





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL DIPLOMA EN  
LA ESPECIALIDAD DE MEDICINA INTERNA

**Efecto de los agentes antineoplásicos en la expresión de  
transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en  
las líneas celulares de cáncer mama.**

**RUBI JANDAY NÁJERA ANDRADE**

DIRECTOR CLÍNICO  
DOCTOR OSCAR DE JESÚS PÉREZ RAMÍREZ

CO- DIRECTOR  
DOCTOR JESÚS FLAVIO MARTÍNEZ MORALES

DIRECTOR METODOLÓGICO  
DR. MARCO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESPECIALIDAD EN MEDICINA INTERNA

TITULO

EFFECTO DE LOS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS EN LA EXPRESIÓN DE  
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs Y SGLTs) Y LA VIABILIDAD EN  
LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER MAMA.

PRESENTA  
RUBÍ JANDAY NÁJERA ANDRADE

DIRECTOR Dr. Óscar de Jesús Pérez Ramírez	
CO – DIRECTOR Dr. Jesús Flavio Martínez Morales	
ASESOR METODOLOGICO Dr. Marco Martínez Martínez	

Sinodales	
Dr. Arturo Guel Pañola	
Dr. José Zermeño Nava	
Dr. Dante Guillermo Mejía Torres	
Dr. Juan Manuel Shiguetomi Medina	
Dra. Ana Luisa Molina González Coordinadora de la Especialidad en Medicina Interna.	
M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal  Jefe de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	





## RESUMEN

**Objetivo:** Identificar el efecto de los agentes antineoplásicos en la expresión de los transportadores (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama.

**Sujeto y métodos:** Es un estudio *in vitro*, en el que se utilizaron como modelo experimental las líneas celulares en cultivo MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A obtenidas de la American Type Culture Collection. El tipo de estudio realizado corresponde a una cohorte experimental, antes y después, aleatorizado por asignación ciego simple, en 3 grupos de 3 bloques cada uno. El bloque 1 incluyó a la línea celular MCF-7, el 2 correspondió a la línea celular MDA-MB-231 y el 3 a la línea MCF-12A. Los cultivos se expusieron a cada uno los agentes antineoplásicos y se compararon con su control. En todos los bloques se evaluó la expresión del ARNm transportadores de glucosa GLUTs y SGLTs.

**Resultados:** Las células se cultivaron ajustándose a una la concentración a  $25 \times 10^4$  células/ml. Posteriormente se estableció la concentración óptima de las 3 líneas celulares (MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A), suficiente para inducir un cambio en la expresión de los transportadores de glucosa GLUTs y SGLTs, al exponerse a las diferentes concentraciones de docetaxel, doxorubicina, 5- fluorouracilo y cisplatino. Para evaluar la expresión de las proteínas de transporte de glucosa equilibrativo y concentrado, se determinó el resultado con el ensayo de western blot, obteniéndose la expresión de los transportadores GLUT1 para MCF-7 y MDA-MB-231 previo a cada fármaco propuesto.

**Conclusiones:** Este estudio abre nuevas posibilidades de evaluación para los mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos y su relación con los transportadores de glucosa y el balance oxidativo mitocondrial, ofreciendo modelos experimentales *in vitro* apropiados para el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama.



## **DEDICATORIAS**

A mis padres Miguel Nájera y Margarita Andrade, por su apoyo incondicional, educación y paciencia, que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mi hermano Jorge Nájera que siempre confío en mí.

A mi abuela Asunción que fue un ejemplo de mujer profesionista y emprendedora

A mi tía Ma. de los Ángeles Nájera, quien me ayudo al inicio de mi carrera y hasta el último momento de su vida.



## **RECONOCIMIENTOS**

Al Dr. Flavio Martínez, por su confianza en mí para iniciar este proyecto, por su dedicación y guía durante el desarrollo de esta tesis, así como todas las facilidades para llevarla a cabo.

Al Dr. Oscar Pérez, por el interés de fortalecer mis conocimientos de práctica clínica, además del sembrar en mí el interés por realizar actividades en investigación.

A la Dra. Othir Galicia, por su confianza al momento de estar bajo su tutela en el desarrollo experimental, su dedicación y capacitación constante, además de su gran paciencia al momento de enseñarme y aconsejarme en las actividades de laboratorio que se requirieron para este proyecto.

Al Dr. Arturo Guel, quien, desde mi práctica clínica de pregrado, sembró en mí el interés en la Oncología, como una especialidad donde puede haber una esperanza y lucha constante por la vida.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al apoyo a través de la beca (599592) otorgada en estos 4 años por CONACyT.

A las instituciones que me brindaron el espacio de trabajo para el desarrollo de esta tesis, especialmente al departamento de Farmacología Clínica, de la Facultad de Medicina de San Luis Potosí.

Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, institución que me ha visto desarrollarme en la práctica clínica a través de sus pacientes que confían en nuestro conocimiento.

Dr. José Zermeño Nava, Dr. Dante Mejía Torres y Dr. Juan Manuel Shigetomi por su participación como sinodales.

## ÍNDICE

EFFECTO DE LOS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS EN LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTs Y SGLTs) Y LA VIABILIDAD EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER MAMA.....	3
RESUMEN .....	I
DEDICATORIAS .....	II
RECONOCIMIENTOS.....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
ÍNDICE .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ANTECEDENTES. ....	1
JUSTIFICACIÓN. ....	9
HIPÓTESIS. ....	11
OBJETIVOS. ....	11
SUJETOS Y MÉTODOS. ....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	15
ÉTICA.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN. ....	27
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA. ....	34
ANEXOS. ....	39
Anexo 1. Variables .....	39
Anexo 2. Descripción de métodos.....	41

Anexo 3. Acreditación de bioseguridad en el laboratorio de cultivo celular .....	46
.....	46
Anexo 4. Autorización de ATCC.....	47
Anexo 5. Aprobación por el Comité de Investigación de posgrado .....	48
Anexo 6. Re Aprobación por el Comité de Investigación de posgrado.....	49
Anexo 7. Aprobación por el Comité de Ética en Investigación .....	50
Anexo 8. Re Aprobación por el Comité de Ética en Investigación.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Actividad metabólica mitocondrial a diferentes densidades de las células MDA-MB-231 y MCF- 7 .....	21
<b>Figura 2.</b> Efecto de los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapia del cáncer de mama sobre la actividad metabólica de las células MCF-12A. ....	22
<b>Figura 3.</b> Efecto de los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapia del cáncer de mama sobre la actividad metabólica de las células MCF-7 .....	23
<b>Figura 4.</b> Efecto de los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapia del cáncer de mama sobre la actividad metabólica de las células MDA-MB-231 .....	24
<b>Figura 5.</b> Expresión de ARNm de los transportadores de glucosa GLUTs y SGLTs en las células MCF-12A, MCF-7 y MDA-MB-231 (5A, 5B, 5C) .....	26
<b>Figura 6.</b> Cultivo de células MCF- 12-A.....	42
<b>Figura 7.</b> Cultivos de células MCF-7.....	42
<b>Figura 8.</b> Cultivo de células MDA-MB-231 .....	43
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de la concentración de proteínas con el método espectrofotométrico del ácido bicinconínico (BCA) .....	44

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Concentraciones inhibitorias 50 (IC <sub>50</sub> ) de los fármacos antineoplásicos utilizados para el cáncer de mama.....	17
<b>Cuadro 2.</b> Concentraciones experimentales evaluadas en los cultivos de células MCF-7 y MDA-MB-231 .....	18
<b>Cuadro 3 .</b> Descripción de las características de las variables a evaluar . .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**μM.** micromolar

**nM.** nanomolar

**ACC.** Acetil CoA carboxilasa

**AMPK.** Proteína cinasa de adenosina monofosfato

**ARNT.** Hidrocarburo de Arilo

**ATP.** Trifosfato de adenosina

**CAIX.** Anhidrasa carbónica IX

**CoCl<sub>2</sub>.** Cloruro de cobalto

**D.E.** Desviación estándar

**dNTP.** Desoxirribonucleótidos de trifosfato

**D.O.** Densidad óptica

**D.O.C.** Densidad óptica de la proteína control

**D.O.P.** Densidad óptica de la muestra problema

**ER<sub>2</sub><sup>+</sup>.** Receptor de estrógenos

**EGFR.** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**[<sup>18</sup>F]FDG-PET.** Tomografía por emisión de positrones [<sup>18</sup>F] Flour-2-desoxi-D-glucosa

**GLUT.** Transportadores de glucosa

**HIF1α.** Factor 1 alfa inducible por hipoxia.

**IGF.** Factores de crecimiento de tipo insulina

**kDa.** kilodalton

**mTOR.** Receptor de mamíferos para rapamicina

**MTS.** (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio)

**NAD<sup>+</sup>.** Di nucleótido de nicotinamida y adenina

**NFκB.** Factor de transcripción nuclear kappa B

**PMS.** Metilsulfato de fenazina

**SGLT.** Transportador de glucosa dependiente de sodio

**SHBG.** Globulina fijadora de hormonas sexuales

### **STAT 3.** Transductor de señal y activador de la transcripción 3

## LISTA DE DEFINICIONES

**Unidad de interés biológico:** es la entidad sobre la cual se hacen las referencias.

**Unidad experimental:** es la entidad que se asigna al azar e independientemente de las condiciones experimentales.

**MCF-7:** Línea celular derivada de epitelio mamario bien diferenciado, con la capacidad de procesar estradiol a través de los receptores de estrógeno citoplasmático y la capacidad de formar domos; sus siglas significan. Michigan Cancer Foundation 7, el número, corresponde al subcultivo que se utilizó para establecer la línea.

**MDA-MB-231:** Esta línea celular se derivó en M.D. Anderson en 1976 de un derrame pleural de una mujer de 31 años, con antecedente de cáncer de mama, sus siglas significan; M.D. Anderson – Metástasis Breast Cancer- 231, los números corresponden al subcultivo que se utilizó para establecer la línea.

**MCF-12A:** Línea celular no tumorigénica, establecida a partir de tejido de enfermedad mamaria fibroquistica que contenía áreas focales de hiperplasia intraductal; su siglas significan Michigan Cancer Foundation 12A, el numero corresponde al subcultivo para que se utilizó para establecer la línea.



## ANTECEDENTES.

De acuerdo con las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud en 2015, es la enfermedad neoplásica con mayor frecuencia en la población femenina, ocupa el 5to lugar de mortalidad en mujeres representando aproximadamente el 30% de todos los diagnósticos de cáncer. (1)

La Sociedad Americana de Cáncer reportó en el año 2014, 234,340 nuevos casos de cáncer de mama en los Estados Unidos de Norteamérica; de los cuales, 64,640 casos fueron identificados como invasivos y de éstos 40,000 pacientes en el mundo tuvieron un desenlace mortal en ese año, independientemente de la edad, la multi o nuli paridad, lactancia, etnicidad, estilo de vida, detección temprana y nivel socio-económico. (2) De acuerdo a las cifras del INEGI para el año 2014, en México, se registraron 28.75 nuevos casos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más. (3) Estadísticamente en el 16% de los pacientes con cáncer de mama a nivel mundial coexiste el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, e individualmente de la tasa de mortalidad que es del 15% a 30%. (4)

Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre la obesidad (5), la diabetes mellitus tipo 2 (6), el hiperinsulinismo (7) y el aumento en el factor de crecimiento tipo insulina (IGF) acompañados de un agravamiento del cáncer debido a la resistencia a la terapia antineoplásica y la rápida progresión a enfermedad metastásica y muerte (8). Aproximadamente el 5% de los cánceres en hombres y el 10% de todos los cánceres en las mujeres han sido atribuibles al factor obesidad. (9)

En el cáncer mamario se han identificado recientemente mecanismos de captación de glucosa a través de la membrana como una vía limitante para la proliferación de células cancerosas que promueven la regulación positiva de los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT3), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y otras señales promotoras del crecimiento. Estas vías son susceptibles de bloqueo *in vitro* e *in vivo*. (12) Se ha informado que niveles elevados de glucosa en ayuno se asociaron a un mayor riesgo de cáncer, en mujeres postmenopáusicas,



con valor estimado de  $RR = 1.89$ , sin significado estadístico en las mujeres premenopáusicas. (10)

La relevancia de esta vía se manifiesta por el uso como un medio de diagnóstico y seguimiento en la evaluación del cáncer de la FDG-PET, un análogo de glucosa no metabolizable, marcado con el radio nucleótido 18- flúor, conocida también como 2-flúor-2-desoxi-D-glucosa o fluorodesoxiglucosa que tiene la propiedad de emitir positrones, esta molécula administrada por vía intravenosa, ingresa a las células a través de los transportadores de glucosa siendo fosforilada por hexosas, su difícil metabolismo y mayor absorción las células neoplásicas permite que se concentre en los tumores por pequeños que sean, de tal forma que la mayor emisión de positrones, mayor sea la acumulación de fluorodesoxiglucosa, lo que se asocia a mayor agresividad y estadios avanzados de la neoplasia, por ejemplo los estadios IV.(11)

Es importante señalar que estos mecanismos participan en mecanismos celulares para la obtención de energía, ya que la glucosa participa en la generación de ATP, en consecuencia, la reproducción celular aumentada y desorganizada demanda un enorme gasto energético. En síntesis, la principal fuente de energía en la célula aeróbica de mamíferos es la disponibilidad de glucosa intracelular. La glucosa permea a la célula por mecanismos de difusión facilitada, es decir transportadores. Los transportadores de glucosa GLUT y SGLT son, proteínas de membrana y representan las vías exclusivas para la incorporación del azúcar en la célula y en consecuencia, la principal fuente para la producción de ATP. Actualmente se han identificado 14 proteínas transportadoras de familia de los GLUTs y 6 del tipo SGLTs.(13) Los GLUTs, se dividen en tres clases, de acuerdo a su afinidad y distinción de transporte de carbohidratos y otras hexosas (24). En un estudio (Kocdor, 2013), se demostró la expresión de este transportador en 56.8 % de casos de cáncer ductal *in situ* y en un 44.1% para cáncer ductal invasor, por lo que la presencia de estas proteínas son un objetivo para la expresión de supervivencia y de bloqueo para GLUT 1. La restricción en el aporte de glucosa evidenció la disminución de proliferación celular y no solo la relación de



hiperglucemia y este receptor, sino también múltiples vías implicadas que actúan en conjunto lo que favorece la proliferación exponencial de estas células. (14)

Para apoyar la presencia del transportador GLUT, es necesario la expresión conjunta y la unión entre el complejo de factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ), y el traslocador nuclear de receptor de hidrocarburo de arilo (ARNT). Aunque HIF1 $\alpha$  no se expresa en tumores de condición benigna, pero si hay evidencia de su presencia en cáncer *in situ* y en el de tipo ductal ( $p < 0.001$ ).

La cascada de factores que se activan por HIF-1 $\alpha$  y ARNT se ve regulada a través de la exposición de cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) que induce hipoxia, y constituye la estimulación de anhidrasa carbónica IX (CAIX), aumentando la expresión de GLUT 1 en aquellas células de cáncer ductal *in situ* y cáncer ductal invasor. La evidencia se ha confirmado por la evolución en modelos de microambientes que han participado con cambios a través de hipoxia-glucólisis y acidosis en muestras de tejido neoplásico, y que en estadios finales existió la adaptación de estos factores creando fenotipos más agresivos. (15)

En consecuencia, la reducción de los niveles de HIF-1 $\alpha$  evidenció una disminución de la actividad celular tumoral y sensibilidad al tratamiento quimioterapéutico. Un ejemplo, son aquellas pacientes que tienen diagnóstico de cáncer de mama con expresión de receptores de estrógenos positivos (E<sub>2</sub>+), y que se benefician de tratamiento con tamoxifeno, esta premisa fue respaldada por encontrar aumento de HIF-1 $\alpha$ , el cual estimuló la expresión de enzimas participantes en el metabolismo de la glucosa, como la lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato deshidrogenasa, y GLUT1. La lactato deshidrogenasa regenera el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>), implicado en la producción de la vía de glucólisis aeróbica traduciendo un continuo ciclo de reproducción *ad infinitum* aumentando la viabilidad celular. (16)

Por otro lado, la asociación de cáncer y obesidad mencionada anteriormente, por medio de estudios experimentales, han demostrado que en modelos de cáncer ha existido un desbalance energético especialmente en el adipocito, resultado de la estimulación por el factor de inflamación y la alteración de las vías de señalización de las adipocinas, leptina y adiponectina. Además, las células neoplásicas en el



cáncer de mama sufren: 1) una desprogramación de su metabolismo energético por un aumento en la captura de glucosa a través de proteínas transportadoras (transportadores de glucosa) y 2) el aumento del metabolismo oxidativo, en presencia y ausencia de oxígeno, lo cual conduce a una lactogénesis aeróbica intracelular, fenómeno conocido como efecto Warburg, en el cual bajo ciertas condiciones las células incrementaron varias veces el consumo de glucosa. Este mecanismo fue descrito detalladamente por el científico alemán Otto H. Warburg en 1931 quién lo estudió en tumores y en células neoplásicas. Actualmente se han propuesto estos dos mecanismos como probables blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama, es decir 1) fármacos inhibidores del transporte de glucosa y, 2) inhibidores de la glucólisis o de la lactogénesis aeróbicas (17).

En cuanto a la inhibición de los transportadores de GLUTs, se sabe que varios polifenoles de la dieta, presentes en vegetales, frutas y bebidas, poseen efectos anticancerígenos, *Moreira L et al.*, demostraron en un estudio *in vitro* que la presencia del flavonoide como la quercentina, presente en la cebolla y en el té verde, y el 3-galato de epigallocatequina (EGCG), principal polifenol en el té verde, además de estar involucrados en la inhibición de glucosa en las células de la placenta e intestinales, comprobaron que, estos flavonoides al exponerse en las líneas celulares de cáncer de mama con receptores de estrógeno positivo (MCF-7) y aquellos con receptores negativos (MDA-MB-231), la quercentina y el 3-galato de epigallocatequina inhibieron la absorción de glucosa regulada por la presencia del transportador GLUT1, inhibiendo el transporte de la misma, al no absorberse y metabolizar esta molécula, en consecuencia, disminuyó la viabilidad y la proliferación celular.(39) Además de estas vías susceptibles de bloqueo, también hay otras moléculas más recientemente estudiadas que contribuyen en la inhibición de los transportadores GLUTs, como lo son: resveratrol, naringenina, loretina, WZB117, tiazolidinediona, y STF-31.(40)

Por lo anteriormente descrito, proponemos que la expresión de los GLUTs podría tener una utilidad predictiva y/o pronóstica como indicadores del grado de evolución del cáncer mamario y que hay evidencia experimental que apoya sobre su uso como biomarcadores con intervención predictiva y/o pronóstica. (41)



En relación a la asociación de neoplasia e hiperinsulinismo, se ha descrito que hay otros mecanismos de defensa de estas células neoplásicas, por ejemplo, la intervención en la vía de la resistencia a la insulina y sus altos niveles, lo cual se ha traducido a una disminución en la concentración de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) circulante, produciendo un incremento de los niveles de estrógenos, y esto a su vez, inicia la activación celular y su consecuente proliferación de las células en mamas y de endometrio, inhibiendo la apoptosis de las mismas (13)

La evidencia presentada sobre el papel de estos blancos en el cáncer de mama, nos hace proponer que el bloqueo farmacológico de estas vías, detiene o previene la progresión de metástasis en las células neoplásicas. Las evidencias clínicas demostraron que el control glucémico se asoció a una baja incidencia de cáncer. Por ejemplo, con el uso de fármacos para la diabetes mellitus 2 como, la metformina, fármaco perteneciente al grupo de las biguanidas, se ha propuesto como un tratamiento de primera elección para pacientes con reciente diagnóstico de diabetes mellitus 2. Entre los mecanismos de acción descritos para la metformina, además de su efecto hipoglucemiante al inhibir la gluconeogénesis hepática y su efecto anti-glucagón, esta inhibición del complejo mitocondrial de transporte de electrones y la disminución de la producción de energía intracelular en forma de ATP y producción de radicales libres, el aumento en la relación AMPc/ATP promueve una activación de la proteína quinasa de adenosina monofosfato (AMPK). La vía de señalización de AMPK activada por la metformina ha sido implicada como sensor del estrés metabólico en células, con traducción en un aumento del proceso catabólico para restaurar la homeostasis de energía, inhibiendo vías anabólicas, limitando la actividad del complejo de rapamicina 1 (mTOR) y acetil CoA carboxilasa (ACC), ambas involucradas en la restricción del crecimiento celular y que al preservar esta actividad mitocondrial bloquearon los efectos inhibidores de las biguanidas sobre la proliferación celular.(18) (25)

Otros hipoglucemiantes orales son los pertenecientes a la familia de las tiazolinedonas, se ha descrito que el uso de éstos se asocia con una disminución de los niveles del antígeno prostático hasta un 40%, no solo en casos de cáncer de



próstata sino también en hiperplasia prostática benigna. Particularmente rosiglitazona, se asoció a un menor riesgo de cáncer de colon, y la pioglitazona a su vez con cáncer de mama; aun cuando reportes de este último fármaco han indicado un aumento en la incidencia de cáncer de vejiga.

Continuando con otro grupo de los fármacos innovadores como hipoglucemiantes, se encuentran los inhibidores del co-transportador sodio glucosa tipo 2 (SGLT2), identificados con el nombre de dapagliflozina, canagliflozina y empagliflozina, los cuales han sido aprobados para su uso en pacientes con diabetes mellitus 2. (19) En consecuencia tanto las tiazolinedonas y las glifozinas podrían ser potencialmente agentes útiles en el tratamiento del cáncer al disminuir las concentraciones de glucosa sanguínea y el transporte de la misma al interior de las células.

Los SGLT2, han sido identificados en páncreas, próstata, riñón y colon, y los SGLT1 principalmente en el tracto gastrointestinal. Particularmente, al ser bloqueados los SGLT2 por las glifozinas, se ha demostrado en algunos estudios, una inhibición del crecimiento de células tumorales y una potenciación de la eficacia farmacológica de algunas sustancias antineoplásicas como el docetaxel con radiación ionizante, sobre todo las relacionadas con la inhibición de la función mitocondrial, y aún más importante son independientes de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Se han comparado la dapagliflozina versus canagliflozina en cuanto a su eficacia sobre el metabolismo oxidativo mitocondrial. Los resultados indicaron que la canagliflozina disminuyó la captación de 2 desoxi-D-glucosa, inhibiendo la vía de respiración mitocondria por el complejo I, reduciendo adenosina trifosfato (ATP) y activando a la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) con mayor eficacia que la dapagliflozina. Sin embargo, los efectos anti proliferativos de la canagliflozina fueron revertidos después de la sobreexpresión de NDI1, lo que indicó que la inhibición del complejo I mitocondrial es necesaria para lograr tales efectos. (20) (28). Es necesario aclarar que aún existe controversia sobre los efectos antineoplásicos de estos dos últimos grupos de fármacos, ya que especialmente en las glifozinas se ha asociado su uso con una mayor incidencia de casos de cáncer.



En este sentido, en el 2011, la FDA planteó la asociación del uso de estos medicamentos y el incremento en el cáncer de vejiga y mama, atribuidos sobre todo a la administración de canagliflozina. Sin embargo, si se toman en cuenta los comparadores de riesgo que hay en cada uno de estos tipos de cáncer, en un metaanálisis que incluyó 21 ensayos se demostró que había una ausencia en el diagnóstico previo y que esta asociación era azarosa y no causal.

*Tand and cols.* en otro metanálisis que incluyó 46 ensayos clínicamente controlados, informaron de 580 incidencias de cáncer entre más de 30 mil personas con diabetes tipo 2 y que el uso de los SGLT2 no se asoció significativamente con un mayor riesgo de cáncer de forma general, esto durante un seguimiento de 61 semanas. (19) Estos fármacos de administración oral, son relativamente nuevos en el campo de la práctica médica, sus efectos en control y asociación a pacientes con cáncer no tienen aún una base de sustentación para confirmar un resultado en estudios controlados y que al mismo tiempo pueda ser reproducible en una muestra importante de la población.

La insulina per se o indicada en conjunto con hipoglucemiantes orales, la cual regula positivamente la relación con IGF- 1, a través del receptor para insulina (IR) en pacientes con cáncer de mama, por lo que la exposición prolongada a este medicamento, demostró una señalización mitogénica así como el aumento de crecimiento tumoral y metástasis. (21) Stammberger y colaboradores (2012), evaluaron el uso de insulina en sus distintas presentaciones basada en actividad de acción, con resultados comparativos para un aumento de riesgo de cáncer. En los resultados obtenidos se observó que la insulina glargina se asoció a un incremento del 200% de riesgo. Tomando en cuenta la información anterior que indica claramente que los hipoglucemiantes podrían contribuir a la disminución de la incidencia de diferentes tipos de cáncer, todavía no existen estudios con diseño confiable para esta correlación.

Sin embargo, queda claro con el panorama actual ha indicado la hiperglucemia y el desarrollo del cáncer, se encuentran involucrados independientemente y/o interdependiente, ya que la mortalidad aumentó cuando coexisten ambos padecimientos.



En síntesis, es claro que existe una relación en el incremento en la incidencia de cáncer y su asociación con hiperglucemia. Las células neoplásicas han aumentado sensiblemente su necesidad de glucosa con el propósito de continuar su ciclo reproductivo desordenado. Las necesidades de glucosa en estas células se han compensado con una sobreexpresión de los transportadores para glucosa mediada por hipoxia, glucólisis y acidosis intracelular. Múltiples vías intracelulares se han involucrado en esta sobreexpresión. Resulta evidente que el bloqueo de los transportadores o de las vías intracelulares involucradas en este mecanismo ofrezcan resultados prometedores a mediano plazo en el tratamiento antineoplásico. Por lo que, investigaciones en este campo seguramente redundarán en resultados aplicados para disminuir la tasa de mortalidad, para prevenir y/o aumentar la calidad de vida.



## JUSTIFICACIÓN.

El número de casos de cáncer de mama ha ido en aumento en la última década, colocándose como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en los Estados Unidos. Este aumento se asoció a un incremento en la diabetes mellitus tipo 2, por lo que interesa conocer los mecanismos que disparan el crecimiento anormal de las células tumorales en el cáncer de mama.

En este sentido, la glucosa de la dieta o la proveniente por síntesis endógena es el principal sustrato para generar energía en forma de ATP en la mayoría de las células por medio de fosforilación oxidativa y en menor medida por glucólisis. La mayor parte de las células de los mamíferos incorporan la glucosa por medio de proteínas membranales (transportadores de glucosa) a través de un proceso de difusión facilitada, ya sea dependiente de un gradiente de concentración (GLUTs) o por medio de un gradiente electroquímico de sodio (SGLTs). En células tumorales neoplásicas ha existido una alta demanda de energía que se deriva de la glucosa para su proliferación, lo cual generó una sobreexpresión génica de transportadores GLUTs, con un aumento en la expresión y actividad de estos.

La sobreexpresión de GLUT1 se ha identificado y caracterizado en múltiples células neoplásicas derivadas de mama, pulmón, riñón, colon, recto y páncreas. Además, tienen una asociación con un mayor índice proliferativo, menor grado de diferenciación, mayor potencial maligno y peor pronóstico. Por otro lado, SGLT1 y SGLT2 también se ha identificado en otros tipos de cáncer, como páncreas, próstata, pulmón, hígado y cáncer de ganglios linfáticos. Sin embargo, no se han determinado los niveles de expresión de SGLT en células de cáncer de mama. Esto demuestra la extrema importancia de la captación celular de glucosa y los transportadores GLUT para la supervivencia y proliferación de células tumorales.

(22)

Por lo anteriormente expuesto, existe un interés creciente en el estudio de la sobreexpresión de estos transportadores GLUTs y SGLTs en células tumorales, específicamente en el caso de cánceres de mama, por lo que es importante conocer si los agentes y/o fármacos antineoplásicos que se utilizan en la quimioterapia de cáncer mamario inhiben la sobreexpresión génica o la actividad aumentada de los



mismos, ya que potencialmente son compuestos prometedores para inhibir el efecto Warburg en líneas celulares tumorales de cáncer de mama (4). La evidencia científica de estudios *in vitro* indicó que la actividad de la prevención del cáncer, ha involucrado una serie de procesos epigenéticos, siendo éstos definidos como los cambios hereditarios en la expresión genética que van acompañados de alteración en las secuencias del ADN que modificaron la expresión de estos transportadores de glucosa.



## **HIPÓTESIS.**

Los agentes antineoplásicos modifican la expresión de los transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general**

Los agentes antineoplásicos docetaxel, doxorubicina, 5 fluorouracilo y cisplatino modifican la expresión de los transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y su relación con la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama MCF-12A, MCF-7 y MDA-MB-231.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar la expresión de los transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama antes de la exposición del agente antineoplásico.
2. Identificar la expresión de los transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama después de la exposición del agente antineoplásico.
3. Comparar la expresión de los transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama antes y después de la exposición del agente antineoplásico.



## SUJETOS Y MÉTODOS.

**Diseño:** Es un estudio de cohorte-experimental- antes y después- aleatorizado por asignación ciego simple realizado *in vitro*. Las líneas celulares se adquirieron en la American Type Culture Collection (ATCC) certificadas, y caracterizadas.

**Universo de estudio:** comprendido por cultivo de células MCF-7, MDA-MB-231, MCF12A.

La asignación de la intervención, fue con base a una aleatorización por grupos de 3 bloques:

Bloque 1: representado por el cultivo de células MCF-7.

Bloque 2: representado por el cultivo de células MDA-MB-231

Bloque 3: representado por el cultivo de células MCF-12A.

### **Criterios de selección:**

**Inclusión:** para cada uno de los experimentos se seleccionaron únicamente las monocapas de cada una de las líneas celulares obtenidas a partir de la resiembra 50, con integridad de la misma a las 48 horas en inhibición por contacto y estado estacionario.

**Exclusión:** monocapas contaminadas y menores o mayores a 48 horas.

**Eliminación:** Monocapas que no estuvieron integras a las 48 horas, procesamiento erróneo en el cultivo y/o cambio de los medios de incubación, alteraciones morfológicas evidentes a la microscopía por contraste de fases.

### **Variables de estudio:**

Todos los cultivos se expusieron a cada agente antineoplásico y serán comparados por su similar sin la exposición al fármaco. Cada uno evaluando la expresión de los transportadores de glucosa GLUTs Y SGLTs. Cuadro 3, ver **anexo 1**.

Descripción de métodos (**anexo 2**)



### Plan de trabajo:

<b>Mes</b>	<b>Actividad</b>
<b>Agosto-septiembre 2018</b>	Capacitación a cargo del Dr. Hugo Aragón Martínez para el manejo de material e instrumentos en el laboratorio de Farmacología Básica y Clínica
<b>Enero 2019</b>	Aprendizaje de la disciplina de trabajo en el laboratorio de Cultivo Celular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina a cargo de la Dra. Othir G. Galicia Cruz. Capacitación en los lineamientos y trabajo relacionado con las técnicas de cultivo celular, preparación de material y soluciones y desecho de material biológico. A cargo de la Dra. Othir G. Galicia Cruz
<b>Febrero 2019</b>	Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Determinación de número y viabilidad celular. Sesiones de discusión con el Dr. JF Martínez Morales codirector de la tesis
<b>Marzo 2019</b>	Determinación de IC <sub>50</sub> teórica y experimental Capacitación en la cuantificación de la concentración de proteínas, mediante el micrométodo espectrofotométrico del ácido bicinconínico Determinación IC <sub>50</sub> experimental en la línea celular MDA-MB-231 por triplicado a las 12,24 y 48h. Sesiones de discusión con el Dr. JF Martínez Morales codirector de la tesis
<b>Abril 2019</b>	Determinación de IC <sub>50</sub> experimental en la línea celular MDA-MB-231 por triplicado a las 24,48, 72 h. Sesiones de discusión con el Dr. JF Martínez Morales codirector de la tesis
<b>Mayo y Junio 2019</b>	Determinación de IC <sub>50</sub> experimental en la línea celular MCF-7, por triplicado. Sesiones de discusión con el Dr. JF Martínez Morales codirector de la tesis
<b>Julio 2019</b>	Identificación y resiembra del cultivo celular MCF-12A Determinación de IC <sub>50</sub> experimental para línea celular MCF-12A. Capacitación y realización de determinación de proteínas de transporte por el método de western blot con la Dra. Othir G. Galicia Cruz
<b>Agosto 2019</b>	Western blot para determinar presencia de $\beta$ -actina, GLUT-1 para MCF-7 y MDA-MB-231 con la Dra. Othir G. Galicia Cruz 3ª determinación de IC <sub>50</sub> experimental de MCF-7 a complementar "n" por triplicado. Sesiones de discusión con el Dr. JF Martínez Morales codirector de la tesis



<b>Septiembre 2019</b>	2 <sup>a</sup> determinación IC <sub>50</sub> experimental para MCF-12A a complementar “n” por triplicado. Sesiones de discusión con el Dr. JF Martínez Morales codirector de la tesis
<b>Octubre 2019</b>	Western blot para determinar la presencia de β-actina, GLUT1 y GLUT2 en línea celular MCF-7 y MDA-MB-231. Sesiones de discusión con el Dr. JF Martínez Morales codirector de la tesis



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El tamaño de la muestra para este tipo de estudios es en promedio de 6 replicados independientes, cada punto de concentración en los 6 replicados se realiza por triplicado. Los resultados se expresan como el promedio más-menos la desviación estándar ( $\mu \pm D.E.$ ) siguiendo los criterios de Lazic (23):

Unidad de interés biológico y Unidad experimental.

El tamaño de la muestra (N) es igual al número de la unidad experimental, que puede corresponder a las:

Unidad de interés biológico

Grupos de unidad de interés biológico

Partes de una unidad de interés biológico

Una secuencia de observaciones en una unidad de interés biológico

Además de la asignación aleatoria e independiente, para una replicación genuina, el (los) tratamientos (s) debe (n) aplicarse de forma independiente a cada unidad de interés biológico y las unidades de interés biológico no deberían influirse mutuamente.

**Método de aleatorización.** Asignación aleatoria para cada tratamiento y control por cada pozo en una multiplaca de 96 pozos, por letra y por número. Se utilizará el programa PineTools®. La aleatorización de lista con letra indicada en fila y número indicada en cada columna, en un patrón de 8x 12, por ejemplo, una cámara de 96 pozos tendría una distribución: 4C, 8D, 1A, etc.

**Análisis estadístico.** Las variables categóricas se informan en N y porcentaje (%), las variables continuas como media o mediana y su respectivo valor de dispersión de acuerdo a la normalidad que se realizara con QQplot. Las variables categóricas se compararán con la prueba de  $X^2$  o exacta de Fisher, de acuerdo a los valores esperados, las variables continuas con la T de student o la U de Mann Whitney de acuerdo a la distribución.



## ÉTICA.

Se sometió este protocolo para su evaluación por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Se aprobó y registró con el número: **60-18**.

El laboratorio de Farmacología y el de Cultivo de Tejidos cuentan con la autorización correspondiente del comité de bioseguridad para el uso de cultivos celulares, manejo y deshecho de los fármacos antineoplásicos que se utilizaran en este estudio.

Autorización de Bioseguridad (**anexo 3**)

Autorización de la ATCC. (**anexo 4**)

Aprobación por parte del Comité de Investigación. (**anexo 5**)

Re- aprobación por el Comité de Investigación. (**anexo 6**)

Aprobación por parte del Comité de Ética en Investigación. (**anexo 7**)

Re-autorización por parte del Comité de ética en Investigación. (**anexo 8**)

## RESULTADOS

### Determinación de la concentración citotóxica 50 (IC<sub>50</sub>) de los fármacos docetaxel, doxorubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino en las células MCF-7 y MDA-MB 231.

#### Concentración citotóxica 50 (IC<sub>50</sub>) teórica

Se realizó una revisión de bibliografía de trabajos científicos originales en los que se utilizó cada uno de los fármacos de estudio, se evaluó su efecto en la viabilidad de las células MCF-7 y MDA-MB-231 y se calculó la IC<sub>50</sub>. Los valores para este parámetro en ambas líneas celulares se describen en el cuadro 1, y se utilizaron como valores teóricos para establecer el rango de concentración experimental para cada fármaco en las condiciones experimentales en nuestro laboratorio. (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38).

**Cuadro 1.** Concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) de los fármacos antineoplásicos utilizados para el cáncer de mama.

Cultivo	Fármaco	IC <sub>50</sub> Teórica	Referencias
MCF-7	Docetaxel	762.82 ± 92.4 nM <sup>(1)</sup> 0.110 ± 0.012 µM <sup>(1)</sup> (1100 nM)	<sup>(1)</sup> Tanerian A. et al., 2012, <i>Iran J Basic Med Sci.</i> ; vol 15: 1
	Doxorrubicina	1189.47 ± 101 nM <sup>(1)</sup> 0.29 ± 0.09 µg/ml <sup>(2)</sup> (53 nM)	<sup>(1)</sup> Tanerian A. et al., 2012, <i>Iran J Basic Med Sci.</i> ; vol 15: 1 <sup>(2)</sup> Samer A. <i>Drug Desing. Develop Therapy.</i> 2013; 7: 25-3
	5- Fluorouracilo	4.37 ± 0.59 mg/L <sup>(1)</sup> (33.59µM)	<sup>(1)</sup> Wentao L. et al. 2014. <i>Tumour Biology.</i> 35 (9) 8883- 8891.
	Cisplatino	5.72 ± 0.02 µM <sup>(1)</sup> 2.49 ± 1.223 µg/ml <sup>(2)</sup> (8.37µM)	<sup>(1)</sup> Suberu J. et al. <i>Chem Med Chem</i> 2014, 9: 2791–2797 <sup>(2)</sup> Wawruszak A. 2015. <i>PLoS One Journal.</i> 10(11)
MDA-MB-231	Docetaxel	634.58 ± 92.4 nM <sup>(1)</sup>	<sup>(1)</sup> Taherian A. et al., 2012 <i>Iran J Basic Med Sci.</i> 15(1): 667-679
	Doxorrubicina	0.20 ± 0.06 mg/ml <sup>(1)</sup> (3680nM) 887.75 ± 65.26 nM <sup>(2)</sup>	<sup>(1)</sup> Samer A. et al., 2012. <i>Drug Desing. Develop. Therapy.</i> 7:25-3 <sup>(2)</sup> Takahasi. Et al. 2013. <i>International J. Oncol.</i> 43. 1985-1991
	5- Fluorouracilo	29.9 µmol/L <sup>(1)</sup>	<sup>(1)</sup> Takahasi et al. 2013. <i>International J. Oncol.</i> 43. 1985-1991
	Cisplatino	3.614 ± 0.740 mg/ml <sup>(1)</sup> (12.05µM) 2.0 µmol/L <sup>(2)</sup>	<sup>(1)</sup> Wawruszak A. 2015. <i>PLoS One Journal.</i> 10(11). <sup>(2)</sup> Takahasi. Et al. 2013. <i>International J. Oncol.</i> 43. 1985-1991

Valores de IC<sub>50</sub> teóricos de cada fármaco, se utilizaron para establecer los rangos de concentraciones experimentales para determinar los valores de IC<sub>50</sub> que se utilizarán para evaluar el efecto en la expresión de los transportadores de glucosa. ( ) Conversión de concentración a igualdad de unidades molar.



### ***Determinación de la concentración citotóxica 50 (IC<sub>50</sub>) experimental.***

Para establecer la concentración óptima a la cual se produjo menos del 50% de muerte en las células MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A, pero suficiente para inducir un cambio en la expresión de los transportadores de glucosa GLUTs y SGLT's, fue necesario determinar la IC<sub>50</sub> experimental, en nuestras condiciones de trabajo; ya que los fármacos utilizados para desarrollar en este proyecto, son los mismos que se utilizan en la terapia antineoplásica y el principio activo es acompañado de coadyuvantes, mismos que no están presentes en el fármaco o principio activo puro que se utilizó en todos los trabajos revisados.

Debido a lo anterior, se estableció un rango de concentración a evaluar para cada fármaco en relación a la IC<sub>50</sub> reportada, y se evaluó el efecto de cada concentración en los cultivos de las células MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A, durante 24 48 y 72 h, como se describe en cuadro 2.

**Cuadro 2.** Concentraciones experimentales evaluadas en los cultivos de células MCF-7 y MDA-MB-231.

<b>Fármaco</b>	<b>Concentraciones experimentales para MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A</b>
<b>Docetaxel (nM)</b>	50,100,250,500,750,1000,2500, 5000
<b>Doxorrubicina (nM)</b>	50,100,500,1000,1500,3000, 5000
<b>5-Fluorouracilo (µM)</b>	25,50,75,100,250, 500
<b>Cisplatino (µM)</b>	2.5,5,10,25,50,100,250 y 500

### ***Determinación de la concentración óptima de células para evaluar la IC<sub>50</sub> en un área de 0.32 cm<sup>2</sup> de multiplacas de 96 pozos de fondo plano.***

Las monocapas de células MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A con una confluencia del 80-90% se lavaron con una solución salina de fosfatos libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (PBS) y enseguida se incubaron durante 5-10 min con esta misma solución a 37°C. Las monocapas se subcultivaron mediante disgregación enzimática en



presencia de tripsina-EDTA (0.25%-0.5 mM) durante 5-10 min a 37°C y enseguida se re suspendieron una mezcla de medios de cultivos DMEM alta glucosa -F12 1:1 (DMEMhg-F<sub>12</sub>) complementado con 5% de suero de caballo, 15 mM Hepes, 2 mM de L-glutamina, 10 µg/ml de insulina bovina, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermoide, 100 ng/ml de toxina de cólera y 0.5 µg/ml de hidrocortisona para las células MCF-12A y el medio DMEM bajo en glucosa, complementado (DMEM-Ig comp) con 10% de suero bovino fetal, 15 mM Hepes y 2 mM de L-glutamina, para las células MCF-7 y MDA-MB-231. La suspensión celular se centrifugó a 400 g por 6 min para concentrar las células en una pastilla en el fondo del tubo y eliminar la tripsina en el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió cuidadosamente con ayuda de una micropipeta en 1 ml de medio DMEM-Ig y se determinó la viabilidad celular en presencia del colorante vital azul de tripán al 0.4%, en una dilución 1:4 mediante una cámara de Neubauer. La viabilidad celular no fue menor al 96% en cada experimento

Se prepararon 5 suspensiones celulares de cada línea con medio DMEM-Ig compuesto, ajustadas a  $5 \times 10^4$ ,  $10 \times 10^4$ ,  $25 \times 10^4$ ,  $50 \times 10^4$  y  $100 \times 10^4$  células/ml, y de cada concentración se sembraron 100 µl por triplicado, en pozos de poliestireno de 0.32 cm<sup>2</sup> de superficie plana cultivable (multiplacas de 96 pozos), para obtener  $5 \times 10^3$ ,  $10 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $50 \times 10^3$  y  $100 \times 10^3$  células/0.32cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en un ambiente saturado de humedad. El metabolismo mitocondrial celular se evaluó a las 24 h mediante el ensayo de MTS-PMS a 490 nm. La cuantificación del metabolismo mitocondrial celular se utilizó como una medida indirecta de la viabilidad celular. El ensayo se realizó en 3 ocasiones por triplicado. Con esta finalidad, después de 24 h de incubación, se agregaron 20 µl de una mezcla en proporción 20:1 de MTS: PMS a cada pozo con células en cultivo y a los pozos blanco que únicamente contenían medio de cultivo, para eliminar el desarrollo de color inespecífico. Las células se incubaron en estas condiciones experimentales durante 90 min a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en un ambiente saturado de humedad y enseguida el desarrollo de color se cuantificó midiendo la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para microplacas multimodal (CYTATION3

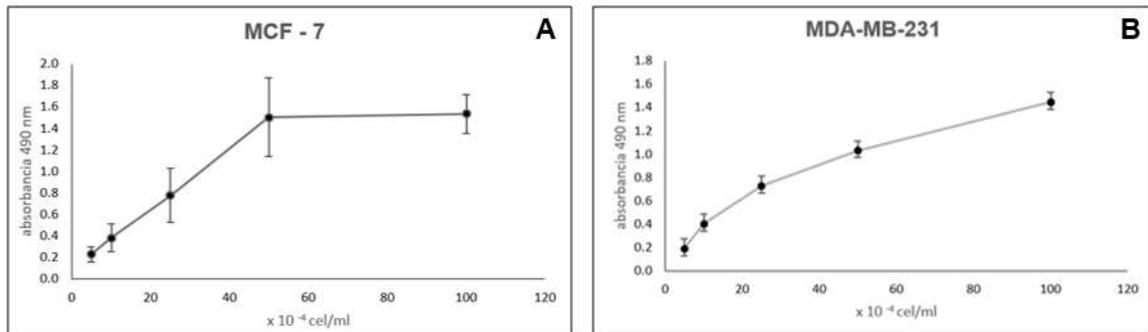


Imaging Reader, BioTek Inc.), y los resultados se representaron como el promedio  $\pm$  D.E. de la absorbancia a 490nm vs. concentración celular.

Se cuantificó la absorbancia a 490 nm como resultado de la actividad de los sistemas enzimáticos mitocondriales al transformar la sal de tetrazolio MTS (sustrato), en presencia del congénere PMS como catalizador, a Formazán, que es un producto hidrosoluble de color naranja-marrón. La formación de Formazán, fue directamente proporcional al desarrollo de color y en consecuencia a la absorbancia a 490 nm. Las células viables presentaron una alta actividad metabólica mitocondrial, por lo que la generación de Formazán y la intensidad del color marrón reflejó en la magnitud de la absorbancia.

La figura 1, muestra los resultados de la actividad metabólica de las células MCF-7 (figura 1A) y MDA-MB-231 (figura 1B). La absorbancia a 490 nm observó un incremento lineal hasta  $50 \times 10^3$  células/ $0.32 \text{cm}^2/100 \mu\text{l}$ ; posterior a esta concentración celular, es probable que se agota el sustrato (MTS) con respecto al número de células viables metabólicamente activas, por lo que ya no es posible mayor desarrollo del producto Formazán. Para experimentos posteriores, se utilizó una concentración de  $25 \times 10^3$  células/ $0.32 \text{cm}^2/100 \mu\text{l}$ , que se encontró dentro del rango lineal de la gráfica y la magnitud de la absorbancia a las 24 h permitió evaluar correctamente los cambios en la viabilidad celular en respuesta a la presencia de los fármacos antineoplásicos que se utilizaron en este trabajo.

**Figura 1.** Actividad metabólica mitocondrial de diferentes concentraciones de células MCF- 7 y MDA-MB-231.



La viabilidad celular de  $5 \times 10^3$  a  $10 \times 10^4$  células/ $0.32 \text{ cm}^2$ , fue cuantificada indirectamente como la actividad metabólica mitocondrial con el ensayo MTS-PMS a 490 nm, para determinar la concentración óptima de células necesaria para evaluar el efecto de los fármacos antineoplásicos;  $n=3$ , triplicados.

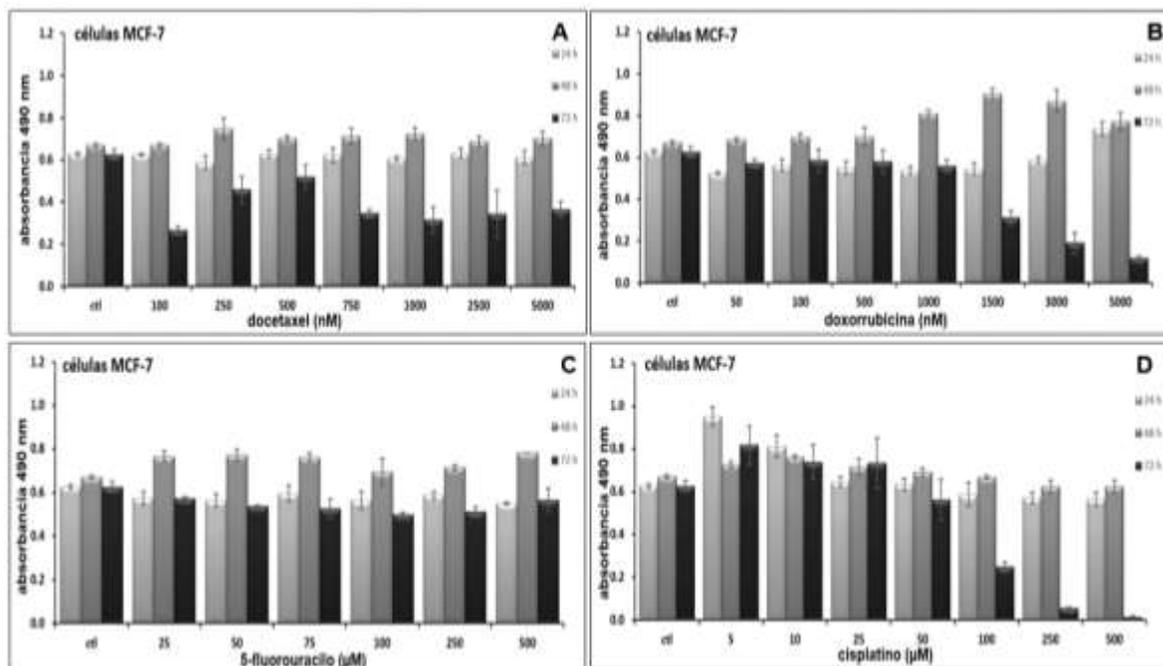
### **Concentración citotóxica 50 (IC<sub>50</sub>) experimental**

Las células MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A, se subcultivaron como se describió previamente y se ajustó la concentración a  $25 \times 10^4$  células/ml. Se sembraron  $25 \times 10^3$  células/ $0.32 \text{ cm}^2/100 \mu\text{l}$  y se incubaron durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  en un ambiente saturado de humedad. Después de este tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por los fármacos antineoplásicos preparados en medio de cultivo DMEM-Ig compuesto, a cada concentración especificada en el cuadro 2. Se incubaron durante 24, 48 y 72 h y al final de cada tiempo de incubación, se determinó la actividad metabólica mitocondrial mediante el ensayo de MTS-PMS a 490 nm.

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  D.E. de la absorbancia a 490 nm vs. concentración de fármaco. Se mostró el efecto dependiente de la concentración de los fármacos docetaxel, doxorubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino sobre la actividad metabólica mitocondrial cuantificada con el ensayo de reducción de MTS/PMS a 490 nm en las células MCF-7 (figura 2), MDA-MB-231 (figura 3) y MCF-12A (figura 4), a las 24, 48 y 72 h.

Cuando se evaluó el efecto de los fármacos antineoplásicos en la línea celular MCF-7, se observó que el docetaxel (figura 2A) parece disminuir la actividad metabólica mitocondrial a una concentración de 100 nM únicamente hasta las 72 h de incubación; mientras que la doxorubicina (figura 2B) a partir de 1500 nM a este mismo tiempo de incubación y el 5-fluorouracilo (figura 2D) parece no tener efecto sobre la actividad metabólica mitocondrial de las células MCF-7 en ninguno de los tiempos evaluado. La presencia de cisplatino pareció disminuir la actividad metabólica mitocondrial a partir de 100 nM únicamente después de 72 h de incubación.

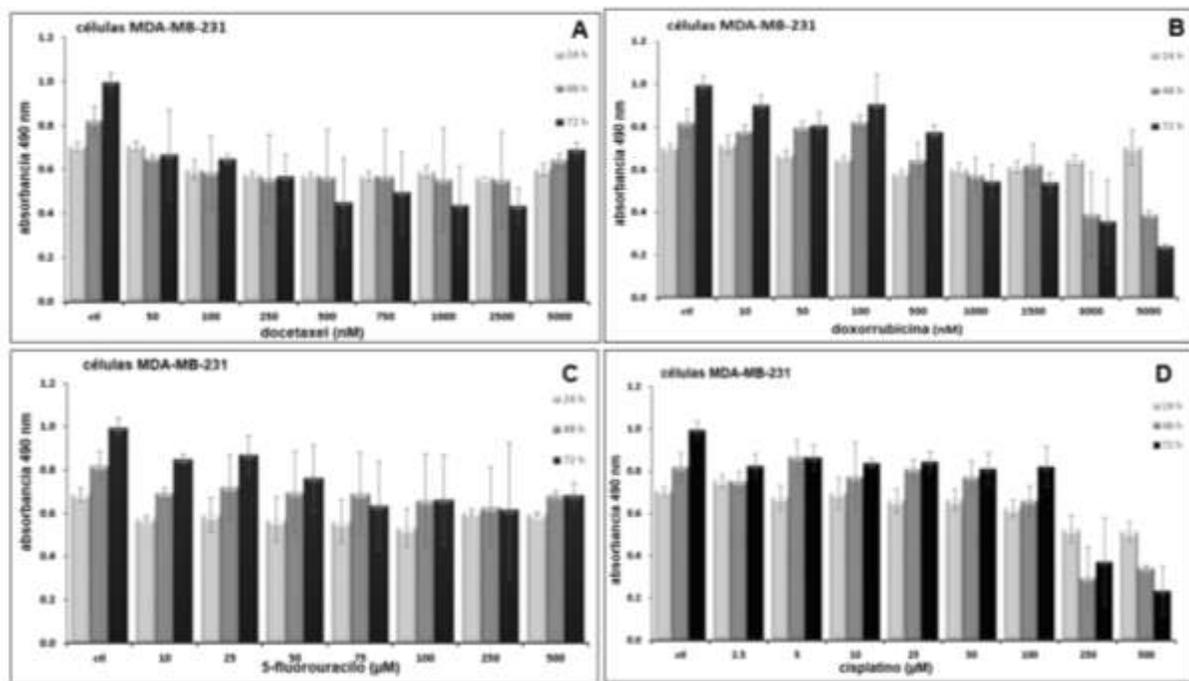
**Figura 2.** Efecto de los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapia del cáncer de mama sobre la actividad metabólica de las células MCF-7.



Las células se incubaron en presencia de A, docetaxel; B, doxorubicina; C, 5- fluorouracilo y D, cisplatino, durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  D.E. de la absorbancia a 490 nm vs la concentración del fármaco;  $n=1$ , triplicados.

El efecto de docetaxel (figura 3A) en la disminución de la actividad metabólica mitocondrial de las células MDA-MB-231 se observó desde 50 nM hasta las 72 h de incubación; y con doxorubicina (figura 3B) a partir de 500 nM desde las 48 h de incubación. La presencia de 5-fluorouracilo (figura 3C) pareció disminuir la actividad metabólica a las 48 y 72 h desde 10  $\mu$ M, mientras que en las células incubadas en presencia de cisplatino (figura 3D) este efecto se observó a partir de 250  $\mu$ M a las 24 y 48 h, y desde 2.5  $\mu$ M a las 72 h.

**Figura 3.** Efecto de los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapia del cáncer de mama sobre la actividad metabólica de las células MDA-MB-231.

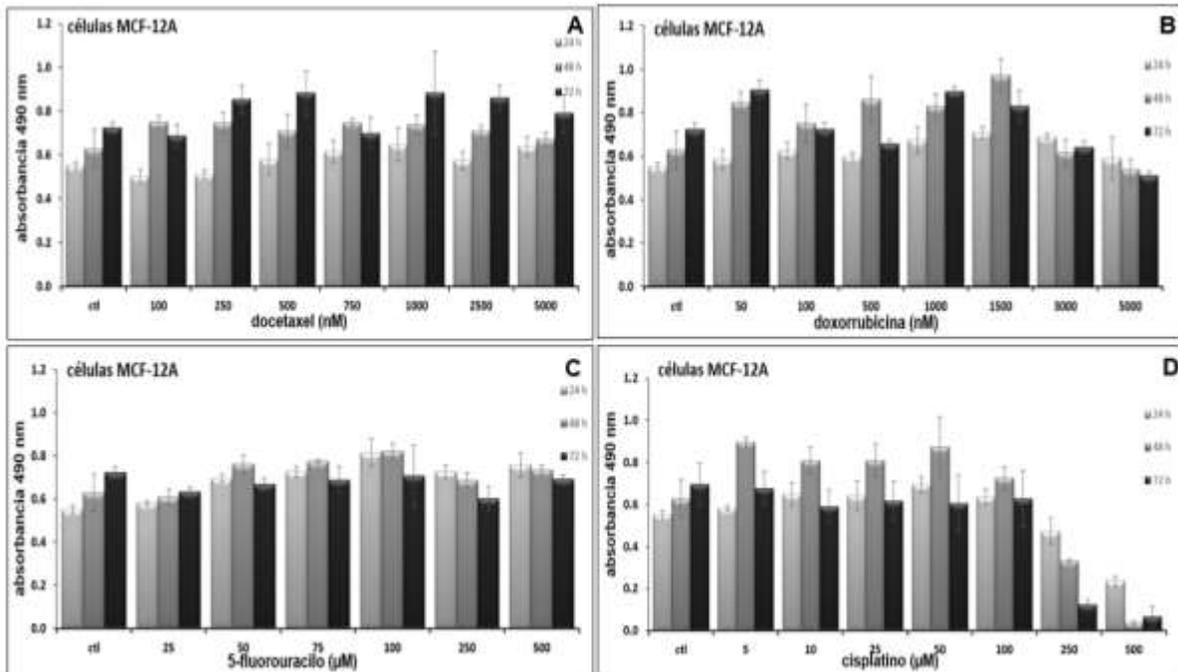


Las células se incubaron en presencia de A, docetaxel; B, doxorubicina; C, 5- fluorouracilo y D, cisplatino, durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  D.E. de la absorbancia a 490 nm vs la concentración del fármaco; n=1, triplicados.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el docetaxel y el 5-fluorouracilo (figura 4A y 4C) no modificó la actividad metabólica mitocondrial de las células MCF-12A a los tres tiempos de incubación evaluados. La doxorubicina (figura 4B) disminuyó la actividad metabólica mitocondrial a una concentración de 3000 nM, a partir de las 48 h de incubación. La figura 4D muestra como la presencia de

cisplatino disminuyó la actividad metabólica celular a 250 nM desde las 24 h de incubación y hasta las 72 h.

**Figura 4.** Efecto de los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapia del cáncer de mama sobre la actividad metabólica de las células MCF-12A.



Las células se incubaron en presencia de A, docetaxel, B, doxorubicina, C, 5-fluorouracilo y D, cisplatino durante 24, 48 y 72 h. Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  D.E. de la absorbancia a 490 nm vs. la concentración de fármaco;  $n=3$ , triplicados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó el efecto significativo del agente antineoplásico respecto a la actividad mitocondrial, a las 72horas, eligiéndose las concentraciones para las 3 líneas celulares, MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A de: para docetaxel 750 nM, para doxorubicina 1500 nM, para 5-flourouracilo 250µM y para cisplatino de 100 µM. Estas concentraciones serán las determinantes para los ensayos posteriores y evaluar la expresión de los GLUTs y SGLTs previo y posterior exposición del fármaco.



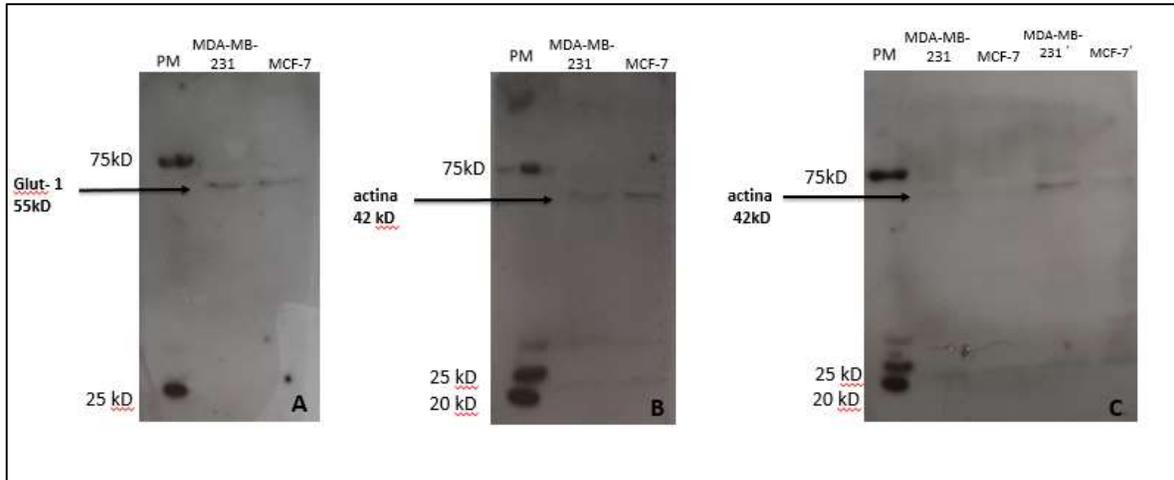
## Western blot

Los homogenados de las proteínas totales (20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de las células MCF-7 y MDA-MB-231 se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de 0.75mm a una concentración del 10% a 120-150 V durante 90 min. Enseguida, las proteínas se inmovilizaron en una membrana de polivinildifloruro (PVDF) con un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  a 8V por 25 min y se bloqueó la membrana con una solución de leche baja en grasa al 5% durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-Glut-1 diluido 1:600 (SCBT), anti-actina 1:800 o 1:1000 (SCBT), durante toda la noche en agitación continua, a 4°C.

Se eliminó el anticuerpo no unido a las proteínas específicas mediante el lavado de las membranas y enseguida se incubaron en presencia de un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano (HRP), anti-conejo 1:10.000 (SCBT) o anti-ratón 1:40,000 (Pierce) para Glut-1 o actina respectivamente, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Después de eliminar los anticuerpos secundarios no unidos, la presencia de las proteínas se reveló mediante una reacción de quimioluminiscencia en presencia del sustrato para la HRP luminol, durante 10 min a temperatura ambiente.

La figura 5A muestra el resultado del ensayo de western blot para identificar a las proteínas Glut-1 de 55 kD y  $\beta$ -actina como un control interno (42 kD) utilizando el anticuerpo específico diluido 1:800 (figura 5B) o 1:1000 (figura 5C), para determinar la dilución óptima que permitió identificar la proteína adecuadamente.

### Figura 5. Expresión de proteínas por western blot.



Las proteínas totales de los homogenados preparados de monocapas de células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron separados en geles SDS-PAGE, inmovilizados y marcados con anticuerpos específicos para **A**, Glut-1; **B**,  $\beta$ -actina dilución 1:800 y **C**,  $\beta$ -actina dilución 1:1000. Las imágenes son representativas de un experimento. PM: Peso molecular, kD: kilo Dalton.



## DISCUSIÓN.

A pesar de la existencia de un amplio número de análisis acerca de la fisiopatología y los factores que influyen en la evolución del diagnóstico de diabetes mellitus 2, hiperinsulinismo, obesidad, y la correlación negativa que estos factores influyen para los resultados y la obtención de un tratamiento eficaz contra el cáncer, aun no hay un protocolo de evaluación y tratamiento conjunto que apoyen a fármacos para estas patologías endocrinológicas como complemento en la terapia antineoplásica. Además, estas dos enfermedades son por lo general evaluadas por separado a pesar de terminar en un fin común que implica la salud del paciente.

Durante el desarrollo de este proyecto se evaluó inicialmente la identificación de las características morfológicas de cada línea celular (MCF-12A, MCF-7 y MDA.MB-231) y la implicación de cada subcultivo que se realizó, observando que, en cada uno los frascos de cultivo bajo un mismo tiempo (24, 48 o 72 h) y condición de incubación (5% de CO<sub>2</sub> y 37°C), claramente la morfología y el comportamiento fue distinto entre cada una de ellas. Por ejemplo, para la línea celular MDA-MB-231, el crecimiento para obtener una monocapas confluyente de 80 a 90% se observó a las 48- 72 horas, distinto al crecimiento y adhesión de las otras 2 líneas de trabajo, lo que condujo a plantear una explicación acerca de la mayor presencia de metástasis al diagnóstico que se hace con cáncer de mama del subtipo triple negativo, así como su respuesta a la quimioterapia y evolución.

En la práctica al exponer las tres líneas celulares a los cuatro fármacos antineoplásicos utilizados en este proyecto, el comportamiento individual en cada línea celular fue contrario a lo esperado. Este es un punto importante que enfatiza la importancia y la originalidad de la hipótesis planteada, que los antineoplásicos utilizados son los empleados en la quimioterapia convencional en nuestro medio. Es decir, los ensayos *in vitro* plantean cuestionamientos importantes en relación a la expectativa de aquellos que se realizan *in vivo* y dan una tasa de supervivencia por individuo. En los primeros hay un contacto directo del fármaco con las células neoplásicas lo que permite una difusión rápida al interior de la célula, no hay unión a proteínas plasmáticas por lo que prácticamente todo el fármaco está en forma libre, consideramos el modelo como un sistema aislado con variables controladas



en estado estacionario. En tanto en los segundos, existen los mecanismos de difusión, metabolismo y excreción del fármaco, así como la llamada fracción libre y la fracción unida a proteínas plasmáticas

En apoyo a lo anterior, en la literatura revisada para determinar la  $IC_{50}$  experimental, todos los fármacos antineoplásicos eran calidad reactivo con una pureza mayor a 95%, es decir son concentrados puro, situación distinta a la de los fármacos comerciales para el empleo *in vivo*, siendo este un punto de ventaja o desventaja para el desarrollo posterior y los resultados obtenidos, sin embargo, la decisión de emplearlos fue para apegarnos a la realidad de lo actualmente utilizado y la disposición de los mismos. Por otro lado, hay que recordar que, en los estudios de eficacia farmacológica, antes de los estudios preclínicos de las fases 1-4, se utilizan en el tamizaje cultivos de células con los compuestos puros y la preparación farmacéutica para desde este punto ir confirmando mecanismos de acción a nivel celular sobre la célula neoplásica y posibles efectos tóxicos o mutagénicos en células control de la misma estirpe, pero sin el mecanismo neoplásico.

Al trabajar con en la exposición de los antineoplásicos en sus distintas concentraciones, los resultados observados se correlacionaron a uno de los estudios más completos y similar al plan de trabajo realizado, el publicado por *Koehn and Col.*, en el cual, se trabajó con las mismas 3 líneas celulares pero con un solo fármaco; que fue doxorubicina, a 2 tiempos de trabajo similar (24 y 48h), su resultados fueron: para las líneas celulares de MCF-12A y MDA-MB-231, la disminución de la apoptosis de éstas en exposición al antineoplásico, fue favorecido por la identificación de proteínas reguladores en la reparación de la doble cadena de ADN, la cuales fueron: Rad 51 y topoisomerasa II, y su expresión no fue afectada, a pesar de las concentraciones de fármaco utilizado y el tiempo indicado, contrariamente lo planteado para la línea celular MCF-7, que si disminuía la actividad metabólica celular produciendo apoptosis de las mismas, y claramente la disminución de la expresión de estas proteínas reparadoras, concluyendo que este factor puede corresponder a la implicación de otras proteínas como p53 y TGF, exclusivas para esta línea celular y que estas pueda influir en la expresión de Rad



51 para su supervivencia (29). Lo anterior explica algunos de los resultados obtenidos en este trabajo.

Dentro de los procedimientos experimentales de este proyecto, al realizar observaciones de las placas de cultivo y a su vez en los pocillos por medio de microscopía de contraste de fases, se observó que, en cada una de las concentraciones de trabajo indicadas previamente, de los 4 fármacos, hubo cierta discordancia entre lo observado y los resultados arrojados por el espectrofotómetro. Por ejemplo, al exponer las 3 líneas celulares a docetaxel y cisplatino, se observó que las células expuestas a mayor concentración de estos antineoplásicos, las células perdían su morfología inicial, resultado de menor viabilidad celular, desde las primeras 24 horas de exposición para docetaxel y en las 48 horas de exposición para cisplatino, es decir no coincidieron con los resultados obtenidos al realizar la medición por medio de densidad óptica con el espectrofotómetro y el efecto medido, no eran los esperados a los observados al momento con el microscopio, sin embargo hay más uniformidad cuando se analizan los triplicados. En este mismo sentido de trabajo, para los fármacos doxorrubicina y 5-fluorouracilo, los resultados fueron totalmente distintos comparados a los otros 2 fármacos, ya que se observó muy poca influencia de estos antineoplásicos inclusive a altas concentraciones, en relación la morfología celular que apoya para apoptosis y la viabilidad de la actividad mitocondrial medida, y que a pesar de la misma concentración y mayor tiempo (48h) se observó microscópicamente una mejoría morfológica de las mismas, siendo totalmente inesperable para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-12A, por lo que en apoyo a la literatura consultada, surge la evaluación de otros factores que aún no se encuentran descritos y que influyen para propiciar estos resultados, o serán las misma proteínas ya descritas que se asocian a la reparación celular y que a pesar del tiempo de exposición a los quimioterapéuticos, su concentración u el mismo fármaco propicien un ambiente no perjudicial para las células neoplásicas y no neoplásicas como el caso de MCF-12A.

A pesar de que este proyecto la propuesta de la exposición de los fármacos fue individualmente a ciertas concentraciones y para cada línea celular, totalmente distinto a lo empleado *in vivo*, donde los esquemas son combinación de múltiples



quimioterapéuticos, esto pudiera ser una pauta y explicación inicial para apoyar a explicar que otras implicaciones y comportamientos *in vitro* se pueden obtener, dando pie para otras líneas de investigación que complemente los huecos que se han generado con este proyecto y otras investigaciones.



## LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.

### Limitaciones:

- 1) El tiempo de crecimiento *in vitro* en cada subcultivo es variable para obtener la densidad celular deseada.
- 2) Al ser un estudio *in vitro* no se reflejan las condiciones del macroambiente *in vivo*.
- 3) El vehículo de los fármacos antineoplásicos es desconocido ya que usamos las preparaciones comerciales.
- 4) El efecto *in vitro* de los fármacos antineoplásicos aisladamente es más evidente que el efecto *in vivo*.
- 5) Los estudios con modelos experimentales en laboratorio son más sofisticados y requieren de una dedicación mayor de tiempo para el control de variables y la obtención de resultados homogéneos y reproducibles, a diferencia de los estudios *in vivo* en los cuales, a pesar de las diferencias interindividuales, cualquier cambio significativo, aunque no sea uniforme es válido incluso en una muestra pequeña de pacientes.

### Fortalezas:

- 1) El estudio incluyó cuatro fármacos antineoplásicos de uso convencional actualmente en la quimioterapia para cáncer de mama.
- 2) Se estudian mecanismos novedosos con un potencial terapéutico prometedor.
- 3) El uso concomitante de fármacos hipoglucemiantes e inhibidores de la captura de glucosa en la quimioterapia podría ser una herramienta útil que aumente la eficacia del tratamiento del cáncer de mama.
- 4) Se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de mama que representan los subtipos más frecuentes del mismo.
- 5) El estudio incluyó 3 tiempos (24, 48 y 72h) de exposición para los antineoplásicos, determinantes para observar un cambio en la viabilidad celular, tiempos muy similares en los cuales se obtiene la eficacia máxima de



la quimioterapia *in vivo* ya que después de estos tiempos disminuye la concentración por mecanismos de metabolismo y excreción.

### **Perspectivas:**

- 1) Este trabajo abre posibilidades más amplias de estudio, ya que es claro que estados de hiperglucemia se asocian con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer y disminución de la eficacia de la quimioterapia, por lo que es necesario explorar otros fármacos que afectan el metabolismo intra y extracelular de glucosa como probables agentes terapéuticos en el tratamiento de cáncer de mama.
- 2) El estudio de las vías de señalización que utilizan la transcripción y expresión de los transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) son probables blancos farmacológicos.
- 3) La posibilidad de la participación de otras proteínas para aumentar la viabilidad celular en presencia del antineoplásico puede ser investigado.
- 4) Para validar este estudio es necesario reproducirlo *in vivo* en modelos murinos experimentales.
- 5) En un futuro poder relacionar estos estudios experimentales con los resultados de ensayos clínicos controlados.



## **CONCLUSIONES.**

Inicialmente, el presente ensayo abre nuevas posibilidades de estudio para los mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos y su relación con los transportadores de glucosa y el balance oxidativo mitocondrial. Al mismo tiempo ofrece modelos experimentales *in vitro* muy apropiados para el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama. El uso individual y combinado de los fármacos antineoplásicos en estos modelos es relativamente rápido, confiable y seguro, aunque relativamente costoso para nuestro país. Adicionalmente se pueden proponer estudios experimentales *in vivo* (modelos murinos) para probar la eficacia de los mismos.

En seguida iniciamos un enlace que puede fortalecer la llamada farmacología traslacional en la cual se integran técnicas experimentales básicas con problemas clínicos que afectan a una gran parte de la población de nuestro país como es el cáncer de mama y la diabetes tipo 2.

Finalmente, las técnicas utilizadas en esta tesis ofrecen herramientas y conocimiento extra a la terapia génica que se ha propuesto en los últimos años para el tratamiento del cáncer, ya que sería posible estudiar los mecanismos de acción y vías de señalización involucrados en la activación o silenciamiento de genes en los diferentes tipos de cáncer por medio del uso de líneas celulares modificadas genéticamente y establecer *in vitro* parámetros de seguridad biológica.



## BIBLIOGRAFÍA.

1. World Health Assembly. Cancer.[internet]. [Consultado Mayo 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Cancer.net. American Society of clinical oncology (ASCO). Junta Editorial de Cancer.net, 2017 04[cited 2018 May 14]. Available from:<http://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/estadisticas>
3. Castrezana M. Geografía del cáncer de mama en México. Invest Geog. 2017; 93:1-17.
4. Lai I., Chou C.,Lai P.,et al. Targeting the Warburg effect with a novel glucose transporter inhibitor to overcome gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell. Carcinogenesis. 2014;(10):2203-2013.
5. Argolo D. The Impact of obesity on Breast Cancer. Current Oncology reports.2018;20:18.
6. Barone B.,Yea H. Snyder C., et al. Long term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta analysis. JAMA.2008;(23):2754-2764.
7. Goodwin P.,Ennis M. et al. Fasting insulin and outcome in early stage breast cancer: results of prospective cohort study. JClin Oncol.2002;(1):42-51.
8. Bowers L.,Rossi E.,O'Flanagan C., et al. The Role of the insulin/IGF System in cancer: Lessons Learned from Clinical trials and the Energy Balance cancer link. Front Endocrinol. 2015;(6):15.



9. Barron C., Bilan P., Tsakiridis T., et al. Facilitative glucose transporters: implication for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*.2016;65 (2): 124-139.
10. Young T., Park J. Hyperglucemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J*.2014; 38:330-336.
11. Tang H., Dai Q., Shi W. et al. SGLT2 inhibitors and risk of cancer in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetologia* 2017; 60:1862–1872.
12. Kizeslak A., Wojak K. Expression of GLUT 1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancer. *Pathol. Oncol. Res*.2012;18: 721-728.
13. Agnol C., Giani S., Metabolic Syndrome and breast cancer risk: A case cohort study nested in a multicenter Italian cohort. *PLOST ONE* [internet] 2015 [consultado 9 mayo 2018]; 10.1371. Disponible en:
14. Kocdor M., Kocdor H., Progressive increase of glucose transporter 3 (GLUT-3) expression in estrogen -induced breast carcinogenesis. *Clin Trasl Oncol*. 2013;15 (1): 55-64.
15. Long Chen C., Show J., Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF 1 $\alpha$ , GLUT 1 and CAIX. *Upchows Arch*.2010; 457: 53-61.
16. Cheng Y., Tingjin Y., CAIX is upregulated in CoCl<sub>2</sub> induced hypoxia and associated with cell invasive potential and poor prognosis of breast cancer. *International Journal of Oncology*. 2016;48: 271-280.
17. Federación Mexicana de Diabetes, A.C. Diabetes en México. IDF Diabetes Atlas 7° ed. 2014 Oct 2. [cited 2018 May 14] Available from: [fmdiabetes.org/diabetes en México/](http://fmdiabetes.org/diabetes%20en%20M%C3%A9xico/)



18. Sonnenblick A., Agborfan D., Impact of diabetes, insulin, and metformin use on the outcome of patients with Human Epidermal Growth factor receptor 2 positive primary Breast Cancer: Analysis from the ALTTO phase III. Randomized trial. *J. Clin Oncol.* 2017; 35: 1421-1429.
19. Nasiri A., Rodrigues M., Li Z., et al. SGLT2 inhibitions slows tumor growth in mice by reversing hyperinsulinemia. *Cancer & metabolism.* 2019;7: 2-13.
20. Shlomal G., Neel B., Type 2 diabetes mellitus and cancer: The role of pharmacotherapy. *J Clin Oncol.* 2016; 34: 4261-4269.
21. Ferroni P., Riondino S., Type 2 Diabetes and Breast Cancer the Interplay between impaired glucose metabolism and oxidant stress. *Oxidative medicine and celular Longevity* [internet] 2015 [consultado 4 mayo 2018] Disponible en: <http://www://dx.doi.org/10.1155/2015/183928>
22. Keating E. Antimetabolic effects of polyphenols in Breast Cancer cells: focus on glucose uptake and metabolism. *Front Nutr.* 2018;(5):25.
23. Lazic S. What exactly is “N” in cell culture and animal experiments?. *Plos Biol.* 16(4)[internet] 2018 [consultado 23 Mayo 2018] Disponible en: <http://doi.org/10.137q/journal.pbio.2005282>
24. Thorens B., Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;(2):141-145.
25. Mi Woo Y., Shin Y. Inhibition of aerobic glycolysis represses Akt/mTOR/ HIF 1a Axis and restores tamoxifen sensitivity in antiestrogen- resistant breast cancer cells. *PLOST ONE.* 2015; 1: 234-245.
26. Jie Lu L., Wong R., On the status and comparison of glucose intolerance in female Breast cancer patients at initial diagnosis and during chemotherapy through and oral glucose tolerance test. *PLAOST ONE.* 2014;(9):93630.



27. Wellberg E., Johnson S., The glucose transporter GLUT1 is required for ErbB2- induced mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Research*. 2016; 18: 131.
28. Villani L., Smith B., The diabetes medication Canaglifozin reduces cancer cell proliferation by inhibiting mitochondrial complex- I supported respiration. *Molecular Metabolismo*. 2016 (5): 2048- 1056.
29. Koehn H., Magan N., Isaacs R et al. Differential regulation of DNA repair protein Rad51 in human tumour cell lines exposed to doxorubicin. *Anti-Cancer Drugs*. 2007;18 (4): 419-425.
30. Freshney R. *Culture Animal of cells*. 6th ed. New Jersey: Wiley Blackwell;2010.
31. Cell Titer 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB169, Promega Corporation.
32. Suberu J., Romero-Canelón I., Sullivan N., et al. Comparative Cytotoxicity Artemisinin and Cisplatin and Their Interactions with Chlorogenic Acids in MCF7 Breast Cancer Cells. *ChemMedChem*. 2014;9: 2791-2797.
33. Samer H., Mothanna A., Mohd H., et al. Hippuric acid nanocomposite enhances doxorubicin and oxaliplatin-induced cytotoxicity in MDA-MB231, MCF-7 and Caco2 cell lines. *Dovepress*. 2013;7:25-31.
34. Teherian A., Mazoochi t. Different Expression of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) 1/2 and Phospho-Erk Proteins in MBA-MB-231 and MCF-7 Cells after Chemotherapy with Doxorubicin or Docetaxel. *Iran J Basic Med Sci*. 2012; 15 (1): 669-677.
35. Li W., Zhai B., Zhi H., et al. Association of ABCB1,  $\beta$  tubulin I, and III with multidrug resistance of MCF7/DOC subline from breast cancer cell line MCF7. *Tumor Biol*. 2014;35(9): 8883-8891.
36. Hsun S., Ming T., Ting H., A Critical Dose of Doxorubicin Is Required to Alter the Gene Expression Profiles in MCF-7 Cells Acquiring Multidrug Resistance. *PLOS ONE*. 2015;10 (1):1-24.



37. Wawruszak A., Luszczki J., Grabarska A., et al. Assessment of Interactions between Cisplatin and Two Histone Deacetylase Inhibitors in MCF7, T47D and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines- An Isobolographic Analysis. *PLOS ONE*. 2015; 10 (11):1-19.
38. Takahashi K., Takana M., Inagaki A., et al. Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. *International Journal of Oncology*. 2013;43: 1985-1991.
39. Moreira L., Araujo I., Costa T. et al, Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Experimental Cell Research*. 2013;319: 1784-1795.
40. Siebeneicher H., Bauser M., Butchmann B., et al. Identification of novel GLUT inhibitors. *Bioorg Med. Chem. Lett*. 2016;26: 1732-1737.
41. Wuest M., Hamann I., Bouvet V., et al. Molecular Imaging of GLUT1 and GLUT5 in breast cancer: A Multitracer Positron Emission Tomography Imaging study in Mice. *Mol Pharmacol*. 2018; 93:79–89.
42. Halminton J., Doudna J., Knocking out barriers to engineered cell activity. *Science*. 2020; 10:1-3.

## ANEXOS.

### ANEXO 1. VARIABLES

**Cuadro 3.** Descripción de las características de las variables a evaluar

**Cuadro 3A:** Variables dependientes

Variable Dependiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
<b>GLUT 1</b>	Expresión de ARNm	Un mínimo de 25% sobre el valor control	Densidad óptica	Continua
<b>GLUT 2</b>	Expresión de ARNm	Un mínimo de 25% sobre el valor control	Densidad óptica	Continua
<b>GLUT 3</b>	Expresión de ARNm	Un mínimo de 25% sobre el valor control	Densidad óptica	Continua
<b>GLUT 4</b>	Expresión de ARNm	Un mínimo de 25% sobre el valor control	Densidad óptica	Continua
<b>SGLT 1</b>	Expresión de ARNm	Un mínimo de 25% sobre el valor control	Densidad óptica	Continua
<b>SGLT 2</b>	Expresión de ARNm	Un mínimo de 25% sobre el valor control	Densidad óptica	Continua

**Cuadro 3B:** Variables independientes

Variable Independientes				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
<b>Docetaxel</b>	Antineoplásico tipo taxano	Exposicional Si o No	Nanomol	Dicotómica
<b>Doxorrubicina</b>	Antineoplásico tipo antraciclina	Exposicional Si o No	Nanomol	Dicotómica
<b>5-Fluorouracilo</b>	Antineoplásico tipo análogo uracilo	Exposicional Si o No	Micromol	Dicotómica
<b>Cisplatino</b>	Antineoplásico tipo platino	Exposicional Si o No	Micromol	Dicotómica

### Cuadro 3C. Variables Controladas

<b>Variable Controladas</b>				
<b>Variable</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Valores posibles</b>	<b>Unidades</b>	<b>Tipo de variable</b>
<b>Glucosa</b>	Sustrato para transportador	5 a 25 milimolar	molar	Dicotómica
<b>Temperatura</b>	Magnitud de energía aplicada	37 grados °C	Grados centígrado Celsius	Continua
<b>Humedad relativa</b>	Cantidad de vapor	95%	Unidad porcentual	Fija
<b>Presión parcial de bióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>)</b>	Presión de aire atmosférico	5%	Unidad porcentual	Fija

### Cuadro 3D. Variables Confusoras

<b>Variable Confusoras</b>				
<b>Variable</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Valores posibles</b>	<b>Unidades</b>	<b>Tipo de variable</b>
<b>Genotipo particular</b>	Mutación o alteración en genes	De acuerdo a cada línea celular		Cualitativo
<b>Desdiferenciación en cultivo</b>	Pérdida de propiedades originales	De acuerdo a cada línea celular		Cualitativo
<b>Resiembra</b>	Número de reproducción para cada línea celular, desde el cultivo original.	1 a 10	Número enteros	Continua



## **ANEXO 2. DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS**

El grupo de estudio comprendió la comparación de monocapas con tratamiento versus monocapas sin tratamiento.

La densidad óptica se cuantificó automáticamente con un foto documentador que reportó en unidades de densidad óptica (D.O.) por área seleccionada ( $\mu\text{m}^2$ ) de los patrones de expresión. La densidad óptica de la muestra problema (D.O.P.) se dividió por la densidad óptica de la proteína control (D.O.C.), de manera que  $D.O.P/D.O.C = D.O$  en unidades estándar. Con este parámetro se calculó el aumento en la expresión de la proteína transportadora. Los resultados se expresaron en promedio más menos la desviación estándar ( $\mu \pm D. E., n = 6$ ) para cada uno de los grupos tratados y no tratados.

### **Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A.**

En primer término, se identificó la morfología característica de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-12A en diferentes etapas de crecimiento en frascos de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  o placas de 60 mm.

Las células MCF-7, fueron sembradas a una densidad de  $0.5-2 \times 10^6$  cel/ml a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  en un ambiente saturado de humedad, y se observó el desarrollo de la monocapa hasta alcanzar el 80-90% de confluencia, durante al menos 72 h. Durante las primeras 24 h de incubación, las células se observaron ligeramente redondeadas y refringentes, así como morfología distinta (figura 6A). Después de 48 h, las células proliferaron y formaron grupos o colonias en las que se mantuvo la morfología principalmente triangular y fusiforme (figura 6B). Después de 72 h de incubación, los grupos o islas de células presentaron una morfología característica romboide con agrupación geométrica entre las células (figura 6C).

### Figura 6. Cultivo celular MCF-7



*A*, las células sembradas a baja densidad ( $2.5 \times 10^5 / 25 \text{cm}^2$ ) a las 24 h se observaron ligeramente redondeadas, refringentes y algunas con una morfología triangular o de media luna (flecha, 20X). *B*, A las 48 h, se formaron grupos o colonias que mantuvieron la morfología principalmente triangular y fusiforme (20X). *C*, A las 72 h, los grupos o islas de células expresaron una morfología de tipo romboide con agrupación geométrica entre ellas, característica de las células MCF-7 (20X).

La línea celular MDA-MB-231, fueron subcultivadas a una densidad de  $0.5 - 2 \times 10^6$  cel/ ml y se observó el desarrollo de una monocapa 80-90% confluyente durante 24 a 36 h. Se observó una morfología celular en forma de huso durante las primeras 24 h y un crecimiento con alargamiento bilateral (figura 7A). A las 48 h, las células se observaron más alargadas con características fibroblastoide, un núcleo con nucléolos distintivos y gránulos intracitoplasmáticos (figura 7B). Cuando las células alcanzan el 80% de confluencia, algunas de ellas adquirieron una morfología redondeada, refringente debido a la mayor densidad celular (figura 7C).

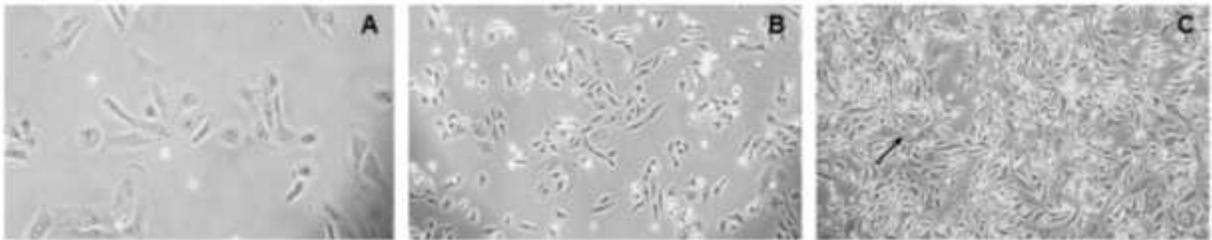
### Figura 7. Cultivo celular MDA-MB-231



*A*, Las células MDA-MB-231 mostraron una morfología en forma de huso a las 24 h, se observó el núcleo y un crecimiento con alargamiento del citoplasma bilateral (20X). *B*, A las 48 h, las células proliferaron rápidamente y se observó de manera más clara el núcleo y los nucléolos, así como gránulos intracitoplasmáticos. *C*, Las células mostraron una morfología principalmente de tipo fibroblasto y algunas más redondeadas y con mayor refringencia (flecha).

La línea celular MCF-12A, fue subcultivada, a una densidad de  $0.5- 2 \times 10^6$  cel/ml y se observó el desarrollo de una monocapa 80-90% confluyente durante a partir de las 72 h. En las primeras 24 h se observaron las células con una morfología epitelial y algunas aún con forma redondeada refringente (figura 8A). A las 48 h, se observaron algunas de forma alargada y en proceso de proliferación (figura 8B). Después de las 72 h, se observó la formación de monocapa en forma de islas y la confluencia se alcanzó después de 5 días (figura 8C).

**Figura 8.** Cultivo celular MCF-12A.



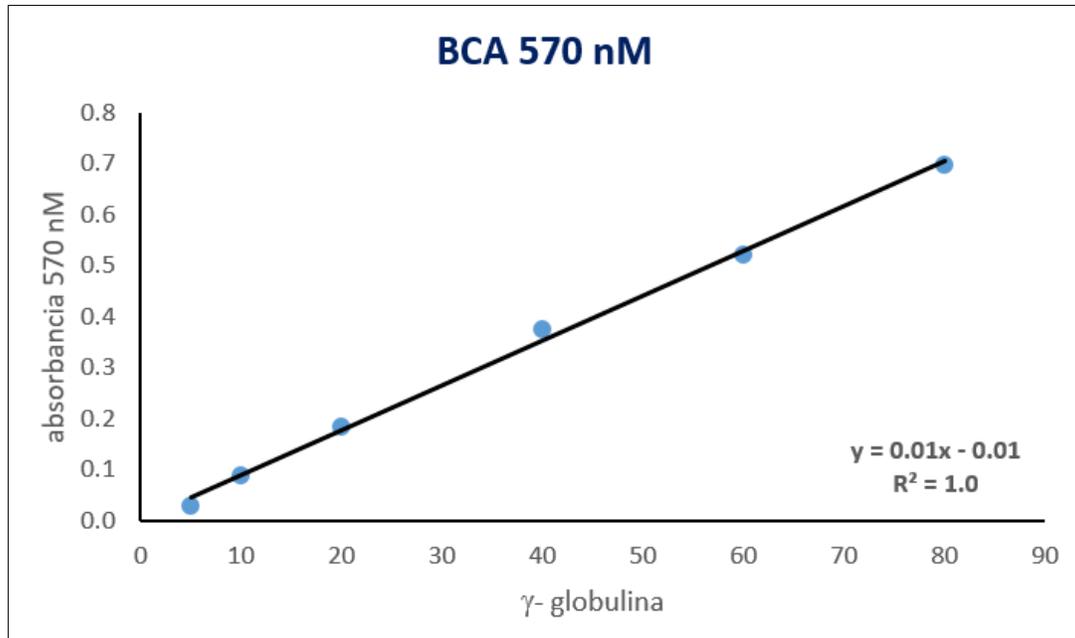
*A, Las células MCF-12-A, mostraron una morfología principalmente epitelial a las 24 h. B, A las 48 h, las células se observaron con prolongaciones citoplasmáticas y en proliferación (flecha). C, las células iniciaron la formación de monocapas aisladas a partir de las 72 h.*

### **Micrométodo de ácido bicinconínico**

Para verificar la capacidad y precisión de trabajo con micro muestras, se realizaron 5 ensayos de cuantificación de la concentración de proteínas, mediante el micrométodo espectrofotométrico del ácido bicinconínico determinado a una absorbancia de 570 nm. Con esta finalidad, se elaboró en cada ocasión una curva de calibración con concentraciones de proteínas establecidas.

Cada punto en la curva se analizó por triplicado, en 5 ocasiones, durante 3 días diferentes. Los resultados se expresaron como el promedio de la absorbancia de cada triplicado de cada concentración de proteínas  $\pm$  desviación estándar y se analizaron mediante una gráfica de absorbancia 570 nm vs. concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) y se determinaron los parámetros  $m$  (pendiente),  $b$  (ordenada al origen) para establecer la ecuación de la recta y el valor de  $R^2$  ( $\geq 0.99$ ) para determinar la linealidad del ensayo (figura 9).

**Figura 9.** Cuantificación de la concentración de proteínas con el método espectrofotométrico del ácido bicinconónico (BCA).



*Curva de calibración estándar para la cuantificación de proteínas, para este micrométodo se utilizó IgG sérica bovina como estándar.*

### Viabilidad Celular: Método MTS-PMS

Este método determina el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales o cultivos primarios de células normales, este ensayo se basó en la reducción metabólica del Bromuro (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (Formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas fue proporcional a la cantidad de Formazán producido.

El porcentaje de Viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{D.O células tratadas} \times 100 / \text{D.O. células control}$$

Para cada ensayo fue indispensable realizarlo mínimo por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (sustancia que de antemano se



conozca su poder citotóxico) y células no tratadas las cuales deben dar una lectura de D.O. mayor o igual a 1. Los valores de comparación se hicieron sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento ( $IC_{50}$ ) en las células tratadas con los agentes específicos, y la placa se leyeron en un espectrofotómetro a 490 nm de absorbancia.



### ANEXO 3. ACREDITACIÓN DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR



Subcomisión Mixta de Higiene y Seguridad  
Facultad de Medicina UASLP  
Oficio: SS&H2015ENE29JFMM  
San Luis Potosí, SLP  
a 29 de enero del 2015

DR. J. FLAVIO MARTINEZ MORALES  
LABORATORIO DE FARMACOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA UASLP

Por este conducto le informo que derivado de la evaluación de bioseguridad que se llevo a cabo el día 9 de julio del 2014 a las 11:00 hrs en el Laboratorio de Farmacología bajo su responsabilidad, la Subcomisión Mixta de Higiene y Seguridad encontró que dicho laboratorio **ACREDITO** las normas básicas de seguridad biológica correspondientes a las actividades investigación que realiza. Se le recomienda continuar reforzando la disciplina de seguridad en dicho laboratorio y estudiar los comentarios que anexamos a la presente y que incluyen Observaciones, Recomendaciones y Puntos que requieren resolución inmediata. Encuentre anexo a esta carta una copia del formato de evaluación y autoevaluación (en caso de que no lo hayan regresado) correspondiente a su visita de acreditación.

Agradezco su apego a las recomendaciones de la Subcomisión de Higiene y Seguridad de la Facultad de Medicina de la UASLP y a las disposiciones de la Ley General de Salud en materia de investigación en salud. La acreditación de bioseguridad asentada en este documento tiene una vigencia de tres años a partir de la fecha de emisión. Su próxima visita de acreditación tendrá lugar a principios del año 2018.

Atentamente,

  
*Dr. Christian A. García Sepúlveda MD PhD*  
Secretario Técnico de la Subcomisión de Higiene y Seguridad  
Laboratorio de Genómica Viral y Humana  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí



Venustiano Carranza 2405  
P 78210 - San Luis Potosí, S.L.P.  
tel. (444) 826 2344 al 49  
H Dirección (444) 826 2350  
fax (444) 826 2352  
www.uaslp.mx

c.c.p. - Secretario General de la Facultad de Medicina UASLP



## ANEXO 4. AUTORIZACIÓN DE ATCC.

**ATCC**

10801 University Blvd  
Manassas, VA 20110-2209  
(703)365-2700

**FAXSIMILE COVER SHEET**

---

**From:** Name: New Accounts/GH  
Fax Number:  
Voice Phone:

**To:** Name: Universidad Autonoma de San Luis Potosi  
Company: Attn: Dr. Martinez  
Fax Number: 0115248176976,.....1455  
Voice Phone: Acct. Notification

**Fax Notes:**

---

Thank you for your interest in ATCC!

Your institution already has an account established with us.  
Your ATCC customer account number is 120928. Please reference  
your ATCC customer account number on all correspondences.

Thank you again and we look forward to doing business with you!

Sincerely,  
Gwan Harrington  
ATCC-New Accounts

---

Date and time of transmission: Sat 06/09/01 12:35PM  
Number of pages including this cover sheet: 01

---



## ANEXO 5. APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN DE POSGRADO



HOSPITAL CENTRAL  
"DR. IGNACIO  
MORONES PRIETO"

San Luis Potosí, S.L.P., a 25 de julio de 2018

**Dr. Óscar de Jesús Pérez Ramírez, Investigador principal**  
**Dra. Rubí Janday Nájera Andrade, Tesista**  
**PRESENTE.-**

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado "Efecto de los agentes antineoplásicos en la expresión de transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama", fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 17 CI 24 028 093, así como por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427, y fue dictaminado como:

### APROBADO

El número de registro es **60-18**, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a ambos comités.

La vigencia de ejecución de este protocolo es por 1 año a partir de la fecha de emisión de este oficio, de igual forma pido sea tan amable de comunicar a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación; la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe técnico final.

\*Se le recuerda que todos los pacientes que participen en el estudio deben firmar la versión sellada del formato de consentimiento informado.

Atentamente

  
**Dra. Ma. Del Píjar Fonseca Leal**  
Sub-Directora de Educación e Investigación en Salud  
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"



C.C.P. Archivo



## ANEXO 6. RE APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN DE POSGRADO



HOSPITAL CENTRAL  
 "DR. IGNACIO  
 MORONES PRIETO"

San Luis Potosí, S.L.P., a 13 de agosto de 2019

Dr. Jesús Flavio Martínez Morales, Director de Tesis  
 Dr. Óscar de Jesús Pérez Ramírez, Investigador Principal y Responsable en  
 Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

Título del Protocolo:	"Efecto de los agentes antineoplásicos en la expresión de transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama"
Registro en Comité:	60-18
Fecha de Aprobación:	25 de julio de 2018

Por medio de la presente me permito informarle que el Comité de Investigación ha recibido y revisado el avance actual del protocolo incluido en su carta con fecha 06 de agosto de 2019.

Otorgamos su re-aprobación con vigencia al 25 de julio de 2020.

Atentamente,



13 AGO 2019

**COMITE INVESTIGACIÓN**

Dr. Juan Manuel López Quijano  
 Presidente del Comité de Investigación  
 Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto

c.c.p. Archivo



## ANEXO 7. APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



HOSPITAL CENTRAL  
"DR. IGNACIO  
MORONES PRIETO"

San Luis Potosí, S.L.P., a 25 de julio del 2018

**Dr. Óscar de Jesús Pérez Ramírez, Investigador principal.**  
**Dra. Rubí Janday Nájera Andrade, Tesista.**  
Departamento de Medicina Interna  
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"  
PRESENTE.

Estimado Investigador:

Por este conducto se le comunica que el protocolo de investigación titulado: **"Efecto de los agentes antineoplásicos en la expresión de transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama"**, fue evaluado por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución, con registro con registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427. El dictamen para este protocolo fue el siguiente:

### APROBADO

El Comité de Ética en Investigación autoriza la vigencia de ejecución de este protocolo por 365 días naturales a partir de la fecha de emisión de este oficio de dictamen.

El investigador principal deberá comunicar a este Comité la fecha de inicio y término del proyecto, y presentar el informe final correspondiente. Asimismo, el Comité de Ética e Investigación podrá solicitar información al investigador principal referente al avance del protocolo en el momento que considere pertinente.

Atentamente,

*Emmanuel Rivera L*  
**Dr. Emmanuel Rivera López**  
Presidente del Comité de Ética en Investigación  
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"



c.c.p. Archivo, Subdirección de Educación e Investigación, Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

Av. Venustiano Carranza No. 2395  
Zona Universitaria  
San Luis Potosí, S.L.P. C.P. 78290  
Tel. 01 (444) 198-10-00  
www.hospitalcentral.gob.mx  
www.slp.gob.mx



## ANEXO 8. RE APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



HOSPITAL CENTRAL  
 "DR. IGNACIO  
 MORONES PRIETO"

San Luis Potosí, S.L.P., a 13 de agosto de 2019

Dr. Jesús Flavio Martínez Morales, Director de Tesis  
 Dr. Óscar de Jesús Pérez Ramírez, Investigador Principal y Responsable en  
 Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

Título del Protocolo:	"Efecto de los agentes antineoplásicos en la expresión de transportadores de glucosa (GLUTs y SGLTs) y la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama"
Registro en Comité:	60-18
Fecha de Aprobación:	25 de julio de 2018

Por medio de la presente me permito informarle que el Comité de Ética en Investigación ha recibido y revisado el avance actual del protocolo incluido en su carta con fecha 06 de agosto de 2019.

Otorgamos su re-aprobación con vigencia al 25 de julio de 2020.

Atentamente,

*Emmanuel Rivera L.*  
**Dr. Emmanuel Rivera López**  
 Presidente del Comité de Ética en Investigación  
 Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto



c.c.p. Archivo