteria axilar, los intercostales y toracoacromiales ⁴.

El líquido intersticial de la glándula mamaria es drenado mediante el sistema linfático de la mama a través de los linfáticos interlobulillares, que conforman el plexo linfático subareolar, estos a su vez, drenan a los ganglios linfáticos, que se sitúan principalmente en la axila, en las proximidades de los vasos mamarios

internos e incluso supraclaviculares ⁴. Este drenaje linfático tiene gran relevancia en los tumores malignos, debido a que requieren de los vasos linfáticos para propagar la enfermedad a otros órganos del cuerpo.

Epidemiología del cáncer de mama

De acuerdo con la OMS ¹, la presencia del cáncer de mama incrementa con el avance en la edad, debido a los factores de riesgo que se van acumulando y que a su vez se combinan con la pérdida en la eficacia de los mecanismos de reparación celular. Además, partir de los 50 años hay un incremento en la tasa de defunción por tumores malignos, en hombres como en mujeres ².

En el año 2022, en el mundo se diagnosticaron 2.3 millones de casos de cáncer de mama en mujeres, con un registro de 670,000 defunciones. En México, la incidencia de cáncer de mama fue de 23, 790 casos entre la población de 20 años en adelante, esto es; 27.64 por cada 100 mil habitantes, presentándose mayormente en mujeres con un 51.92 contra 1.25 en los hombres. El total de defunciones por tumores malignos fue de 87,880 donde, el 9.0% fue por cáncer de mama (7,888), del total de estos diagnósticos un 99.4% se presentó en mujeres (7, 838), y solo un 0.6% fue en hombres (50) ².

Los estados con las tasas más altas de defunciones por tumores malignos de mama fueron: Ciudad de México, Sonora, Chihuahua, Morelos, Veracruz y Colima, con tasas de hasta 9.7 a 7.8 defunciones por cada 10 mil habitantes. En cambio, los estados con las tasas más bajas fueron: Quintana Roo, Guerrero, Querétaro, Yucatán, Durango, Guanajuato, Tlaxcala, Tabasco, Estado de México, Puebla y Aguascalientes, con tasas de 4.5 a 6.4 defunciones por cada 10 mil habitantes².

Fisiopatología del cáncer de mama

De acuerdo con la anatomía normal de la glándula mamaria existen dos estructuras primordiales: los conductos o ductos y los lobulillos, para ello en su mayoría los carcinomas se localizan en los conductos ⁵.

En cuanto a los carcinomas existen dos tipos; los invasores y los no invasores o *in situ*. Los invasores son aquellos que crecen hasta sobrepasar las paredes de la estructura en la que se encuentran y se expanden a los tejidos cercanos. Los carcinomas *in situ* nunca rebasan las paredes del sitio donde se crecen, aunque tengan un tamaño mayor. Por su parte, los invasores tienden a invadir los tejidos mamaros vecinos y a despegar grupos de células que viajaran a través de los vasos linfáticos. En los carcinomas *in situ*, entre el 5 y 10% se llegan a extender más allá de la mama causando metástasis ⁵.

La mayoría de los casos de cáncer de mama se localizan en el cuadrante superior externo, por arriba y afuera del pezón, a partir de ahí, suelen migrar las células metastásicas a los ganglios linfáticos situados en la axila, por ser el primer sitio donde drenan las vías linfáticas. Por ello, es importante saber si estos ganglios están comprometidos o no, de esta manera sería un indicio importante sobre la diseminación del cáncer de mama ⁶.

Al inicio el cáncer de mama suele ser asintomático, es hasta el momento de ser invasivo donde se torna sintomático, cuando es invasivo se divide en tres fases: localizada, regional y metastásica⁶, este último, puede llegar a dañar cualquier otro órgano del cuerpo humano ^{5,6}.

Clasificación molecular del cáncer de mama

Con base al perfil de expresión genética, se distinguen principalmente cuatro clases moleculares de cáncer de mama, entre ellos se encuentran; los tumores luminales que cuentan con un patrón fenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria; esto quiere decir, que expresan altas cantidades de citoqueratinas luminales ⁶. El principal es el cáncer de mama de tipo luminal A

que corresponde al 67% de los tumores, este tipo de cáncer es positivo al receptor de estrógenos (RE), negativo al receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER- 2 neu), en este las células tienen buena diferenciación y baja proliferación celular, por lo que histológicamente este cáncer se considera de bajo grado ^{5,6}.

Seguido del cáncer de mama luminal B, que es positivo al RE, pero en su mayoría este expresa bajos niveles de receptores hormonales, además es de alto grado debido a la alta expresión de Ki- 67 y con poca diferenciación celular ⁶. Por otro lado, el cáncer de mama luminal HER-2 neu, es caracterizado por expresar citoqueratinas 9 y 10, los cánceres positivos al receptor HER-2 neu tienen una alta expresión del gen ERBB2 (gen que da origen al receptor ERBB2 también conocido como HER-2 neu) y pueden ser positivos o no al RE ⁶.

El cáncer de mama de tipo basal corresponde a tumores negativos al RE, al receptor de progesterona (RP) y al HER-2 neu, por ello es que se denominan tumores triple negativo. Además de poseer un patrón fenotípico parecido al componente mioepitelial de la glándula mamaria ^{5,6}. Entonces, de acuerdo con la clasificación molecular del cáncer de mama es como se elige el plan terapéutico individualizado que pueda ser de éxito con menores efectos secundarios.

Factores de riesgo para el cáncer de mama

Los factores de riesgo en las mujeres son: la edad de 40 años en adelante, (aunque hay presencia en menores de esta edad); estilos de vida no saludables, mujeres con antecedentes familiares, consumo de alcohol y tabaco ⁵, entre otros factores que aún son discutidos como, por ejemplo:

Las mujeres nulíparas, aquellas mujeres que no hayan tenido hijos antes de los 30 años, mujeres que no hayan practicado la lactancia materna, los estilos de vida en las mujeres como; el fumar, ingerir bebidas alcohólicas, dietas altas en grasas, las mujeres con antecedentes de mastopatía fibroquística, aquellas mujeres que

hayan usado o usen hormonoterapia sustitutiva o con anovulatorios orales, la exposición a radiaciones, obesidad, y mujeres que han tenido otro tipo de cáncer, sobre todo de endometrio.

Diagnóstico del cáncer de mama

El diagnóstico del cáncer de mama suele iniciarse con el indicio de una tumoración palpable, que en más del 80% de los casos la mujer es quien la identifica mediante su autoexploración mamaria mensual ⁶. Es importante destacar que la autoexploración se debe realizar una vez al mes por parte de la mujer para que se pueda tener un diagnóstico oportuno y el tratamiento pueda ser favorable.

Una vez detectada alguna anormalidad en la mama por parte de la mujer, se debe ir a revisar inmediatamente para que el médico le realice el diagnóstico preclínico mediante una prueba de tamizaje por medio de un estudio radiológico (mastografía), que permite identificar el cáncer antes de que la mujer presente síntomas ⁶. Posterior al resultado de la mastografía, el diagnóstico temprano se realiza a través de una historia clínica encaminada a la búsqueda de factores de riesgo; seguido de un examen clínico haciendo énfasis en las glándulas mamarias y zonas linfoportadoras, así como estudios de ultrasonido complementarios. Por lo tanto, para establecer el diagnóstico definitivo es necesaria la presencia de alguna correlación entre los hallazgos clínicos, mastográficos e histopatológicos.

Signos y síntomas del cáncer de mama

Dentro de los principales signos y síntomas que pueden presentar las mujeres que desarrollen cáncer de mama; son los siguientes ⁵:

- Una tumoración palpable al tacto de consistencia dura, con presencia de dolor y que no desaparece con el paso de los días.
- La piel de la mama tiene aspecto rugoso, con apariencia a la "cáscara de una naranja".
- Puede notarse alguna deformidad asimétrica de la mama.

- La presencia de secreción mamaria, principalmente con sangre.
- Hundimiento del pezón.

Tratamiento para el cáncer de mama

Para la formulación del tratamiento a seguir se debe realizar de acuerdo con las categorías del sistema de clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios de la OMS ¹, donde se deben considerar las condiciones generales de salud de la paciente, la etapificación de la enfermedad, el estado hormonal de la mujer, los recursos humanos y materiales con que se cuente, considerando además la voluntad y libre decisión de la paciente para aceptar el tratamiento ⁴.

En la actualidad, los métodos terapéuticos que se usan para tratar el cáncer de mama son: cirugía de tipo conservador, radical curativo, radical paliativo y reconstructivo, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y hormonoterapia. De los cuales los principales a elegir en su mayoría son la cirugía y la radioterapia debido a su acción locorregional; en la quimioterapia y la hormonoterapia su acción es de tipo sistémica ⁴. Por otro lado, la radioterapia se indica principalmente como tratamiento complementario al quirúrgico, como tratamiento inicial y en su modalidad de paliativo ⁶. En su caso, la quimioterapia se indica cuando no hay respuesta a otro tratamiento; por tal motivo, se debe realizar una búsqueda de receptores hormonales en el tumor mamario o en la metástasis para una buena elección en el tratamiento ⁶.

Por su parte, la inmunoterapia es un tratamiento novedoso a través del cual se hace uso de medicamentos para estimular al sistema inmunitario y que sea capaz de reconocer y destruir a las células cancerosas de la mama a través de proteínas en las células inmunitarias que necesitan ser activadas o desactivadas, el fármaco ayuda a restaurar esta respuesta inmunitaria contra las células cancerígenas ⁶, además de los fármacos se puede hacer uso de anticuerpos monoclonales que ayudan a inhibir factores de crecimiento en las células tumorales, siendo muy útil en el cáncer de mama triple negativo donde las células malignas no tienen

receptores de estrógeno o progesterona haciéndose más complicado su tratamiento.

Otra opción es el tratamiento hormonal, que se basa en la ministración de receptores hormonales en el tumor o en el sitio de metástasis, este tratamiento permite visualizar su posible respuesta tumoral en sus fases adyuvante y paliativa ⁶. Para que las pacientes sean seleccionadas como candidatas a este tratamiento deben presentar ausencia clínica de actividad tumoral, esto se refiere a que idealmente se realice al conocer un alto contenido de receptores estrogénicos en el tumor o el sitio de metástasis ⁶.

1.1 Cáncer de mama y Vitamina D

La vitamina D participa en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células normales de la glándula mamaria a través de la señalización de su receptor (VDR) ⁷. Por lo tanto, la alteración de esta señalización puede dar lugar a una proliferación aberrante típica de las células cancerosas. Esto está evidenciado por la investigación en ratones *knockout* para VDR, que mostraron diferenciación ductal aberrante y ramificación en la glándula mamaria ⁷. Estos y otros estudios sugieren propiedades antiproliferativas y diferenciadoras de la vitamina D y su uso como agente anticancerígeno.

Colston, Abe y colaboradores, fueron los primeros en demostrar las propiedades directamente anticancerígenas de la vitamina D *in vitro* ⁷. Luego, muchos estudios *in vivo* e *in vitro* mostraron la acción protectora de la vitamina D contra varios tipos de cáncer y varios genes importantes en la transformación del cáncer, estos fueron identificados como objetivos en la acción genómica de esta vitamina. En general, los efectos antineoplásicos de la vitamina D se destacan principalmente por su participación en la regulación de vías de señalización específicas que dirigen el crecimiento del cáncer.

En los casos de cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo (ER+) en

mujeres posmenopáusicas, el crecimiento del tumor se mantiene mediante la producción local de estrógeno, debido a la falta de síntesis ovárica de esta hormona. También, se ha observado que la vitamina D y sus análogos inhiben selectivamente la aromatasas, una enzima clave en la síntesis de estrógeno, y que regulan a la baja el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) en el tejido mamario, por lo que pueden considerarse en la prevención y el tratamiento de los casos posmenopáusicos de cáncer de mama positivo para $ER^{7,8}$. Sin embargo, tanto los cultivos de células de cáncer primario como las líneas de células de cáncer de mama suelen caracterizarse por una insensibilidad a la vitamina D⁸, esto se refiere a que las células tienen disminuido el receptor VDR y por tanto no se hace la señalización adecuada de la vitamina D, este efecto requiere de evidencia científica para poder dilucidarlo.

Por otro lado, Friedrich y colaboradores observaron la fuerte reactividad inmunoquímica de VDR en muestras de cáncer de mama de 228 pacientes, aunque no se encontró correlación entre la expresión de VDR y el estadio del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, la clasificación, el tipo de tumor, la expresión de receptores de estrógeno o receptores de progesterona (PR), los marcadores de proliferación Ki-67 y p53 o el índice de fase S. Con esto, los autores concluyeron que el VDR no puede considerarse como un fuerte factor pronóstico en el cáncer de mama⁹. Sin embargo, Al-Azhiri y colaboradores demostraron que la mayoría de 1,114 muestras de cáncer de mama mostraban una reactividad inmunoquímica fuerte o moderada de VDR, cuya expresión se correlacionó negativamente con el tamaño del tumor, el receptor hormonal, el estado triple negativo y Ki-67¹⁰.

En la última década, ha tenido mayor realce la investigación anticancerígena y antiinflamatoria de la vitamina D, debido a que hallazgos recientes han informado sobre un bajo nivel sanguíneo de vitamina D en pacientes con Linfoma de Hodgkin, gástrico y de mama¹¹, lo cual va en contra de otras evidencias científicas como es el caso de un estudio realizado en hombres que viven en latitudes del

norte, donde encontraron que existe un mayor riesgo de cáncer de próstata en estos hombres por los niveles altos de vitamina D encontrados en plasma, contrario a aquellos cuya ingestión de vitamina D es baja ¹².

Además en un ensayo aleatorizado del estudio VITAL ¹², que se llevó a cabo en 20,000 personas de 55 años o más y que recibieron 2,000 UI/día de vitamina D con seguimiento durante 10 años, proporcionó información sobre el papel de la suplementación con vitamina D y el posible riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares, pues encontraron asociaciones positivas entre los polimorfismos en los genes de la vía de la vitamina D y los niveles séricos de la misma, aunque una asociación entre dichos polimorfismos y el riesgo o pronóstico de cáncer sigue siendo difícil de alcanzar ¹². La importancia de este estudio radica en que la dosis fue suficiente para que los efectos de la suplementación se pudieran determinar con el análisis estadístico.

De modo que, los efectos anticancerígenos de la vitamina D pueden atribuirse generalmente a su potencial para modular la proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación, angiogénesis, invasión y metástasis celular ^{7, 13}. Como lo reportó LaPorta y Welsh quienes evidenciaron que la vitamina D regulaba negativamente los genes relacionados con la invasión y metástasis del cáncer de mama en células de un modelo de ratón de TNBC. Sin embargo, estos efectos no se observaron en ratones con inactivación de VDR, pero la reintroducción de VDR humano restauró la capacidad de la vitamina D para inhibir la proliferación de células similares a TNBC ⁷. Por lo tanto, concluyeron que el VDR es necesario para mediar los efectos de la vitamina D en las células TNBC ¹⁰.

En otro estudio realizado en células de cáncer cervicouterino CaSki ¹⁴, donde buscaron las acciones del colecalfiferol contra el cáncer cervicouterino metastásico y trataron los cultivos celulares con 10 a 100 ng/mL de colecalfiferol, identificaron disminuciones estadísticamente significativas en el recuento celular

y la viabilidad con tratamientos de la dosis alta (100 y 1,000 ng/mL). En cambio, en células HeLa tratadas con colecalciferol a 1,250 μ M en 48 horas, se identificó citotoxicidad celular, en comparación con células de cáncer de colon tratadas a dosis de 50 μ M, donde la proliferación celular se detuvo ¹¹. Debido a las controversias en los resultados de distintos tipos de cáncer con vitamina D, es importante la investigación sobre este tema.

Por lo tanto, los resultados de los estudios epidemiológicos sobre la vitamina D y el cáncer de mama no permiten sacar una conclusión definitiva sobre la posible correlación entre la aparición de cáncer de mama y la ingestión o falta de vitamina D. Es probable que dependa de varios factores, principalmente el estado de la menopausia. Además, un estudio de casos y controles debe estandarizarse para la exposición a la luz solar, ya que se espera que los “casos” estén menos expuestos debido a que las enfermedades los obligan a reducir su actividad física y la exposición al aire libre.

En general, los efectos de la vitamina D en el cáncer de mama dependen de su receptor, pero la señalización de VDR es muy heterogénea e incompleta, tanto en las glándulas mamarias normales como en los tumores de mama. Esto parece ser especialmente importante porque algunas células son sensibles a la vitamina D y otras pueden ser resistentes, dentro de un solo tumor. Además, la resistencia a la vitamina D puede ocurrir durante la progresión del cáncer debido a cambios epigenéticos en el gen VDR o a la expresión de otros genes, incluido *el CYP24A1* ⁸.

1.2 Cáncer de mama y glucocorticoides

La dexametasona es un fármaco que pertenece al grupo de los glucocorticoides, con funciones antiinflamatorias, antialérgicas e inmunosupresoras, que deriva del cortisol o hidrocortisona; hormonas producidas por la corteza adrenal y que son esenciales para la adaptación al estrés físico o emocional ¹⁵. La dexametasona, se

utiliza habitualmente en pacientes con tumores sólidos, como terapia adyuvante para controlar el tumor y los síntomas relacionados con el tratamiento. Sin embargo, algunos estudios han encontrado que el uso de esteroides en tumores sólidos se asocia con una reducción de la supervivencia general del tumor y progresión celular, efecto posiblemente debido a su actividad pro-apoptótica ¹⁶. ¹⁷. Desde hace más de 10 años, la dexametasona y otros glucocorticoides se usan como tratamiento adyuvante para leucemias, linfomas y otras neoplasias que involucran tejido de los ganglios linfáticos, dado su efecto en la inducción a apoptosis en leucocitos ¹⁷.

De igual manera, se ha observado que en algunos tipos de cáncer (incluyendo el cáncer de mama), la actividad aberrante del factor de transcripción NF-kB está altamente involucrado en el desarrollo y la proliferación del cáncer, principalmente por promover la activación de genes que inducen el ciclo celular ¹⁸, por otro lado, la dexametasona tiene un efecto inhibitor sobre la activación de este factor de transcripción, por lo que en estadios y dosis adecuadas este fármaco pudiera ser utilizado como tratamiento adyuvante para el cáncer de mama.

Contradictorio a esto, algunos otros estudios, proponen que los glucocorticoides incluyendo la dexametasona, promueven el desarrollo de células tumorales, el posible mecanismo de acción de esto es debido a que los niveles plasmáticos de cortisol aumentan por el glucocorticoide durante la progresión del tumor promoviendo la metástasis ^{18,19}. Además el tratamiento con dexametasona activa el GR, lo que pudiera provocar un aumento de la carga metastásica ¹⁹.

Acciones farmacológicas de los glucocorticoides

Entre los principales efectos de los glucocorticoides están los efectos anti-inflamatorios, antialérgico e inmunosupresor ²⁰, que se deben a la inhibición de la producción y secreción de citocinas proinflamatorias, como las interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, el factor de necrosis tumoral alfa

(TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), esto dado por la interferencia directa sobre las cascadas y mecanismos genómicos ²⁰. También, debido a la acumulación de macrófagos y neutrófilos en el foco inflamatorio, puede reprimir la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales, la síntesis y liberación de enzimas lisosomales en las reacciones de fase aguda, desgranulación y por respuesta de los mastocitos a la IgE, su expansión clonal y la citotoxicidad espontánea mediada por células T ^{15,20}.

Por lo anteriormente mencionado, es que se vuelve relevante investigar si la suplementación a diferentes concentraciones y tiempos de dexametasona tiene un efecto anti-proliferativo en las células de la línea celular de cáncer de mama T47-D y su posible efecto en la muerte celular.

1.3 Señalización de la vitamina D a través del receptor VDR

La 1,25 dihidroxivitamina D₃ es un metabolito biológicamente activo de la vitamina D y una hormona endocrina que se une a sus receptores por unión de esteroides de respuesta rápida asociados a la membrana transmembranal (MARRS) y de vitamina citosólica, el receptor VDR es parte de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción inducibles por ligandos ⁷. Este complejo vitamina D-VDR a menudo se asocia con el receptor alfa del retinoide X (RXRA), asistido por el coactivador del receptor de esteroides 1 (SRC-1) y juntos se unen a los elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE) en los promotores de los genes regulan para activar o reprimir su transcripción. Los objetivos posteriores del VDR son genes del metabolismo mineral, incluida la homeostasis del calcio y el fósforo entre otras vías metabólicas, incluidas las involucradas en la respuesta inmune y el cáncer ⁷.

Por su parte, el receptor VDR media las acciones biológicas pleiotrópicas de la

1, 25 dihidroxivitamina D₃⁸. Estas acciones incluyen el seguimiento de la homeostasis mineral, que está coordinada por el riñón, el intestino delgado, los huesos y la glándula paratiroidea, donde el VDR regula transcripcionalmente la expresión de los genes implicados en este proceso^{8,9}. De tal modo que, el VDR se expresa en varios tejidos, donde se incluyen no sólo los implicados en la homeostasis mineral, sino también la piel, así como las células beta pancreáticas, los tejidos reproductivos, la placenta y las células inmunitarias. Por lo tanto, la expresión del VDR está regulada a nivel transcripcional por varias hormonas, incluida la PTH, el ácido transretinoico (atRA) y por su ligando, 1, 25 (OH) D₃^{8,9}.

Debido a las funciones de los VDRs, es que se les ha considerado como mediador de los efectos de la vitamina D sobre la absorción intestinal del calcio y el mantenimiento del tejido óseo, lo cual los lleva a ser clave en el desarrollo, el metabolismo y la homeostasis del organismo²¹. Además, el VDR tiene un papel importante en el control de procesos y funciones del sistema inmune, así como de la división celular, existiendo en la actualidad la propuesta de un efecto protector antitumoral que va desde ejercer una acción antiproliferativa, antiangiogénica y antiinvasiva, en varios tipos de cáncer^{10,21}.

Estudios preclínicos han demostrado que la señalización a través del receptor VDR es biológicamente activa e importante en varios tipos de cáncer⁹. Los datos epidemiológicos han indicado que la señalización de la vitamina D puede ser importante en la causa y el pronóstico del cáncer de mama, así como también puede ser un punto clave para la prevención y el tratamiento de este cáncer^{8,9}.

En general, la activación del VDR en el cáncer de mama puede resultar en la inhibición del ciclo celular, la muerte celular y la inducción de la diferenciación en las células de cáncer de mama. De tal manera, que la muerte celular puede ser ejecutada por apoptosis o autofagia, aunque estudios recientes han demostrado que la autofagia puede ocurrir en las células luminales, pero no en las células

basales de cáncer de mama, debido a que algunos estudios evidencian que la suplementación con vitamina D aumentó la autofagia en las glándulas mamarias de ratón ⁷. Por tal motivo, cabe mencionar que se requieren más estudios sobre la suplementación con vitamina D para determinar si estas observaciones pueden traducirse en estrategias de prevención o tratamiento adyuvante para el cáncer de mama.

Señalización a través del VDR y cáncer de mama

El receptor VDR es un receptor de tipo nuclear pero que mayormente se localiza en el citoplasma, a su vez, dependiendo el tipo de cáncer de mama puede expresar o no otros receptores hormonales de tipo nuclear que promuevan la replicación de ADN y la división celular estos son, los receptores de estrógenos y progesterona. Algunas de las pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama suelen tener un tumor con receptores RE+ mientras que en mujeres premenopáusicas este receptor es menos expresado ⁶. Otro receptor que se puede presentar es el HER2 que en aproximadamente el 20% de las pacientes con cáncer de mama, suele estar sobreexpresado, y al cual se le correlaciona con un mal pronóstico en cualquier estadio tumoral ⁶.

Por otro lado, Yuan y colaboradores, han informado que la leptina induce a la desaparición y la migración de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama mediante la unión a su receptor ObR con el cual lleva a la activación de varias vías de señalización, como lo es la vía PI-3K/Akt, que está asociada con el crecimiento y la supervivencia celular; además de la vía JAK/STAT3, que participa en la transcripción del gen del factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) favoreciendo la angiogénesis; por su parte la vía MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que lleva a la eliminación celular mediante la inactivación del inhibidor del ciclo celular pRb, y finalmente la vía PI-3K/Rac, que está implicada en la migración celular y por consecuencia en la progresión del cáncer ^{6,22}.

En otro sentido, diversos experimentos *in vitro* evidencian que la acción de la leptina está mediada a través de diferentes vías de señalización; por un lado, actúa induciendo la vía de supervivencia P13K/Akt, activando la fosforilación de Akt, estimulando la expresión proteica de PKC-alfa, activando la vía MAPK y estimulando ERK1 y ERK2 ²³. Además, activa la vía STAT3 e induce la regulación positiva de c-myc a nivel de ARNm, así como a nivel de proteína. Así mismo, regula el aumento de la expresión de los genes del ciclo celular (ciclina D1) y reduce la expresión de p53 y la producción de Bax ²⁴. Esto permite sugerir que la leptina promueve la angiogénesis en el cáncer de mama a través de la señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de esta forma, se puede deducir que el efecto procarcinogénico de la leptina deriva de la activación de vías de señalización implicadas en el proceso de proliferación celular y una regulación a la baja de la respuesta apoptótica ²⁴.

Asimismo, se ha reportado la acción antiproliferativa de las células de cáncer de mama por parte de la adiponectina que está mediada por una inactivación de la expresión de las proteínas 1 y 3 en MAPK ERK1 y ERK2, por una estimulación de la actividad de AMPK y una disminución de la fosforilación de Akt, asociado a un aumento de la expresión de LKB1, reduciendo la actividad de mTOR que lleva a una disminución en la producción de oxígeno ^{23, 24}. Por tal motivo, los estudios sugieren que la adiponectina modula el ciclo celular de las células de cáncer de mama, disminuyendo la expresión de ciclina D1. Por otra parte, se ha detectado que la adiponectina induce a la apoptosis en líneas celulares suplementadas por un periodo superior a 48 horas. Finalmente, se sugiere que existe una interacción entre las vías de adiponectina y estrógeno, ya que es capaz de reducir la aromatasa y la expresión del receptor de estrógenos ²⁴.

1.4 ¿Cómo afectan los glucocorticoides a la señalización del VDR?

Los glucocorticoides suelen presentar dos mecanismos de acción ²⁰: uno genómico, caracterizado por una acción lenta, con una latencia del efecto por

horas o meses lo cual se debe a proteínas que modifican la transcripción genética de receptores nucleares; y la acción no genómica que va de un inicio y persistencias rápidas debido a las moléculas diferentes y poco caracterizadas ^{15,20}. Por tanto, los mecanismos genómicos están regulados por el GR y de mineralocorticoide (MR), cabe resaltar que estos tienen gran homología estructural, y diferente distribución tisular y afinidad por las sustancias farmacológicas ²⁰.

Los receptores GR Y MR se localizan en el citoplasma y se unen a secuencias sobre el ADN ubicadas a unos 300 a 3,000 pares de bases ²⁵. Tal unión induce genes como la anexina I, proteínas del complejo IκB, enzimas gluconeogénicas, factores de transcripción, chaperonas, moléculas de adaptación, enzimas de síntesis de surfactante, receptores, transportadores y canales iónicos, que pueden llevar a la apertura de la cromatina y a la síntesis de mRNA ²⁵. Estos receptores a su vez llevan a la represión de genes como el de proopiomelanocortina, prolactina, somatotrofina, osteocalcina, proteínas de ritmo circadiano y de control del ciclo celular, a través de la unión a elementos de respuesta negativa al glucocorticoide (nGRE), que llevan al empaquetado de la cromatina ²⁰, donde también indirectamente reprimen genes proinflamatorios, como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y metaloproteasas ^{15,20}. Por lo cual, es importante mencionar que según la concentración del fármaco será el grado de activación o represión de las enzimas antes mencionadas y por ende, el efecto al órgano blanco.

Efectos colaterales de los glucocorticoides

Los glucocorticoides tienen varios efectos adversos que dependerán del tiempo de uso y continuidad en la ministración del fármaco, tales efectos pueden ir desde una hiperglucemia, una disminución de la tolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia con insulino-resistencia, y en ciertos casos, puede desencadenar diabetes *mellitus* tipo 2 ²⁰. En tratamientos prolongados, puede producir obesidad,

debido a que promueve directamente el crecimiento adiposo troncal ^{15,20}; por lo tanto, pudiera ser desencadenante del síndrome metabólico.

Los glucocorticoides también pueden presentar un efecto similar a la aldosterona, donde tengan pérdida de K^+ y retengan Na^+ y agua ^{15, 20}. Este efecto aumenta la eliminación de H^+ , así, a dosis elevadas pueden desencadenar alcalosis hipokalémica. En tratamientos prolongados pueden aumentar el hematocrito y la hemoglobinemia y en casos graves, pueden producir trastornos por hiperviscosidad sanguínea ²⁰. También pueden presentar efectos sobre los leucocitos, los efectos pueden resultar desde una sola dosis, si está es elevada, como por ejemplo: la neutrofilia se produciría por un aumento en la liberación de citoquinas en la médula ósea y una disminución de la salida tisular de histamina por una menor expresión de moléculas de adhesión; la eosinopenia, por retención medular, y las linfopenias y monocitopenias, por redistribución y apoptosis ^{15,20}. El mecanismo de apoptosis que afecta a los linfocitos T, podría justificar su posible uso antineoplásico en tumores de origen linfático.

Otros efectos que se pudieran desencadenar por el uso de glucocorticoides son a nivel óseo, como hipocalcémiantes, debido a que disminuyen la absorción intestinal y la reabsorción renal de calcio, teniendo un efecto antagonista de los efectos del calcitriol ²⁰. A pesar de que pudieran todos tener el mismo efecto cada uno tiene diferente latencia, potencia y duración de acción, tal es el ejemplo en las modificaciones químicas en la halogenación que lleva a que los mineralocorticoides reduzcan su potencia y aumente la de los glucocorticoides, lo cual lleva a la afinidad por sus receptores ^{15,20}.

De acuerdo con el efecto terapéutico se clasifican como de acción ²⁰:

- Corta: cuando la duración es entre 6 - 12 horas, como la hidrocortisona.
- Intermedia: la duración es entre 12-36 horas, por ejemplo: prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona y deflazacort.

- Prolongada: la duración es entre 36-72 horas, como la dexametasona y betametasona.

Farmacocinética de los glucocorticoides

Los glucocorticoides suelen ser activos por cualquier vía de ministración ¹⁶. La farmacocinética depende de la vía y del éster empleado ^{16,20}. Por ejemplo, los tiempos a la concentración máxima por vía oral se alcanzan alrededor de los 90 minutos, por vía intramuscular o intravenosa, los

ésteres solubles como el fosfato se hidrolizan mediante esterases tisulares o plasmáticas, liberando al esteroide con un tiempo de 10 minutos ²⁰. En circulación, se unen a las proteínas plasmáticas en un 75-80% a la globulina fijadora de corticoesteroides (CBG), a la albúmina un 10-15% y a los eritrocitos un 5% ²⁰. Los glucocorticoides se pueden distribuir ampliamente y pasar la barrera hematoencefálica y la placenta, algunos pudieran ser excretados mayormente por metabolismo hepático, leche materna y menormente por excreción urinaria ^{15,20}, a excepción de la dexametasona que se excreta mayormente por orina.

Los fármacos glucocorticoides adyuvantes como la dexametasona se utilizan habitualmente durante el tratamiento del cáncer para mitigar los efectos indeseables de la quimioterapia, como las náuseas y la fatiga, y para estimular el apetito. Sin embargo, los estudios han revelado que los GC pueden promover la progresión del cáncer; no obstante, la literatura sigue siendo contradictoria y no está claro cómo los glucocorticoides promueven o inhiben la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer y por diferentes mecanismos ¹⁶.

Por otro lado, el GR media los efectos de las hormonas del estrés y de los derivados sintéticos de estas hormonas que se usan ampliamente en la clínica como agentes antiinflamatorios e inmunosupresores. Durante el cáncer de mama, las hormonas del estrés se aumentan, dando como resultado la activación del GR en sitios metastásicos distantes, una mayor colonización de células cancerígenas y

una supervivencia celular reducida¹⁷. Por lo tanto, los datos sobre el efecto de los glucocorticoides sobre el cáncer de mama no son del todo claros.

1.5 ¿Cómo afectan los glucocorticoides y la vitamina D a la muerte celular?

La muerte celular es necesaria para el ciclo vital de la célula, su regulación permite mantener la homeostasis del organismo multicelular²⁶. Esta muerte celular puede ser accidental o programada, iniciada y ejecutada; el inicio y la ejecución de la muerte celular pueden clasificarse en:

Apoptosis: como el proceso programado de muerte celular que da lugar a la eliminación de células innecesarias; para eliminar células dañadas irreversibles, además tiene un rol importante en la

prevención del cáncer debido a que, si por alguna razón se evita o limita a la apoptosis, puede dar lugar a una división celular descontrolada por consiguiente el crecimiento del tumor^{26,27}.

Necrosis: es la muerte celular accidental, local o focal, no apoptótica producida por alguna enfermedad donde se produce muerte celular como el cáncer. En este proceso se lleva a cabo la ruptura de la membrana citoplasmática y por consiguiente la salida del material intracelular lo cual desencadena un proceso inflamatorio²⁷.

Muerte celular autofágica (autofagia): por su parte la autofagia es el mecanismo de reparación celular para mantener la membrana celular y organelos, permite los procesos de desarrollo y diferenciación de tejidos a través de un proceso de supervivencia celular donde degrada moléculas o partes celulares dañadas para preservar el resto²⁸.

De modo que, los glucocorticoides pueden inducir a la muerte celular programada de eosinófilos y linfocitos T, mediante la fragmentación del ADN por

endonucleasas ²⁶. Estudios celulares y moleculares en líneas celulares linfoides han destacado que el receptor intracelular de glucocorticoides media el efecto de muerte celular como fue el caso del estudio realizado en roedores y la medición del efecto de los glucocorticoides sobre el timo; los resultados mostraron que el uso de glucocorticoides provocó la involución del timo, misma que fue asociada al esteroide sobre los linfocitos del timo ²⁹. La dexametasona, se utiliza habitualmente en pacientes con tumores sólidos, como terapia adyuvante para controlar el tumor y los síntomas relacionados con el tratamiento. Sin embargo, algunos estudios han encontrado que el uso de esteroides en tumores sólidos se asocia con una reducción de la supervivencia general del tumor y progresión celular, efecto posiblemente debido a su actividad pro-apoptótica ^{30,31}.

Desde hace más de 10 años, la dexametasona y otros glucocorticoides se usan como tratamiento adyuvante para leucemias, linfomas y otras neoplasias que involucran tejido de los ganglios linfáticos, dada su capacidad para inducir apoptosis en leucocitos ³². De igual manera se ha observado que en algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, la dexametasona presenta un efecto inhibitorio la activación de la proliferación celular, por lo cual según el estadio del cáncer y a dosis adecuadas este fármaco pudiera utilizarse como opción de tratamiento adyuvante.

Algunos otros estudios, han propuesto que los glucocorticoides incluyendo la dexametasona, promueven el desarrollo de células tumorales, el posible mecanismo de acción de esto es debido a que los niveles plasmáticos de cortisol aumentan por el glucocorticoide durante la progresión del tumor promoviendo la metástasis ¹⁵.

En su caso la vitamina D, en diferentes tipos de cáncer ha tenido efectos proapoptóticos según la dosis empleada, en algunos casos la vitamina D ha regulado el ciclo celular teniendo un arresto celular de la fase G1 a la fase S del ciclo celular ²⁵, a través del efecto sobre ciclina D1, y los inhibidores de ciclinas

p21, p27²⁵. Los efectos anti proliferativos se asocian a la expresión de su receptor VDR, aunque no siempre, puesto que los antecedentes también refieren que la expresión del VDR disminuye gradualmente con el avance de la enfermedad tumoral y esto a su vez se asocia a la existencia de polimorfismos del VDR y su riesgo de cáncer²⁵.

Por tanto, los efectos de la vitamina D dependen de la expresión y activación de su receptor, pero la señalización de VDR es muy heterogénea entre las glándulas mamarias normales y las células tumorales; como la resistencia celular a la vitamina D, los cambios epigenéticos en el gen VDR, expresión de otros genes como el *CYP24A1*⁹.

Por lo anteriormente mencionado, es que se vuelve relevante investigar si la suplementación a diferentes concentraciones y tiempos de vitamina D y dexametasona (solas y combinadas) tiene un efecto anti-proliferativo en las células de la línea celular de cáncer de mama T47D y su efecto en la muerte celular.

2. Planteamiento del problema

El cáncer de mama se origina en las células del revestimiento epitelial, con mayor frecuencia en los conductos del tejido glandular de las mamas. Al inicio, el tumor canceroso está *in situ*, donde suele no presentar síntomas y en este lugar tiene un mínimo potencial de diseminación. A medida que pasa el tiempo, este cáncer *in situ* puede progresar e invadir el tejido mamario circundante, y a continuación, propagarse a los ganglios linfáticos cercanos u a otros órganos del organismo ¹.

El tratamiento del cáncer de mama puede ser muy eficaz, siempre y cuando la enfermedad se detecta en etapas tempranas. Por lo regular, el tratamiento consiste en una combinación de extirpación quirúrgica, radioterapia, terapia hormonal, quimioterapia e inmunoterapia. Por consiguiente, la combinación de tratamientos puede ser efectiva para la disminución en la tasa de progresión de la enfermedad.

Cabe resaltar que debido a la heterogeneidad del cáncer de mama los tratamientos no logran ser efectivos, es por ello, que surge la inquietud de indagar sobre los mecanismos moleculares que indiquen el desarrollo del cáncer de mama para poder proponer nuevos tratamientos o tratamientos adyuvantes, esto además sustentado con datos estadísticos que evidencian los casos de diagnóstico del cáncer de mama en mujeres a nivel mundial con cifras de 2.3 millones de casos y con un registro de 670,000 defunciones en el año 2022, lo cual lo lleva a ser un problema de salud pública. que, en conjunto con un diagnóstico poco oportuno, las mujeres no logran tener un tratamiento adecuado llevándolas a complicaciones y a la muerte.

En algunas pacientes se ha incluido al tratamiento la suplementación de vitamina D, que mediante la activación del receptor VDR ha demostrado detener la proliferación de las células del cáncer de mama ¹⁶. Aunado a ello, el uso de dexametasona como analgésico y adyuvante que promueve la disminución de los síntomas colaterales de las quimioterapias, como náusea y vómito, además de que se usa como tratamiento para cánceres no sólidos como son las leucemias. Pero

el mecanismo por el cual estos fármacos ejercen su posible acción antitumoral no es aún del todo claro.

Algunos resultados reportados indican que la dexametasona pudiera estar aumentando la expresión del VDR, y que a través de este se detiene la proliferación celular, induciendo la apoptosis, mientras que en otros estudios se reporta que el uso de la dexametasona por un largo tiempo aumenta la metástasis del cáncer de mama. Dichos reportes necesitan de más estudios para esclarecer el mecanismo de acción que ambos fármacos pudieran estar activando para inhibir o aumentar la proliferación y muerte celular en el cáncer de mama.

Es por ello, que en la presente investigación se pretendió evaluar los cambios en la expresión del receptor VDR en la línea celular T47-D suplementada con vitamina D, dexametasona y la combinación de ambos, planteándose la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los cambios en la expresión del receptor VDR en células de cáncer de mama estimuladas con dexametasona y vitamina D y su efecto en el ciclo celular, en la viabilidad y muerte celular?

3. Justificación

El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad en las mujeres. La mayoría de los casos presentes y de la mortalidad por cáncer de mama se registran en países de ingresos medianos y bajos, debido a la falta de recurso para la atención a esta enfermedad ¹.

Entre los años de 1930 y 1970, la mortalidad por cáncer de mama no tuvo grandes cambios, las mejoras en la supervivencia se notaron en los años 1980 principalmente en países que contaban con programas de detección precoz y que combinaban con diferentes tipos de terapias para contener la enfermedad invasiva^{1, 2}. Durante los años de 1980 y 2020, en los países de altos ingresos se redujo la mortalidad en un 40%, dentro de los países que han tenido éxito en la reducción de la mortalidad por cáncer de mama han logrado reducirla anualmente de 2% al 4%. Si se consiguiera reducir la mortalidad mundial de cáncer de mama, tendría que conseguirse un 2.5% anual, entre el 2020 y 2040 de este modo se evitarían 2.5 millones de muertes por cáncer de mama en el mundo ².

Mientras tanto, durante el 2022 ², en todo el mundo se diagnosticó cáncer de mama a 2.3 millones de mujeres, y se presentaron 685,000 fallecimientos. A finales del mismo año, 7.8 millones de mujeres a las que se les había diagnosticado cáncer de mama en los anteriores cinco años continuaban con vida, lo que hace que este cáncer sea el de mayor prevalencia en el mundo. Además, el cáncer de mama ataca a mujeres de cualquier edad después de la pubertad y las tasas aumentan en su vida adulta aproximadamente a partir de los 40 años.

En México, la tasa de defunciones por esta causa aumentó durante la última década, pasando de 6.18 defunciones por cada 10,000 personas en 2010 a 7.17 personas en 2022. Los estados que presentaron las tasas más altas de defunciones por tumores malignos fueron: Ciudad de México, seguido de Sonora, Chihuahua, Morelos, Veracruz y Colima, teniendo tasas de 9.7 a 7.8 defunciones por cada 10,000 habitantes. En cambio, los estados con las tasas más bajas fueron: Quintana Roo, seguido de Guerrero, Querétaro, Yucatán, Durango, Guanajuato,

Tlaxcala, Tabasco, México, Puebla y Aguascalientes, con tasas de hasta 4.5 a 6.4 defunciones por cada 10,000 habitantes ².

La presencia del cáncer de mama incrementa con la edad, debido a los factores de riesgo que se van acumulando al pasar de los años y que además se combinan con la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular ¹. Aún si existe tratamiento funcional, siempre será mejor prevenir y buscar el uso de suplementos o fármacos que puedan prevenir el uso de tratamientos costosos y el daño psicoemocional de las pacientes.

En la actualidad la OMS se planteó un objetivo de iniciativa mundial contra el cáncer de mama ¹ donde pretende reducir en un 2.5% anual la mortalidad mundial de cáncer de mama, con lo cual se espera que entre 2020 y 2040 se eviten 2.5 millones de muertes a nivel mundial. Pretendiéndose que para el 2030 se logró este objetivo y se evite el 25% de las muertes por cáncer de mama entre las mujeres menores de 70 años, mientras que para 2040 esa cifra sería del 40%. Este objetivo se pretende alcanzar a través de tres pilares: la promoción de la salud para una detección precoz; el diagnóstico oportuno; y la gestión integral del cáncer de mama ¹.

Por lo tanto, el cáncer de mama toma importancia por la incidencia, prevalencia y mortalidad en el mundo, ya que una de cada 12 mujeres enfermará de cáncer de mama a lo largo de su vida. Más aún si el diagnóstico no se hace oportunamente, por ello, es importante atender la promoción y prevención en salud en todas las poblaciones, que lleven a una educación adecuada sobre la exploración mamaria y a la realización de la mastografía, así como a una alimentación saludable. De modo que, es de interés determinar si la suplementación con vitamina D, dexametasona y la combinación de estas presenta propiedades similares a las antes mencionadas dependientes de la expresión del VDR y que estos compuestos puedan utilizarse como adyuvantes en el tratamiento combinado del cáncer de mama.

4. Hipótesis

H₁: La suplementación con vitamina D y dexametasona aumenta la expresión del receptor VDR detiene el ciclo celular, disminuye la viabilidad celular y aumenta la muerte celular.

H₀: La suplementación con vitamina D y dexametasona disminuye la expresión del receptor VDR, no se detiene el ciclo celular, aumenta la viabilidad celular y disminuye la muerte celular.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar los cambios en la expresión del receptor VDR de la línea celular de cáncer de mama T47-D suplementada con vitamina D y dexametasona, y su efecto en el ciclo celular, viabilidad y muerte celular.

5.2 Objetivos específicos

En la línea celular de cáncer de mama T47-D antes y después de la suplementación con vitamina D, dexametasona y la combinación:

- Determinar la expresión del receptor de VDR, por medio de la citometría de flujo.
- Determinar la viabilidad celular, por medio de espectrofotometría con el ensayo de cristal violeta.
- Identificar los cambios en el ciclo celular, mediante la detección de la incorporación de yoduro de propidio por medio de la técnica de citometría de flujo.
- Analizar la muerte celular por apoptosis, mediante el método de anexina V, por medio de la técnica de citometría de flujo.
- Determinar la expresión de la proteína caspasa 3 activa efectora intrínsecamente de la apoptosis, por medio de la técnica de western blot.
- Identificar si existe correlación entre los cambios en la expresión del receptor del grupo suplementado con vitamina D, el grupo suplementado con la dexametasona y el grupo suplementado con la combinación en relación con la viabilidad y muerte celular, a través del coeficiente de correlación.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño del estudio

El tipo de estudio es experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

6.2 Universo y muestra

Universo: células de cáncer de mama de la línea celular T47-D.

Tamaño de la muestra: cultivos de 5×10^6 células por muestra, por triplicado, con base a cada condición experimental.

- Grupo control: células sin tratamiento.
- Grupo 1: células suplementadas con vitamina D a 10 μM , 40 μM , 100 μM por 24, 48 y 72 horas.
- Grupo 2: células suplementadas con dexametasona 5 μM , 10 μM , 40 μM por 24, 48 y 72 horas.
- Grupo 3: combinación vitamina D 100 μM y dexametasona 40 μM a 24, 48 y 72 horas.

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión: Cultivos con un porcentaje de viabilidad igual o mayor al 80% y libres de contaminantes.

Criterios de exclusión: Cultivos de células contaminadas. Cultivos de células con un porcentaje de viabilidad $<80\%$.

Criterios de eliminación: muestras que durante el experimento no fueron viables

por alguna razón. Células contaminadas durante el experimento.

6.4 Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Condiciones de cultivo celular T47-D	Proceso mediante el que se cultivan células individuales en condiciones controladas fuera de un organismo vivo.	Siembra y cultivo de la línea celular en cajas de Petri, 5 X10 ⁶ células por muestra, por triplicado, en Medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM), adicionado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, L-glutamina y antibióticos, durante 24, 48 y 72 hrs a, 37°C, 5% CO ₂ , <i>in vitro</i> .	Cuantitativa discreta Independiente	Número de células	
Suplementación con vitamina D, dexametasona y la	Adición de calciferol, dexametasona a los cultivos celulares	Con vitamina D a 10 µM, 40 µM, 100 µM por 24, 48 y 72 horas. Con dexametasona 5 µM, 10 µM, 40 µM por 24, 48 y 72 horas.	Cuantitativa discreta Independiente	10 µM, 40 µM, 100 µM, 5 µM, 10 µM,	

combinación	Combinación de ambas: las concentraciones y	40 μ M
-------------	---	------------

		tiempos de suplementación se determinarán una vez que se tengan los resultados de grupo 1 y 2 para determinar las condiciones óptimas de suplementación combinada.			
Expresión Receptor VDR	Expresión de proteína VDR, en las células en cultivo T47-D.	Detección de la expresión de proteínas implicada en las funciones de expresión de VDR en las células cultivadas, determinada por medio de densitometría de las bandas de proteína obtenidas por western blot.	Cuantitativa Dependiente	IMF, porcentaje de células positivas	ANOVA de dos vías factor Post hoc Bonferroni para comparar medias
	Proceso mediante	Análisis del ciclo	Cuantitativa	Cantidad de	ANOVA

Ciclo celular	el cual el material genético de la célula se duplica y distribuye en	celular a través del método con yoduro de propidio: Fases G0/G1 (células que no	a continua Dependent e	ADN por intensidad media de fluorescencia	de dos factores, error estándar
---------------	--	---	---------------------------------	---	---------------------------------

	formas iguales en células nuevas.	entran en el ciclo celular), Síntesis, G2/Mitosis (células que entren en ciclo celular), en citometría de flujo			
Apoptosis	Muerte celular programada.	Análisis por western blot determinada por medio de densitometría de las bandas de proteína Caspasa 3	Cuantitativa continua Dependent e	Peso molecular 37 kDa	ANOVA de dos vías factor Post hoc Bonferroni para comparar medias
Viabilidad celular	Cantidad de células sanas en una población, sirve como control de calidad.	Análisis por la técnica de cristal violeta de la viabilidad celular determinada por medio de la densidad óptica a través del espectrofotómetro	Cuantitativa Continua dependent e	Porcentaje de la densidad óptica 570 nm	ANOVA de dos vías factor Post hoc Bonferroni para comparar medias

6.5 Procedimiento

El proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina, bajo la dirección de la Dra. Irazú Contreras García, en el periodo de agosto 2021- julio 2024.

Cultivo celular y suplementación

La línea T47-D se compone de células epiteliales aisladas de un derrame pleural obtenido de una paciente femenina de 54 años diagnosticada con carcinoma ductal infiltrante de mama¹⁸. El cultivo celular de la línea T47-D (ATCC N°HTB-133), se realizó en cajas de Petri para células adherentes a condiciones estériles. Las células se descongelaron, y se sembraron en cajas de cultivo a una densidad de 10,000 células/cm², posteriormente se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (12491015, Thermo Fisher) suplementado al 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, F2442) y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, P4458). Se llevaron a incubación de 37°C en un ambiente húmedo y con un 5% de CO₂. El medio se cambió dos veces por semana, y cuando las células llegaron a un 80-90% de confluencia, se lavaron con PBS, se les añadió tripsina 0.25% EDTA 0.2% (Sigma-Aldrich, T4174) para levantar la suspensión celular, y posteriormente sembradas con el medio ya mencionado en placas de cultivo celular y sembradas a la densidad adecuada para cada ensayo, donde fueron tratadas con vitamina D (C9756-1G, sigma-aldrich), a concentraciones de 10 µM, 40 µM y 100 µM, disuelta en etanol puro 10 mL, así como dexametasona (solución inyectable 8mg/2 mL, Pisa) a concentraciones de 5 µM, 10 µM, 40 µM, disuelto en PBS al 1% 1 mL, durante 24, 48 y 72 horas.

Todos los procesos relacionados con el cultivo celular y tratamientos farmacológicos se llevaron a cabo dentro de la cabina de bioseguridad LABCONCO®.

Tinción intracelular para el receptor VDR por citometría de flujo

La capacidad de teñir y detectar moléculas intracelulares permite la identificación de subgrupos de células distintos, así como una mayor caracterización de las poblaciones celulares ³³.

Material

Formaldehído 1 % (1 mL formaldehído en 10 mL de PBS 1X)

Saponina 0.1 % (10 mg saponina en polvo, disuelta en 10 mL de PBS 1X)

Tripsina/EDTA (tripsina 0.25% EDTA 0.2%)

Anticuerpo primario (anti-vitamin D receptor antibody (ab3508), abcam) dilución 1 en 100 de BSA 1% Anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 488, Biolegend) dilución 1:100 en BSA 1%.

BSA 1 % (diluido en TBS 1X-tween) PBS 1X

Método

Se cultivaron 1×10^6 de células T-47D, en placas de 6 pozos con los estímulos a las concentraciones y tiempos descritos antes, posteriormente se despegaron de la placa con 300 μ L de Tripsina/EDTA (tripsina 0.25% EDTA 0.2%), se mantuvieron en frío 4°C, se colocaron en tubos para citometría con 500 μ l de PBS 1X para posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos. De esta manera se realizaron dos lavados más. Luego, se agregaron 100 μ L de formaldehído 1% a cada muestra y se conservaron durante 30 minutos en frío 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados con 500 μ L de PBS 1X para centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos.

Enseguida, se agregaron 100 μ L de saponina al 0.1% a cada muestra y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo

se realizaron tres lavados con 500 μ L de PBS 1X y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos. Después se colocó el anticuerpo primario (Anti-Vitamin D Receptor antibody (ab3508), abcam) dilución 1:100 de BSA 1% a cada muestra y se incubaron por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados con 500 μ L de PBS 1X y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos. Una vez terminados los lavados se agregó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 488, Biolegend) dilución 1:100 en BSA 1%, se incubó por otros 30 minutos en frío 4 °C.

Trascurrido el tiempo se realizaron tres lavados con 500 μ L de PBS 1X y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendió la muestra con 300 μ L de PBS 1X y se procedió a dar lectura en el citómetro de flujo (Accuri C6 BD Biosciences) a través del software versión 1.0.264.21. tomando 10,000 eventos celulares³⁷, posteriormente fueron analizados.

Viabilidad celular

Se realizó con el método de cristal violeta, para detectar la adherencia celular mantenida en el cristal violeta que se une a proteínas y ADN. Mientras tanto, las células que mueren pierden su adherencia, reduciendo la cantidad de tinción absorbida en la placa donde se cultivan. Este método de detección es rápido y confiable para evaluar la viabilidad celular, supervivencia e inhibición del crecimiento celular²⁶.

Materiales:

Línea celular de cáncer de mama T47-D

Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (12491015, Thermo Fisher) suplementado al 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, F2442) y 1% de penicilina- estreptomycin (Sigma-Aldrich, P4458).

Solución de tinción cristal violeta 0.5% (se disuelven 0.5 g de polvo de cristal

violeta sigma- aldrich, en 80 mL de agua destilada y 20 mL de metanol).

Metanol absoluto

Procedimiento:

Las células fueron cultivadas (por triplicado) a 2×10^4 en una placa de 96 pozos. A tres pozos se les agregó solo medio sin células. El volumen del cultivo fue de 200 μL /pozo. Se incubaron las células durante 24, 48, 72 horas a 37°C con los tratamientos indicados anteriormente. A los pozos que fueron tratados con fármacos, se les retiró el medio y se les colocó nuevo medio complementado con la concentración del fármaco a utilizar. Se realizó por triplicado para cada condición. A continuación, se incubaron durante el tiempo deseado.

Se retiró el medio y se lavaron las células dos veces con agua destilada, o bien del grifo. Enseguida se inclinó la placa para evitar que el chorro de agua cayera directamente. Después de que los pozos se llenaron de agua se retiró inmediatamente y se colocó hacia abajo sobre un papel filtro. Se añadieron 50 μL de solución de tinción de cristal violeta al 0.5 % a cada pocillo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente sobre un balancín a una frecuencia de 20 oscilaciones por minuto.

Posteriormente se lavó la placa como en el paso tres, para retirar el resto de la solución de cristal violeta, y se dejó invertida sobre un papel filtro para que seque (se puede dejar hasta 24 horas).

Posterior a ello, se agregaron 200 μL de metanol a cada pocillo, se incubó la placa con la tapa puesta a temperatura ambiente durante 20 minutos sobre un balancín a 20 oscilaciones por minuto. Se midió la densidad óptica en el lector de placas a 570 nm en un espectrofotómetro (Stat fax[®] 4200 Awareness Technology). Se restó la densidad óptica media de cada pocillo que contiene solo medio, a cada pocillo de la placa. Se estableció la densidad óptica promedio de las células no

estimuladas al 100 %. Luego se determinó el porcentaje de células estimuladas que fueron viables (adheridas) comparando los valores promedio de la densidad óptica de células estimuladas contra las células no estimuladas. Por último, se procedió a calcular la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado cada uno el análisis estadístico se realizó en el programa Grand Prisma versión 8.0.

Análisis de ciclo celular

El ioduro de propidio (PI) se une al ácido nucleico de la célula, siendo la intensidad de fluorescencia emitida por este directamente proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos (ADN). Por lo tanto, esta cantidad de fluorescencia será diferente en cada fase del ciclo celular. En la fase G2 y en la mitosis la célula presentará el doble de material genético, a diferencia a la fase G0-G1, siendo la cantidad de ADN intermedia en la fase de síntesis. este método permite identificar en qué fase del ciclo se encuentran las células, antes y después del estímulo con los fármacos ²⁶.

Materiales:

Etanol al 70% a -20°C RNAsa 10 mg/mL en PBS

Yoduro de propidio 0.05% disuelto en agua destilada PBS 1X

Método

Se recolectaron 1×10^6 de células aproximadamente en 1 mL de medio de cultivo, para después centrifugar a 3,200 rpm durante 5 minutos. Una vez centrifugado se resuspendieron en 500 μ L de etanol al 70 % a -20°C, pipeteando suavemente. En este punto se pueden conservar las células a -20°C durante tiempo indefinido.

Enseguida, las muestras que se conservaron en etanol se llevaron a agitación durante 2 minutos, después se centrifugaron a 3,200 rpm/5 minutos. Se lavaron 2

veces con 500 μ L PBS 1X, se centrifugaron a 3,200 rpm/5 minutos, posteriormente se les retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 250 μ L de PBS 1X. Finalmente se añadió 0.1 mg/mL de RNasa (tipo A) (Roche,10109142001) a una concentración final de 100 μ g/mL y PI a 0.003%. Se llevaron a incubación durante 30 minutos a 37 °C, se agitaron de vez en cuando, y enseguida se leyeron en el citómetro de flujo

Muerte celular por Anexina V FITC

La anexina V tiene una fuerte afinidad Ca^{2+} dependiente por los residuos de fosfatidilserina (PS) lo que le permite ser utilizada como una prueba para la detección de la apoptosis, que al conjugar se la anexina V con un fluorocromo puede identificar las células apoptóticas una vez que esta se ha unido a los residuos de PS expuestos en su superficie celular. Además, puede utilizarse combinada con otros fluorocromos para diferenciar entre poblaciones apoptóticas y no apoptóticas (necrosis). Este kit utiliza la anexina V conjugada con colorante de viabilidad para etiquetar la PS, un marcador temprano de la apoptosis en la membrana extracelular. En la apoptosis en fase tardía, a medida que se pierde la integridad celular, tanto la anexina V como el colorante de viabilidad atraviesan y se unen la PS en el interior de la membrana plasmática.

Material

Agua destilada

PBS 1X

Buffer de adhesión 4 X (dilución 1:4) Ioduro de propidio (20 μ g/ mL)

Rh Annexin V-FITC (5 μ L)

Citómetro de flujo Centrifuga

Método

Se cultivaron 2×10^5 de células T-47D, en placas de 6 pozos con los estímulos a

las concentraciones y tiempos descritos antes, posteriormente se despegaron de la placa con 300 μ L de tripsina/EDTA (tripsina 0.25% EDTA 0.2%), se mantuvieron en frío 4°C, se colocaron en tubos para citometría con 200 μ L de PBS 1X para centrifugarse a 3,000 rpm durante 5 minutos. De esta manera se realizan dos lavados más. Luego, se agregaron 200 μ L de buffer 4X y 5 μ L de Annexin V FITC (eBioscience, 88-8008-74) se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posterior a ello, se realizaron tres lavados con PBS 1X como anteriormente se describió.

Enseguida se tiñeron con ioduro de propidio del mismo kit colocando 200 μ L de buffer 4X y se agregaron 10 μ L de IP, a continuación, se llevaron al análisis por citometría de flujo.

Análisis de expresión de proteínas por el método de western blot

El western blot es una técnica analítica de laboratorio utilizada para detectar proteínas específicas en muestras de sangre, tejidos, células, entre otras. El método utiliza electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra, estas se transfieren del gel a la superficie de la membrana ²⁷.

Materiales

Buffer de lisis

Tripsina-EDTA (tripsina 0.25% EDTA 0.2%)

Solución Bradford (Sigma-Aldrich, B6916)

Estándares de BSA

Procedimiento

Se sembraron 10×10^6 células y se trataron con los fármacos, según lo descrito en la sección pasada. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento celular, se realizó la extracción total de proteínas a partir de los cultivos celulares.

La extracción de proteínas totales se llevó a cabo utilizando 60 μ L de buffer de lisis (0.5 M de Tris- HCL, pH 6.8, 50 mM de EGTA pH 7.9, 0.2 M de EDTA pH 8.0, 0.1 % de mecaptoetanol y 1% de IGEPAL, y inhibidores de proteasas; 5mg/mL leucepeptina, 10mg/mL aproptinina, 10mg/mL PMSF, 100mM Na₃VO₄ y 500 mM NaF, todos los reactivos de la marca Sigma-Aldrich). Se utilizó tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, T3924) para despegar las células adheridas a la placa de cultivo y posteriormente se recuperaron. Las muestras se incubaron en hielo durante 45 min, agitando en vórtex cada 15 min. Una vez finalizados los 45 min, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 25 min, a 4 °C. Al final, se recuperó el sobrenadante.

Se empleó el método de Bradford (Sigma-Aldrich, B9616) para la cuantificación de las proteínas. Para la curva estándar, se utilizó albumina bovina (BSA Sigma-Aldrich, A9085) (2 mg/mL) en concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL. En una placa de 96 pozos, se agregaron 5 μ L de los estándares de albumina por duplicado, dejando los dos primeros pozos como blanco. Se agregó 1 μ L de muestra por duplicado y se utilizó el buffer de lisis como blanco. Finalmente, se agregaron 200 μ L de mezcla Bradford. La absorbancia fue leída a 590 nm en un espectrofotómetro. Una vez que se obtuvieron los resultados de concentración de proteína de cada muestra, se ajustaron a una concentración de proteínas de 4 μ g/ μ L. Se agregó buffer de carga para completar un volumen de 100 μ L. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95 °C y se congelaron hasta su uso.

Western blot

Se realizaron ensayos de western blot para determinar la expresión de la proteína caspasa 3 activa implicada en la apoptosis celular. El western blot es una técnica utilizada para detectar una proteína específica en una muestra de lisado celular.

Materiales

Acrilamida, bis acrilamida 30%/2.67%

Buffer de corrida

Cámara de electroforesis semiseca

Membrana de PVDF

Metanol absoluto

Buffer de transferencia

Cámara de transferencia

TBS 20X

Diaminobencidina

PBS 1X

Peróxido de hidrogeno

Procedimiento

El primer paso del proceso implica la separación de 60 µg de lisado de proteínas totales en gel de poliacrilamida al 15% por electroforesis en buffer de corrida (tris (3g/L), glicina (14.4 g/L) y 10% de SDS), a un voltaje constante de 100 V. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF, GE10600057), usando la transferencia semiseca a 25 V durante 35 minutos usando buffer de transferencia (tris 3g/L, glicina 14.4 g/L y metanol al 20% todos de Sigma-Aldrich). Una vez completada la transferencia, se enjuagó la membrana con buffer de lavado adicionado con Tween-20 (Sigma-Aldrich, P9416) (TBS-Tween) al 0.1%. Las membranas fueron bloqueadas con BSA 5%, disuelta en TBS-Tween (5/100 mL de TBS-T), por una hora, en agitación suave.

Posteriormente, la membrana fue incubada con un anticuerpo primario específico contra la proteína de interés caspasa 3 activa (Sigma-aldrich., MFCD01321906), en diluciones 1:1000, 1 h a temperatura ambiente o 4°C, en agitación suave toda la noche. Se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 minutos, con TBS-Tween.

Finalmente, las uniones de anticuerpo-proteína fueron detectadas mediante el anticuerpo secundario, anti-mouse IgG (31460, Thermo Scientific). Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos con TBS-Tween-20. La membrana se reveló mediante la solución de revelado (150 μ L de 3,3-Diaminobencidina (DAB) (Santa Cruz Biot, sc-267777) al 0.5% en PBS 1X y 30 μ L de H₂O₂).

6.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante pruebas de normalidad de los datos por Levene, ANOVA de dos factores para variables dependientes y pareadas con Post hoc de Bonferroni para diferencias entre variables, considerando el valor de $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el programa Graphpad Prism versión 8.0.

6.7 Aspectos éticos

De acuerdo con los protocolos para el manejo con la línea celular de cáncer de mama T47-D, bajo el nivel de bioseguridad de la ATCC (*American Type Culture Collection*), así como la aprobación por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México con número de registro 010.2023 en su archivo.

7.0 Resultados

7.1 Artículo aceptado



25-10-2024

Estudios y Perspectivas Revista Científica y Académica

ISSN 3005-2599 (en línea)

Centro de Investigación y Desarrollo E-Couture

Editorial

Ciudad de Pilar-Paraguay

Código postal 2800

CERTIFICADO DE APROBACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Por el presente se certifica que el artículo titulado:

“Vitamina D en el tratamiento de cáncer de mama”

De los autores:

Guadalupe Ortiz-Cabrera

Irazú Contreras

José A. Estrada

Ha sido arbitrado por pares académicos mediante el sistema doble ciego y aprobado para su publicación. El artículo será publicado en la edición julio – agosto - septiembre, 2024, Volumen 4, Número 3. Verificable en nuestra plataforma: <https://estudiosyperspectivas.org//>



Abg. Samuel Hansen
Editor en Jefe

Para consultas puede contactar directamente al editor de la revista
editor@estudiosyperspectivas.org
o al correo: postulaciones@estudiosyperspectivas.org



7.1.1 Título del artículo aceptado

Vitamina D en el Tratamiento de cáncer de mama

7.1.2 Página frontal del manuscrito

Vitamina D en el tratamiento de cáncer de mama

Vitamin D in the treatment of breast cancer

Maestra en Ciencias de la Salud, Guadalupe Ortiz-Cabrera¹ Irazú Contreras,
Doctor of Philosophy in Microbiology and Immunology^{2*} José A, Estrada,
Doctor of Philosophy in Microbiology and Immunology³ *

*Correspondencia: Irazú Contreras Ph.D; José A. Estrada, Ph.D. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Av. Paseo Tollocán esq. Jesús Carranza s/n Col. Moderna de la Cruz. CP 50180 Toluca, México. Tel. +52(722)217-3552 ext. 218. icontrerasg@uaemex.mx; jaestrada@uaemex.mx

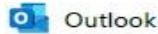
7.1.3 Resumen

El cáncer de mama es una enfermedad donde existe crecimiento descontrolado de las células de la glándula mamaria. Afecta principalmente a mujeres, el diagnóstico inicia con la autoexploración mamaria mensual, seguido de la mastografía y ultrasonido para su confirmación. Cuando el diagnóstico es oportuno, el tratamiento puede ser efectivo. Los micronutrientes, como vitaminas y minerales, se emplean como adyuvantes a su tratamiento. Entre ellos, la vitamina D es relevante, ya que participa en la regulación del sistema inmunológico, el crecimiento y señalización celular, mineralización de huesos y dientes, principalmente. Investigaciones recientes muestran su posible efecto

anticancerígeno. El presente trabajo tiene como objetivo proporcionar información acerca del rol de la vitamina D como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

Palabras clave: micronutrientes; vitamina D; cáncer de mama.

7.1.4 Acuse de recibido del segundo artículo



GACETA SANITARIA: confirmación de envío / Submission confirmation

From em.gaceta.0.8f81fe.8bc12429@editorialmanager.com <em.gaceta.0.8f81fe.8bc12429@editorialmanager.com>
on behalf of
Gaceta Sanitaria <em@editorialmanager.com>
Date Mon 11/18/2024 1:16 PM
To Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>

Estimado/a Dr. Contreras:

Le confirmamos la recepción del artículo titulado: "Changes in vitamin D receptor expression, cell cycle, and viability in breast cancer cells supplemented with vitamin D and dexamethasone", que nos ha enviado para su posible publicación en Gaceta Sanitaria.

En breve recibirá un mensaje con el número de referencia asignado y se iniciará el proceso de revisión del artículo. En caso de que sea necesario que haga algún cambio previo, también se le notificará por correo electrónico.

Tal y como se especifica en las normas de publicación de la revista, le recordamos que su manuscrito no puede ser publicado en ninguna otra revista mientras dure el proceso de revisión.

No dude en contactar con la redacción para cualquier información adicional.

Reciba un cordial saludo,

EM
Gaceta Sanitaria

Dear Dr. Contreras,

Your submission entitled "Changes in vitamin D receptor expression, cell cycle, and viability in breast cancer cells supplemented with vitamin D and dexamethasone" has been received by journal Gaceta Sanitaria.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

EM
Gaceta Sanitaria

7.1.5 Resumen del artículo

Breast cancer is the most frequent type of female cancer. Although significant efforts have been made to improve diagnostics and therapy, there is a continuous challenge to develop more efficient treatments, with fewer side effects. Vitamin

D supplementation has been proposed as a preventive or adjuvant treatment in various types of cancer, while glucocorticoids are often used as immunomodulatory treatments for breast cancer.

The objective of this study was to evaluate changes in VDR receptor expression, cell cycle and viability of a human breast cancer cell line supplemented with vitamin D, dexamethasone, or their combination. T47-D cells were supplemented with dexamethasone and/or vitamin D in increasing concentrations for up to 72 hours. VDR expression, viability, cell cycle progression and cell death were analyzed by a combination of spectrophotometry, flow cytometry and western blotting.

The results show that VDR receptor expression and cell death increased significantly after dexamethasone supplementation, while vitamin D had a smaller effect. In contrast, vitamin D supplementation appears to enhance cell cycle progression, whereas dexamethasone treatment had the inverse effect. Combination of both stimuli showed results similar to stimulation with dexamethasone alone. These data suggest that stimulation with dexamethasone, but not vitamin D, increases VDR expression, while decreasing the proliferative capacity and viability of human breast cancer cells *in vitro*.

8. Discusión general

El cáncer de mama es el cáncer con mayor prevalencia en la población femenina, en México se cuenta con una incidencia anual de 38.4 por 100,000 mujeres ³⁵, lo cual lo lleva a ser un problema de salud global, esto a pesar de que exista tratamiento para el cáncer de mama, el cual puede resultar efectivo siempre y cuando el diagnóstico haya sido oportuno. Es por ello por lo que, organizaciones mundiales como la OMS, se han dado a la tarea de crear planes de acción a nivel preventivo para esta enfermedad, de este modo es como en la actualidad se ha propuesto el agregar dietas y suplementos a través de micronutrientes y otros medicamentos como los glucocorticoides que puedan coadyuvar al tratamiento convencional del cáncer de mama, es así, como ya se han reportado algunos estudios que aportan resultados de interés sobre este tratamiento adyuvante.

Tal ha sido el caso del complejo 1,25 (OH) 2D-VDR que se asocia con el receptor alfa del retinoide X, a través del coactivador del receptor de esteroides 1 (SRC-1) y que juntos se unen a los elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE). Los objetivos posteriores del VDR son genes del metabolismo mineral, incluida la homeostasis del calcio y el fósforo entre otras vías metabólicas, incluidas las involucradas en la respuesta inmune y el cáncer ⁷. Esta posible respuesta se trató de comprobar en esta investigación, donde se encontró una mayor expresión del receptor VDR en la línea celular T 47-D de cáncer de mama estimulada con dexametasona a diferencia de los estímulos con vitamina D, viéndose también una expresión significativamente menor del receptor en el grupo de células estimuladas con la combinación de ambos fármacos.

Esto a su vez, se trató de dilucidar a través del análisis de viabilidad celular, arrojando como resultados una disminución significativa en la viabilidad de las células estimuladas con dexametasona a diferencia de las de vitamina D.

Cabe señalar que estos primeros datos se pueden discutir con lo reportado por García ³⁴ quien usó al VDR como blanco para la terapia del cáncer, en ratones

inducidos a cáncer de mama donde reportó un aumento de expresión del VDR y la disminución significativa del tumor, de aquellos ratones tratados con calcitriol. Por otro lado, Ma et. al.,³⁵ concluyó que el inconveniente para usar calcitriol se relacionaba con la limitación en el incremento de la dosis debido a la hipercalcemia

secundaria; sin embargo, Beer y colaboradores³⁴, encontraron que la dosificación intermitente del calcitriol permite sustancialmente escalar la dosis sin crear toxicidad limitante; es decir, sin tener efectos secundarios de hipercalcemia. Además, reportaron que la combinación del calcitriol con agentes citotóxicos, radiación, tamoxifeno, glucocorticoides y ketoconazol, puede potenciar sus efectos antineoplásicos logrando disminuir la dosis y con ello los posibles efectos adversos Ma et. al.,³⁵. Por lo tanto, la terapia con calcitriol puede ser prometedora para el tratamiento de cáncer de mama ya que estos tumores expresan al VDR.

Adicionalmente, en este estudio se encontró una disminución en la proliferación celular, con un mayor porcentaje de células cancerígenas detenidas en la fase G0, G1, siendo más notorio en los estímulos con dexametasona (mayormente a la concentración de 40 nM) y en los estímulos de la combinación. Estos resultados son contrarios a lo reportado por García³⁴, donde sus resultados fueron una cierta resistencia al efecto antiproliferativo del calcitriol, que pudo deberse a la baja expresión del VDR y a la alta expresión basal de CYP24A1 reportada en su estudio, lo que disminuye tanto la bioactividad como la biodisponibilidad del calcitriol y con ello sus efectos antineoplásicos. Por otro lado, Hidalgo³⁵ reportó que la dexametasona aumentó considerablemente la expresión de VDR y disminuyó la proliferación, esto en células de cáncer de próstata.

En este estudio, el efecto de la dexametasona y la vitamina D en la línea celular de cáncer de mama T 47D parece prometedor como posible tratamiento adyuvante en el cáncer de mama, esto debido a los resultados obtenidos donde se pudo notar el aumento de la expresión del VDR con la dexametasona, con una disminución de la viabilidad celular y detención del ciclo celular, con efecto de

muerte celular por necrosis, a diferencia de lo encontrado con la vitamina D; este efecto se corroboró a través de la dosis de combinación que aunque no fueron significativos los resultados, se presentó un aumento de la expresión del receptor, disminución de la viabilidad celular, detención del ciclo celular y muerte celular por necrosis similar a los resultados con dexametasona, no obstante cabe señalar que se requieren de otros estudios *in vivo* donde se puedan medir niveles en sangre de vitamina D, y biomarcadores del cáncer de mama en relación con estos tratamientos para su posible aplicación clínica.

9. Conclusiones

El receptor VDR se expresa en las células estimuladas con dexametasona principalmente en las concentraciones más altas y al menor tiempo de exposición, caso contrario en los estímulos con vitamina D donde el receptor disminuye su expresión.

En cuanto a la viabilidad celular fue menor la proliferación celular al mayor tiempo de exposición con la concentración más alta de dexametasona, lo cual puede indicar muerte celular a mayor concentración y tiempo de exposición en las células estimuladas con dexametasona. En cambio, con vitamina D los datos muestran que las tres concentraciones detienen la proliferación celular. El análisis de ciclo celular muestra diferencias en el número de eventos de células T 47D en las fases del ciclo celular, destacando de importancia que ante los estímulos el mayor número de eventos no entro en ciclo celular, lo cual pudiera indicar una detención en el crecimiento celular bajo tratamiento de dexametasona y con vitamina D.

La muerte celular se presentó mayormente por necrosis, esto pudo deberse a las características de las células que al tratarse de células con cáncer tienen daño a su estructura y al proceso inflamatorio que sufren el cual no les permite cumplir normalmente con sus señales ni funciones, llevándolas a la necrosis, no obstante, un número menor de células sufrió apoptosis lo cual se confirmó con la expresión de la caspasa 3 activa mediante el western blot.

Estos resultados permiten sugerir más estudios sobre el uso de la vitamina D y de la dexametasona in vivo e in vitro para poder corroborar estos hallazgos, que puedan contribuir al uso dentro del tratamiento o a manera preventiva en mujeres que padezcan cáncer de mama o que tengan el riesgo de padecerlo.

10. Referencias bibliográficas

1. OMS. (2021). Cáncer de mama. USA: WHO.
2. INEGI. (2023). Estadísticas de mortalidad. Tabulados interactivos. México: SNIEG.
3. The American Society of Breast Surgeons. (2020). Consensus guideline on genetic testing for hereditary breast cancer. USA.
4. Kelly K. Hunt, MD, Karla V. Ballman. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: A randomized clinical trial. *JAMA*, (6):569-575.
5. Choi, L. (2022). Evaluación de trastornos mamarios. Manual MSD, 321-333.
6. Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, Tiao G, Engreitz JM, Kim J, et al. (2017). Recurrent and functional regulator y mutations in breats cancer. *Nature*, 55-60 (7661)547.
7. Lee S.M, Meyer MB, Benkusky NA, OBrien CA, Pike JW. (2018). The impact of VDR expression and regulation in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 177:36-45.
8. Anand S, Shen A, Chen J, Powers J, Rayman P, Hasan T, et al. (2024). Combination of Oral Vitamin D₃ with Photodynamic Therapy Enhances Tumor Cell Death in a Murine Model of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Photochem Photobiol*. 90 (5): 1126– 1135.
9. Friedrich M, Villena C, Wolfgang T, Werner S, Axt R. (2002). Analysis of vitamin D- receptor (VDR) and retinoid X-receptor alpha in breast cancer. *Histochem J*. 34 (1-2): 35- 40.
10. Al-Azhri J, Zhang Y, Bshara W, Zirpoli G, McCann SE, Khoury T, et al. (2017). Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. *Clin Cancer Res*. 23 (1):07-103.
11. Shruthi, N, (2017) Analysis of the Cytotoxic Effects of Vitamin D₃ on Colorectal, Breast and Cervical Carcinoma Cell Lines. *Biochem Anal*

- Biochem, 6:2.
12. Food and Drug Administration FDA. (2020). Vitamins and minerals. Fda.gov.
 13. Bhoora, S., Pather, Y., Marais, S. y Punchoo, R. (2020). El colecalciferol inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis en la línea celular CaSki. *Ciencias médicas*, 8 (1), 12.
 14. Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS. (2015) Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev.*;34(1):2-23.
 15. Laforest, S. P. (2020). Estrogens and Glucocorticoids in Mammary Adipose Tissue: Relationships with Body Mass Index and Breast Cancer Features. *The journal of clinical endocrinology and metabolism.*, 105 (4): 504-516
 16. Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. (2007) Glucocorticoids & adrenal androgens. In: Gardner DG, Shoback D, eds. *Greenspan's basic & clinical endocrinology*, 8th ed. New York: Lange, McGraw Hill, p 346-95
 17. Kim MH, Dong K, Seho P, Heung J, Lee KY, Hwang J, et al. (2019). Single dose of dexamethasone is not associated with postoperative recurrence and mortality in breast cancer patients: a propensity-matched cohort study. *BMC Cancer*.19 (1): 251.
 18. Liu S., et al. (2011). Immune cell populations decrease during craniotomy under general anesthesia. *Anesth Analg.* 113(3): 572-577.
 19. National Cancer Institute: (2021) SEER Stat Fact Sheets: Prostate. Bethesda, Md: National Cancer Institute. Available online. Last accessed August 5.
 20. Guo, J., Ma, K., Xia, HM, Chen. (2018). El receptor de andrógenos revierte la inhibición inducida por la dexametasona de la proliferación y migración de células de cáncer de próstata. *Informes de medicina molecular*, 17 (4), 5887–5893.
 21. Nichols EK, Khatib IM, Aburto NJ, Sullivan KM, ScalNon KS, Wirth

- JP, et al. (2012) Vitamin D status and determinants of deficiency among non-pregnant Jordanian women of reproductive age. *Eur J Clin Nutr.*;66(6):751-756.
22. Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS. (2016) Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the “gold standard” method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev.*;34(1):2-23.
23. Heer M, Egert S. (2015) Nutrients other than carbohydrates: their effects on glucose homeostasis in humans. *Diabetes Metab Res Rev.*;31(1):14-35.
24. Blasiak, J. P. (2020). Vitamin D in Triple-Negative and BRCA1-Deficient Breast Cancer- Implications for Pathogenesis and Therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(10), 3670.
25. Rathore, R, Deleuran B, Dahlerup JF, Jorgensen SP, Bartels E, Harslof T. (2017) Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 22 (7), 898-919.
26. UK Health Security Agency. (2022) ECACC General Cell Collection: T47D/TR-1. T47D/TR-1 (ECACC16022513).
27. Bendix M. et,al. (2015) Flow cytometry detection of vitamin D receptor changes during vitamin D treatment in Crohn´s disease. *Clinical and Experimental Immunology*. Vol 181: 19-28
28. Baynes, J.W. (2019) Muerte celular: apoptosis, necrosis y autofagia. *Bioquímica médica*. 5º edición. Elsevier.
29. Annett S, Willis O, Vareslija D, Robson T. (2022). Dexamethasone promotes breast cancer stem cells in obese and not lean mice. *Pharmacol Res Perspect.* 10 (2): e00923.
30. Byun DJ, Wolchok JD, Rosenberg LM, Girotra M. (2017) Inmunoterapia del cáncer: bloqueo del punto de control inmune y endocrinopatías asociadas. *Nat Rev Endocrinol.*; 13: 195-207.
31. Isaías-Tizapa, R. A.-S. (2019). The Leptin induced Hic-5 expression and

- actin puncta formation by the FAK/Src-dependent pathway in MCF10A mammary epithelial cells. . *Biomedic.*, 39(3):547-560.
32. La Porta E, Galés J. (2014). Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144: 65-73.
 33. Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. (2007) Glucocorticoids & adrenal androgens. In: Gardner DG, Shoback D, eds. Greenspan's basic & clinical endocrinology, 8th ed. New York: Lange, McGraw Hill, p 346-95.
 34. Palmero PJ, Lassard RJ, Juárez Aguilar, LA. (2021). Cáncer de mama: una visión general. *Acta médica Grupo Ángeles*, 19(3), 354-360.
 35. Fusco R, Galgani M, Procaccini C, Franco R, Pirozzi G, Fucci L, et al. (2017). Cellular and molecular crosstalk between leptin receptor and estrogen receptor- {alpha} in breast cancer: molecular basis for a novel therapeutic setting. *Endocrine-Related Cancer*, 17-(2). 373-82.

11. Anexos

Anexo 1. Ficha de la línea celular T 43-D²⁷

Nombre: T 43-D

Descripción: Carcinoma

de mama. Morfología:

De tipo epitelial

ECACC: 89110211 (lote 08G024) ATCC: Nivel de bioseguridad: 1 condiciones de cultivo: DMEM, Suero bovino fetal al 10% (FBS)

Procedimiento de subcultivo: dividir los cultivos subconfluentes en 1:3 a 1:6 sembrando de 2-4 x 10000 células/ mL empleando tripsina/EDTA. Se incuban a 37°C y 5% de CO₂. Las células crecen lentamente en clusters y pueden disgregarse pipeteando varias veces. Después del subcultivo, pueden tardar unas 48 horas en volver a adherirse. El medio se cambia 2 veces por semana.

Observaciones: Derivado de células epiteliales aisladas de un derrame pleural obtenido de una femenina de 54 años diagnosticada con carcinoma ductal infiltrante de mama.

Anexo 2: Soluciones para western blot

Extracción de proteínas

Buffer de lisis:

- 10 mL de tris 0.5M pH 6.8
- 50 µL de EDTA 0.2M pH 8.0
- 200 µL de EGTA 50mM pH 7.9
- 102 µL de β-mercaptoetanol
- 1 mL de IGEPAL

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Sigma-Aldrich)

Estándares de albumina

Solución de trabajo: albumina bovina 2 mg/mL

Se prepararán los estándares como se indica en la siguiente tabla.

Concentración (mg/ml)	Albumina (2 mg/mL)	Agua destilada
0.1	50 µL	950 µL
0.2	100 µL	900 µL
0.4	200 µL	800 µL
0.6	300 µL	700 µL
0.8	400 µL	600 µL
1.0	500 µL	500 µL
1.2	600 µL	400 µL

Los tubos se guardarán a 4°C.

Buffer de carga de muestra (SLB) 4X

- 3.8 mL de agua destilada
- 1 mL de tris 0.5M pH 6.8
- 0.8 mL de glicerol
- 0.4 mL de azul de bromofenol al 1%
- 1.6 mL de SDS 10%
- 102 µL de β-mercaptoetanol

Soluciones para la preparación de geles de acrilamida Acrilamida/Bis 30%, 2.67%

- 146 g de acrilamida (altamente neurotóxica, utilizar guantes, bata y cubrebocas)
- 4 g de N’N metileno-bis acrilamida

Se disolverá en 300 mL de agua. Cuando esté disuelta, completar a 500 mL y se filtrará con gasa. Se guardará a 4°C en un frasco ámbar o frasco envuelto en papel aluminio.

Preparación del gel de corrida (*running gel*) 30%

	6%	7.5%	10%	12%
Agua destilada	5.3 mL	4.8 mL	6.97 mL	3.3 mL
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	4.25 mL	2.5 mL

SDS 10%	100 µL	100 µL	170 µL	100 µL
Acrilamida/Bis 30%, 2.67	2.0 mL	2.5 mL	5.61 mL	4.0 mL
APS 10%	100 µL	100 µL	170 µL	100 µL
TEMED	25 µL	25 µL	34 µL	25 µL
Volumen total	10 mL	10 mL	17 mL	10 mL

Preparación del gel de apilamiento (*stacking gel*) 4%

	4%
Agua destilada	6.1 mL
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida/Bis 30%, 2.67	1.33 mL
APS 10%	100 µL
TEMED	25 µL
Volumen total	10 mL

Se prepararán los geles al porcentaje deseado, limpiando previamente los platos con etanol al 70%

Se preparará el buffer de corrida del concentrado 5X.

Buffer de corrida (running buffer) 5X

- 15 g de Tris base
- 72 g de Glicina

Se disolverá en 700 mL de agua destilada y se completará a 1 L, filtrar con gasa. Se almacenará a temperatura ambiente.

Buffer de corrida 1X

Running buffer 5X	200 mL
SDS 10%	10 mL

Agua destilada	790 mL
-----------------------	--------

Soluciones para la transferencia de proteínas a membranas de PVDF Buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol)

TBS 10X

- 80 g NaCl
- 24.2 g tris base

Se disolverá en 800 mL de agua destilada, se ajustará pH a 7.6 con HCl y se ajustará el volumen final a 1 L.

TBS 1X-tween 20

- 100 mL de TBS 10X
- 1 mL de tween 20 (concentración final 0.01%)
- 899 mL de agua destilada

Otras soluciones:

Persulfato de amonio 10% (APS 10%)

1 g de persulfato de amonio en 10 mL de agua destilada. Guardar a 4°C.

Tris 1.5 M pH 8.8

18 g de tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.8 con HCl y completar a 100 mL con agua.

Tris 0.5 M pH 6.8

6 g de tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 6.8 con HCl y completar a 100 mL con agua.

Lauril sulfato de sodio 10% (SDS 10%)

10 g de SDS, disolver en 70 mL de agua destilada, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua.

Anexo 3: Informe de originalidad

Cambios en la expresión del receptor de la vitamina D en células de cáncer de mama suplementadas con vitamina D y dexametasona y su efecto en la muerte celular

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	ri.uaemex.mx Internet	442 palabras — 3%
2	docplayer.es Internet	318 palabras — 2%
3	www.scielo.org.ar Internet	254 palabras — 2%
4	repositorio.cinvestav.mx Internet	244 palabras — 2%
5	hdl.handle.net Internet	123 palabras — 1%
6	www.eluniversal.com.mx Internet	115 palabras — 1%
7	www.who.int Internet	103 palabras — 1%
8	www.ncbi.nlm.nih.gov Internet	98 palabras — 1%
9	www.coursehero.com Internet	88 palabras — 1%