UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN MÉDICO CIRUJANO

DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL

EFECTOS DE FÁRMACOS ANTI-GLUCÉMICOS SOBRE LA VIABILIDAD Y CICLO CELULAR EN LÍNEAS CELULARES T47D DE CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN MÉDICO CIRUJANO

PRESENTA:

M. P. S. S. KENIA MARÍA VILCHIS ALMAZÁN

DIRECTORA DE TESIS

PH. D. IRAZÚ CONTRERAS GARCÍA

CO - DIRECTOR

PH. D. JOSÉ ANTONIO ESTRADA GUADARRAMA

REVISORES DE TESIS

DR. EN I. M. RIGOBERTO OROS PANTOJA
DR. EN C. I. LUIS ÁNGEL ZAPI COLÍN

TOLUCA, MÉXICO; SEPTIEMBRE DE 2026

Índice

Título....4
Resumen....5
1. Introducción....6
2. Marco teórico....8
2.1 Generalidades del cáncer de mama....8
2.2 Ciclo celular y su regulación normal....9
2.3 Mecanismo de proliferación celular en condiciones normales....11
2.3.1 Alteraciones en la regulación del ciclo celular en cáncer de mama....12
2.3.2 Alteraciones en los mecanismos de la proliferación celular en cáncer de mama....13
2.4 Generalidades de diabetes Mellitus tipo 2 y riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama....15
2.5 Fármacos hipoglucemiantes....17
2.5.1 Metformina: generalidades farmacológicas y sus efectos sobre la proliferación y ciclo celular....17
2.5.2 Insulina: generalidades farmacológicas y sus efectos en el ciclo celular del cáncer de mama....19
2.6 Generalidades de la línea célular T47D....20
3. Planteamiento del problema....22
4. Justificaciones....24
5. Hipótesis....25
5.1 Hipótesis nula....25
5.2 Hipótesis alterna....25
6. Objetivos....26
6.1 Objetivo general....26
6.2 Objetivos específicos....26
7. Metodología....27
7.1 Tipo de estudio....27
7.2 Universo de trabajo....27
7.3 Método de muestreo....27

7.4 Tamaño de muestra 27
7.5 Criterios de inclusión y exclusión 27
7.6 Desarrollo del proyecto 28
8. Variables de estudio 28
9. Material y métodos 30
a. *Cultivo celular T47D de mama* 30
b. *Tratamiento con insulina y metformina* 30
c. *Viabildad celular: colorante cristal violeta* 31
d. *Determinación de células en ciclo celular por medio de citometría de flujo* 32
e. *Análisis estadístico* 32
Implicaciones éticas 33
Financiamiento 34
10. Resultados 35
11. Tablas, figuras y leyendas de figuras 39
12. Discusión 42
13. Referencias bibliográficas 50

Título

Efectos de fármacos anti-glucémicos sobre la viabilidad y ciclo celular en líneas celulares T47D de cáncer de mama

Resumen

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres a nivel mundial y constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer. La coexistencia con diabetes mellitus tipo 2 es cada vez más común, por lo que resulta relevante comprender el efecto de los fármacos hipoglucemiantes sobre la biología tumoral. La insulina puede favorecer la proliferación celular mediante la activación de las vías PI3K/AKT/mTOR y MAPK, mientras que la metformina ha demostrado efectos antiproliferativos asociados con la activación de AMPK y la inhibición de mTOR. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la metformina, la insulina y su combinación sobre la viabilidad y el ciclo celular de células T47D de cáncer de mama *in vitro*. Para ello, las células fueron tratadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de metformina, insulina y la combinación de ambos fármacos. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de cristal violeta por espectrofotometría y el análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo con tinción de yoduro de propidio. Los resultados mostraron que la metformina disminuyó significativamente la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración, mientras que la insulina no produjo cambios significativos respecto al grupo control. La combinación de metformina e insulina también redujo la viabilidad celular, aunque su efecto fue menor que el observado con la metformina sola. Asimismo, el análisis del ciclo celular evidenció alteraciones compatibles con un efecto antiproliferativo inducido por la metformina. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la metformina ejerce un efecto antitumoral sobre células T47D, mientras que la insulina, en las condiciones evaluadas, no modifica significativamente la proliferación celular. Estos resultados respaldan el potencial de la metformina como estrategia coadyuvante en el tratamiento del cáncer de mama y justifican la realización de estudios adicionales para precisar sus mecanismos de acción.

1. Introducción

El cáncer de mama constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial debido a su elevada incidencia, morbilidad y mortalidad, mayoritariamente en mujeres (1). A pesar de los avances en el diagnóstico temprano y en las estrategias terapéuticas, esta neoplasia continúa representando un desafío clínico y biológico, particularmente por su heterogeneidad molecular y su capacidad de adaptación a distintos estímulos hormonales y metabólicos. La progresión del cáncer de mama se caracteriza por una proliferación celular descontrolada, alteraciones en la regulación del ciclo celular y la evasión de los mecanismos de apoptosis, procesos que están estrechamente relacionados con la activación aberrante de diversas vías de señalización intracelular (2).

En las últimas décadas, se ha reconocido que el desarrollo y la progresión del cáncer no dependen exclusivamente de alteraciones genéticas intrínsecas de la célula tumoral, sino también del contexto metabólico sistémico del organismo. En este sentido, la diabetes mellitus tipo 2 ha sido identificada como una comorbilidad frecuente en pacientes con cáncer de mama y se ha asociado con un mayor riesgo de aparición y peor pronóstico de la enfermedad. Estados metabólicos caracterizados por hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina generan un ambiente favorable para la activación de vías proliferativas, influyendo directamente sobre el comportamiento biológico de las células tumorales (3–5).

La insulina, además de su función central en el metabolismo de la glucosa, actúa como una hormona con propiedades mitogénicas capaces de estimular la proliferación celular y la progresión del ciclo celular mediante la activación de receptores de insulina y factores de crecimiento. Estas señales convergen en rutas intracelulares como PI3K/AKT/mTOR y MAPK/ERK, las cuales desempeñan un papel clave en la regulación del crecimiento, la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis. Asimismo, la hiperinsulinemia se ha relacionado con un aumento en la biodisponibilidad de estrógenos, lo que potencia la proliferación de células de cáncer de mama con receptores hormonales positivos (6,7).

Por otro lado, los fármacos utilizados para el control glucémico, particularmente la metformina, han despertado un creciente interés en el ámbito oncológico debido a sus efectos pleiotrópicos. Diversos estudios han sugerido que la metformina no solo mejora el control metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, sino que también puede ejercer efectos antitumorales mediante la modulación de vías involucradas en la proliferación celular, el ciclo celular y la apoptosis. Estos efectos se atribuyen tanto a mecanismos directos sobre la célula tumoral, como la activación de la vía AMPK y la inhibición de mTOR, como a mecanismos indirectos relacionados con la disminución de la insulinemia y del estímulo mitogénico sistémico (8–10).

A pesar de la evidencia acumulada, los efectos específicos de los fármacos anti-glucémicos sobre la proliferación celular y la regulación del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de mama no se encuentran completamente claros. Por ello, resulta relevante profundizar en el estudio de estos fármacos en modelos experimentales *in vitro*, que permitan analizar de manera controlada su impacto sobre proliferación celular.

En este contexto, el presente trabajo tiene como propósito evaluar el efecto combinado de la insulina y la metformina sobre la proliferación y el ciclo celular en líneas celulares de cáncer de mama *in vitro*, este estudio experimental podría aportar evidencia relevante que respalde el potencial papel de los fármacos hipoglucemiantes como moduladores del comportamiento proliferativo de las células de cáncer de mama.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad que se caracteriza por el desorden de células que se dividen de manera anormal, generando alteraciones fisiológicas y daño al organismo, capaces de migrar e invadir tejidos independientes a la de su origen. Es el cáncer más común en mujeres en el mundo, con alta importancia epidemiológica por su elevada morbilidad y mortalidad (1).

A nivel mundial, el cáncer de mama constituye el cáncer más frecuentemente diagnosticado entre las mujeres. De acuerdo con las estimaciones más recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), durante 2024 se diagnosticaron aproximadamente 2.4 millones de nuevos casos de cáncer de mama y se registraron alrededor de 694,000 defunciones por esta enfermedad. Asimismo, se estimó que 8.2 millones de mujeres vivían con un diagnóstico de cáncer de mama en 2024, lo que refleja la importante carga global de esta enfermedad, común en países con mayores ingresos económicos, relacionándose con la globalización, el nivel de educación, el nivel socioeconómico, las condiciones ambientales, hábitos alimenticios, estilo de vida y otras prácticas culturales (11).

En el 2024, el cáncer de mama fue la primera causa de muerte por malignidad; el 99.2% ocurrió en mujeres. La tasa de defunción en las mujeres mayores de 20 años fue de 18.7 muertes por cada 100 mil diagnosticada con cáncer de mama (12).

Existen diversos factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama, involucrando una serie de eventos genéticos y ambientales que en conjunto propician la aparición de células tumorales. En general, constan de factores hormonales, genéticos y ambientales. La predisposición genética es el factor de riesgo principal y más importante asociado al desarrollo de cáncer de mama, relacionado a mutaciones en uno de los alelos de las células germinales, secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) de los genes *atm*, *brca1, brca2, chek2 y palb2*, genes que tienen la capacidad de regular el crecimiento de células cancerosas, mejor conocidos como genes supresores de tumores (13).

Los factores ambientales también juegan un papel importante; entre ellos, se ha descrito que la obesidad y la inactividad física, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 alteran la actividad celular (14).

El cáncer de mama se clasifica según la afectación de la membrana basal en invasivos: lobulillar invasor o ductal infiltrante, y no invasivos: carcinoma ductal *in situ* o carcinoma lobulillar *in situ* (15).

Estos, a su vez, se clasifican respecto a sus características moleculares, dependiente de las expresiones genéticas que posee la célula cancerosa y su comportamiento biológico: luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo, siendo este un aspecto relevante en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del paciente (16,17).

2.2 Ciclo celular y su regulación normal

El ciclo celular es un proceso biológico estrictamente regulado, indispensable para la adecuada división y proliferación celular. Este proceso involucra la replicación del ADN, con la división de cromosomas y material genético de forma equivalente entre cada célula hija (18). Este proceso consta de 4 fases secuenciales, controladas principalmente por dos mecanismos reguladores indispensables: la fosforilación de proteínas específicas por las quinasas dependientes de ciclina (CDK) y su desfosforilación por fosfatasas (19).

Estos mecanismos reguladores aseguran que las células que sufren algún daño en el ADN en las fases iniciales no avancen hacia las fases finales, lo que da oportunidad de reparar el ADN o impedir la replicación de las células, llevándolas a apoptosis, para prevenir la propagación de células con alteraciones genómicas (18).

El ciclo celular se compone de varias fases, las cuales están estrechamente reguladas en condiciones fisiológicas (20).

En términos generales, las fases del ciclo celular son descritas como:

- Fase G_0: corresponde a la fase de quiescencia; el ciclo celular se encuentra detenido temporal o permanentemente. Las células no proliferan activamente

y se enfocan en llevar a cabo sus funciones especializadas propias que las distinguen. Muchas células permanecen en G0 durante largos periodos y solo bajo ciertos estímulos mitogénicos pueden reingresar al ciclo celular (21).

- Fases G_1, S, G_2: son las etapas de interfase.

    - Fase G_1: la célula experimenta crecimiento celular, síntesis activa de proteínas y evaluación del entorno extracelular, incluyendo la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento.
    - Fase S: ocurre la replicación del ADN, asegurando que cada célula hija reciba una copia completa del material genético.
    - Fase G_2: funciona como una etapa de preparación final para la mitosis, en la que se verifica que la replicación del ADN haya sido completa y correcta, y se sintetizan proteínas necesarias para la división celular. A lo largo de estas fases, se activan puntos de control del ciclo celular que supervisan la integridad del ADN, el tamaño celular y la correcta progresión del ciclo, permitiendo detener el proceso en caso de daño genético o condiciones desfavorable (20).

- Fase M (mitosis o meiosis): En esta fase ocurre la división celular propiamente dicha, la cual incluye la segregación equitativa de los cromosomas duplicados y la citocinesis, dando lugar a dos células hijas genéticamente idénticas en la mitosis. La mitosis es un proceso altamente regulado que garantiza la estabilidad genética de las células resultantes (22).

Para que las transiciones entre las fases del ciclo celular ocurran, se involucran funciones de proteínas reguladoras del ciclo celular, como las CDK's específicas, por ejemplo: CDK1/CDK2 transiciona de G2 a mitosis y CDK2/CDK4/CDK6 transicionan de la fase G1 a S. Dentro de este proceso, otro grupo de proteínas conocidas como ciclinas forman complejos con moléculas CDK específicas en sus respectivas fases: CDK4/6 – ciclina D y CDK2 – ciclina E para la fase G1, CDK1/2 – ciclina A para la fase S y CDK1 – ciclina B y A para la transición G2-mitosis, respectivamente (23). La figura 1 muestra el ciclo celular que ilustra las fases G_1, S, G_2 y M, así como los puntos

de control que regulan la progresión celular. Estos puntos de control permiten verificar la integridad del ADN y la adecuada replicación del material genético.

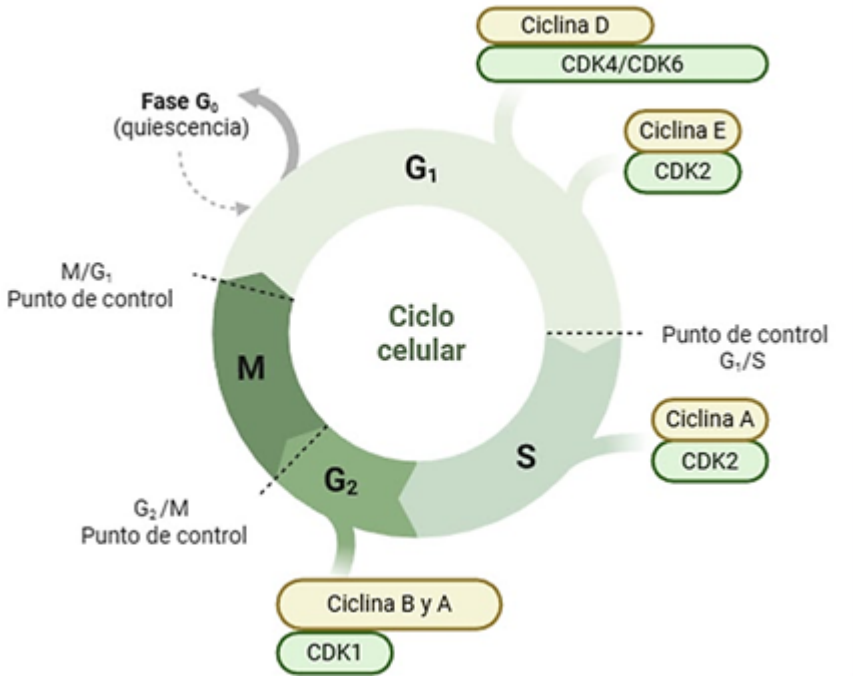


Figura 1. Fases del ciclo celular y su regulación normal. Modificado en http://www.biorender.com (24)

2.3 Mecanismo de proliferación celular en condiciones normales

El mecanismo de proliferación celular depende de factores de crecimiento, los cuales desempeñan un papel vital para que el proceso de lleve a cabo correctamente. Un mal funcionamiento de estas cascadas de señalización puede con frecuencia producir cáncer (25).

Estos factores de crecimiento tienen como propósito regular diversas funciones de las células mediante diversos receptores que se encuentran en las superficies celulares, los cuales en conjunto forman complejos que activan múltiples vías de señalización para que interactúen entre sí y formar una red de señalización, que finalmente se integran para controlar, iniciar o detener la transcripción de genes específicos y a su vez regular las funciones celulares, como la migración celular, la supervivencia celular y la diferenciación celular (26).

La proliferación celular es un proceso altamente dependiente de señales extracelulares, principalmente de factores de crecimiento y del estado metabólico de la célula. Estas señales convergen en cascadas de transducción que regulan la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular. Cuando estos mecanismos se encuentran alterados, como ocurre en el cáncer, la célula adquiere la capacidad de proliferar de manera autónoma e independiente de los controles fisiológicos normales (27).

2.3.1 Alteraciones en la regulación del ciclo celular en cáncer de mama

En el cáncer de mama, las células cancerosas surgen de una sola célula, que se ha transformado en maligna debido a alteraciones genéticas o alteraciones en los complementos reguladores, lo que resulta en una división celular no controlada. Estas señales son consecuencia de aberraciones genéticas y epigenéticas en genes que se encargan de regular el ciclo celular (2).

La progresión hacia la mutación de las células requiere de alteraciones en genes oncogénicos y genes supresores de tumores. En cáncer de mama, resultan de gran importancia las ciclinas A, B, C, D1 y E, las CDK y sus inhibidores: p16 (inhibidor de CDK, relevante en la patología de mama), p21 (detiene fase G1), y p53 (una versión mutada no responde adecuadamente por el estrés oncogénico lo que resulta en la transformación celular) (28).

La correcta regulación del ciclo celular es un requisito indispensable para el control de la proliferación celular. En condiciones fisiológicas, la progresión ordenada a través de las fases del ciclo celular permite la renovación tisular y el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, en el contexto del cáncer, las alteraciones en los puntos de control del ciclo celular favorecen la entrada continua a fase S y la división celular sostenida, lo que se traduce en un aumento de la proliferación celular. Por ello, el análisis del ciclo celular constituye una herramienta fundamental para comprender los mecanismos que regulan la proliferación en el cáncer de mama (29,30).

2.3.2 *Alteraciones en los mecanismos de la proliferación celular en cáncer de mama*

El cáncer de mama se considera una enfermedad heterogénea cuyo desarrollo y progresión dependen de numerosas anormalidades somáticas, genéticas y moleculares, las cuales tienen como consecuencia el mal funcionamiento y activación de cascadas de señalización que regulan la diferenciación celular, el crecimiento celular, la apoptosis e incluso la metástasis (31).

En condiciones fisiológicas normales, estas vías de señalización se encuentran en estrecho control; sin embargo, en el cáncer de mama, estas vías pueden activarse de manera constitutiva por mutaciones, amplificaciones génicas o por interacciones anómalas entre receptores de membrana y factores de crecimiento (32).

Dentro de estas alteraciones, las vías de señalización desempeñan un papel fundamental, ya que regulan procesos como la proliferación, la supervivencia, la angiogénesis y la resistencia al tratamiento. La mayor parte de la activación anómala de estas rutas se debe a mutación en oncogenes, pérdida de genes supresores de tumor o a la sobreexpresión de receptor en la membrana celular (13).

Las vías de señalización más relevantes en el proceso fisiopatológico del cáncer de mama se encuentran las mediadas por los receptores hormonales de estrógeno y progesterona, los receptores de la familia HER/EGFR, y cascadas fosfatidilinositol 3-cinasa/proteína quinasa B/complejo mTOR (PI3K/AKT/mTOR) y MAPK/ERK, las cuales poseen una importante relación en el desarrollo de la enfermedad (33).

Los receptores de hormonas progesterona y estrógeno son factores de transcripción nuclear, que al activarse por sus ligandos hormonales inducen la expresión de los genes que desempeñan un papel crucial en la proliferación celular, la regulación del crecimiento celular y la supervivencia, dando a la célula la capacidad de neoplasia y evasión de apoptosis. La mayoría de los tumores de cáncer de mama son positivos a receptores de progesterona y estrógeno, denominados luminales (2).

La señalización del receptor de progesterona y estrógeno pueden interactuar con otras vías de señalización, como PI3K/AKT y MAPK/ERK, permitiendo su activación incluso en ausencia de estrógenos, favoreciendo la progresión tumoral (33).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) y su homólogo EGFR son miembros de la familia de los receptores de tirosina cinasa, junto con HER3 Y HER4, responsables de transmitir señales de proliferación y diferenciación celular (34).

La vía PI3K/AKT/mTOR es la ruta alterada más frecuentemente en el cáncer de mama, ya que es parte esencial en la regulación del crecimiento, la supervivencia y el metabolismo celular (35).

La vía MAPK/ERK se activa principalmente a través de la unión de factores de crecimiento a receptores de tirosina cinasa, como HER2 y EGFR. Esta cascada de señalización se desarrolla mediante la activación secuencial de RAF, MEK y ERK, lo que conduce a la transcripción de genes involucrados en la proliferación, diferenciación y migración celular (2).

La malignidad del cáncer está determinada por dos mecanismos biológicos: la infiltración y la metástasis. La progresión tumoral necesita de un microambiente que brinde las características necesarias para que el crecimiento tumoral avance de manera sostenida. Este microambiente está formado por matriz extracelular, células tumorales y no tumorales, quimiocinas, factores de crecimiento, y redes de señales mediadas por citocinas, elementos que controlan la comunicación entre las células individuales que hacen capaz la progresión tumoral (36).

Dado que muchas de las vías de señalización alteradas en el cáncer de mama responden a estímulos metabólicos y hormonales, las condiciones sistémicas que modifican el metabolismo de la glucosa adquieren especial relevancia en la progresión tumoral. Entre estas condiciones, la diabetes mellitus tipo 2 se ha asociado con un ambiente metabólico caracterizado por hiperglucemia e hiperinsulinemia, factores capaces de modular directamente la activación de vías proliferativas en células mamarias (37).

2.4 Generalidades de diabetes Mellitus tipo 2 y riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un conjunto de alteraciones metabólicas multisistémicas caracterizadas principalmente por hiperglucemia crónica, como consecuencia de un defecto progresivo en la secreción de insulina y/o de la resistencia tisular a esta hormona (3).

Se trata de una enfermedad crónica altamente prevalente que afecta a más de 400 millones de personas a nivel mundial, cuya incidencia continúa en aumento debido al envejecimiento poblacional, el sedentarismo y los cambios en los hábitos alimentarios. En México, en 2023 se reportó una prevalencia de 18.4%, posicionándose como la segunda causa de muerte y una de las principales causas de discapacidad en el país (38).

En los últimos años, un creciente número de estudios epidemiológicos ha demostrado que la DM2 se asocia con un mayor riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. Metaanálisis de estudios de cohorte y casos y controles han reportado que las mujeres con DM2 presentan entre un 20 y 25% más riesgo de desarrollar cáncer de mama, en comparación con mujeres sin diabetes, incluso tras ajustar por factores como edad, obesidad y estado menopáusico (3,4).

Asimismo, la presencia de DM2 se ha relacionado con un peor pronóstico, mayor riesgo de recurrencia tumoral y un incremento en la mortalidad específica por cáncer de mama (8).

En la diabetes mellitus, uno de los principales eventos fisiopatológicos es la presencia de hiperglucemia en el espacio extracelular, acompañada paradójicamente de una disminución en la captación intracelular de glucosa en tejidos dependientes de insulina. En condiciones fisiológicas, la entrada de glucosa a la célula ocurre a través de transportadores específicos (GLUT), los cuales pueden ser dependientes o independientes de insulina. La captación y la liberación de la glucosa en el hígado involucra al transportador GLUT2. En tejidos como músculo esquelético y tejido adiposo, la captación de glucosa depende principalmente del transportador GLUT4, en cerebro predomina el transportador GLUT3 (39).

La asociación entre DM2 y cáncer de mama puede explicarse por múltiples mecanismos fisiopatológicos interrelacionados. Uno de los principales es la hiperinsulinemia crónica, característica temprana de la DM2, que ejerce efectos mitogénicos directos e indirectos. La insulina puede unirse a su receptor y, en condiciones de hiperinsulinemia, también activar el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), promoviendo la activación sostenida de vías de señalización intracelular como PI3K/AKT/mTOR y MAPK, las cuales están estrechamente relacionadas con la proliferación celular, la supervivencia celular, la inhibición de la apoptosis y la progresión del ciclo celular (40,41).

Además, la hiperinsulinemia reduce la producción hepática de la globulina fijadora de hormonas sexuales, lo que incrementa la biodisponibilidad de estrógenos circulantes. Este fenómeno es particularmente relevante en el cáncer de mama, ya que los estrógenos estimulan la proliferación de células tumorales con receptores hormonales positivos, favoreciendo el crecimiento tumoral y la progresión de la enfermedad (42). Este efecto es más evidente en mujeres posmenopáusicas, donde el tejido adiposo y el entorno metabólico juegan un papel central en la producción y disponibilidad de estrógenos (32).

Por otro lado, la hiperglucemia crónica propia de la DM2 contribuye a la generación de un microambiente tumoral favorable mediante el aumento del estrés oxidativo, la inflamación sistémica de bajo grado y la producción de especies reactivas de oxígeno. Estos procesos pueden inducir daño al ADN, inestabilidad genómica y activación de rutas proinflamatorias que favorecen la angiogénesis, la invasión tumoral y la progresión del cáncer. Adicionalmente, la disponibilidad elevada de glucosa puede ser aprovechada por las células cancerosas para sostener su alto requerimiento energético y biosintético (43,44).

La DM2 también representa una comorbilidad frecuente en pacientes con cáncer de mama, ya sea por los mecanismos metabólicos inherentes a la enfermedad o por el uso de tratamientos hipoglucemiantes, incluyendo la administración exógena de insulina. En este contexto, se ha planteado que ciertos tratamientos antidiabéticos podrían modular el riesgo, la progresión tumoral o la respuesta terapéutica, lo que ha generado un creciente interés en el estudio de su impacto biológico más allá del control glucémico (4,45).

2.5 Fármacos hipoglucemiantes

Considerando la estrecha relación entre metabolismo, señalización proliferativa y progresión del ciclo celular, los fármacos hipoglucemiantes han despertado un creciente interés en el ámbito oncológico, resaltando entre ellos la metformina y la insulina endógena. En particular, se ha propuesto que estos fármacos pueden modular el ciclo celular en cáncer de mama, ya sea mediante la alteración del ambiente metabólico sistémico o a través de efectos directos sobre vías intracelulares clave (46,47).

2.5.1 Metformina: generalidades farmacológicas y sus efectos sobre la proliferación y ciclo celular

La metformina (1,1-dimetilbiguanida, $C_4H_{11}N_5$) es un derivado sintético de las biguanidas, desarrollada a partir de compuestos naturales presentes en la planta *Galega officinalis*, utilizada desde la Edad Media por sus propiedades hipoglucemiantes. Su forma farmacéutica más común es el hidrocloruro de metformina ($C_4H_{11}N_5HCl$), un sólido cristalino blanco, altamente soluble en agua y de baja liposolubilidad, características que determinan su absorción y distribución en el organismo. Fue sintetizada por primera vez en 1922 y descrita clínicamente en 1957 por Jean Sterne, quien demostró su eficacia para reducir los niveles de glucosa. Desde su aprobación en la década de 1990, se ha convertido en el fármaco oral más prescrito para la diabetes tipo 2 y ha despertado interés por sus efectos pleiotrópicos, incluyendo propiedades antienvejecimiento y antitumorales (48).

La metformina es un fármaco utilizado de primera línea para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Los mecanismos exactos de acción terapéutica de la metformina aún no se comprenden por completo; sin embargo, se han mencionado algunos a lo largo de su descubrimiento, considerando al hígado como principal órgano involucrado en sus efectos (49).

La metformina tiene como función reducir las concentraciones de glucosa plasmática. Actúa disminuyendo el proceso de la gluconeogénesis en el hígado, evitando la producción excesiva de glucosa (9).

Este fármaco ejerce sus efectos principalmente a nivel intracelular tras su entrada mediada por transportadores de cationes orgánicos (OCT), especialmente OCT1 en hepatocitos y OCT2 en células renales. Debido a su naturaleza hidrofílica y su carga positiva a pH fisiológico, no puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, por lo que depende de estos transportadores para ingresar a la célula (50).

Una vez en el interior, la metformina se acumula en la mitocondria, donde inhibe parcialmente el complejo I de la cadena respiratoria, lo que conduce a una disminución en la producción de ATP y un aumento relativo de AMP. Este cambio en el estado energético activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), promoviendo la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el aumento de la captación de glucosa. En individuos sanos, estos efectos son más sutiles debido a la homeostasis metabólica intacta, pero reflejan el mismo mecanismo farmacológico fundamental descrito en condiciones patológicas (51).

La metformina, en pacientes que ya tienen un diagnóstico establecido de diabetes mellitus tipo 2, mejora la sensibilidad a la insulina y reduce la hiperinsulinemia, mientras que, de manera independiente, activa la vía AMPK, lo que inhibe la lipogénesis y estimula la β-oxidación de los ácidos grasos (8).

En tejidos periféricos, aumenta el uso de la glucosa; reduce la ingestión de alimentos, regulando el apetito y aumentando la saciedad, así como el aumento de la absorción intestinal de la glucosa (9).

El uso de la metformina se ha visto como un posible fármaco útil en el tratamiento oncológico del cáncer de mama. Diversos estudios demuestran que la metformina posee efectos proapoptóticos, promoviendo la detención del ciclo celular mediante el aumento de estrés oxidativo. Su rol como antineoplásico funciona de manera directa e indirecta (10).

Su mecanismo directo se basa en la activación de la proteína quinasa activada por la vía AMPK, ocasionando una inhibición de la síntesis de proteínas y gluconeogénesis. Esto limita la disponibilidad de sustratos nutricionales que las células cancerosas necesitan para poder proliferar. Por consecuencia, también se inhibirá la vía mTOR,

lo cual disminuye la activación de factores de crecimiento en células malignas y la resistencia al tratamiento del cáncer de mama (52).

La vía indirecta se relaciona con la reducción de la insulinemia y mejora de la sensibilidad a la insulina, lo que disminuye la activación de vías proliferativas mediadas por el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, reduciendo el estímulo mitogénico sobre las células de la mama dependientes de hormonas (10).

2.5.2 *Insulina: generalidades farmacológicas y sus efectos en el ciclo celular del cáncer de mama*

La insulina es una hormona peptídica descubierta en 1921 por Frederick Banting y Charles Best en la Universidad de Toronto. La primera aplicación clínica exitosa tuvo lugar en 1922, cuando se administró un extracto pancreático purificado a un paciente con diabetes tipo 1, lo que resultó en una notable mejoría. Inicialmente, la insulina se extraía de páncreas bovinos y porcinos, pero la insulina humana recombinante se introdujo en 1982, mediante la tecnología del ADN recombinante. Con el tiempo, se han desarrollado análogos de insulina con propiedades farmacocinéticas modificadas para optimizar su acción terapéutica (53).

Actualmente, además de su papel central en la regulación metabólica, se está estudiando su participación en procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia. Esta hormona lleva su síntesis en las células Beta de los islotes de Langerhans del páncreas (54).

La insulina en el organismo funciona como un regulador de almacenamiento de energía y del metabolismo. Las células son sensibles a la insulina gracias a la señalización de los receptores (6).

Esta hormona ejerce sus efectos al unirse a su receptor tirosina quinasa en la membrana plasmática de las células blanco, como hepatocitos, adipocitos y miocitos. Esta unión induce la autofosforilación del receptor y la activación de sustratos

intracelulares como el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), lo que desencadena múltiples vías de señalización, principalmente la vía PI3K/Akt (55).

Como resultado, se promueve la translocación de transportadores de glucosa (GLUT4) hacia la membrana celular, facilitando la captación de glucosa. En sujetos sanos, estos mecanismos permiten mantener la homeostasis glucémica mediante una regulación precisa y eficiente de la captación y utilización de glucosa, en respuesta a cambios en su concentración plasmática (56).

Estas vías de señalización se encuentran mal reguladas en el cáncer biológicamente agresivo. La terapia con insulina en diabetes mellitus es de gran interés por su probable asociación con el riesgo y el pronóstico del cáncer de mama. En diversos estudios se ha descrito que la insulina activa diversos receptores y vías de señalización, entre ellos, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, la vía PI3K/AKT/mTOR y las MAPK, las cuales promueven la proliferación celular, angiogénesis y resistencia a la apoptosis (7).

Además, se ha visto relacionado que los altos niveles de insulina disminuyen la concentración de globulina trasportadora de hormonas sexuales, lo que da como resultado el aumento de la biodisponibilidad de los estrógenos, y en combinación con adipocinas e inflamación asociadas a la obesidad, sobrepeso y diabetes mellitus, favorecen el crecimiento de células cancerosas con receptores hormonales positivos (47).

2.6 Generalidades de la línea célular T47D

Las líneas celulares derivadas de cáncer de mama constituyen herramientas fundamentales para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación celular maligna, la regulación del ciclo celular y la respuesta a estímulos hormonales y metabólicos. Estas líneas permiten evaluar, bajo condiciones controladas, el efecto de diferentes factores sobre el comportamiento celular, facilitando la identificación de los impactos de la estimulación con factores metabólicos u hormonales y posibles blancos terapéuticos (57).

La línea celular T47D es una línea de cáncer de mama humano, establecida a partir de un derrame pleural metastásico de un carcinoma ductal infiltrante. Presenta una

morfología epitelial adherente y crece formando monocapas, lo que la hace adecuada para ensayos de viabilidad y ciclo celular, estudios farmacológicos *in vitro*, permitiendo una alta reproducibilidad experimental (58).

Desde el punto de vista molecular, T47D se caracteriza por la expresión positiva de receptores de estrógeno y progesterona, lo que la clasifica como un modelo representativo del subtipo luminal A de cáncer de mama, uno de los más frecuentes en la práctica clínica. La conservación de estos receptores permite evaluar de manera directa la influencia de estímulos hormonales y metabólicos sobre la proliferación celular y la activación de vías de señalización intracelular asociadas al crecimiento tumoral (58,59).

Adicionalmente, la línea T47D presenta alteraciones genéticas relevantes para la oncogénesis, incluyendo mutaciones en TP53 y PIK3CA, genes estrechamente relacionados con la regulación del ciclo celular, la supervivencia celular y la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR. Estas alteraciones reflejan cambios comúnmente observados en tumores mamarios humanos, lo que incrementa la validez biológica de este modelo experimental para el estudio de mecanismos proliferativos y de respuesta a tratamientos (58,60)

La línea celular T47D ha sido ampliamente utilizada en estudios que evalúan proliferación celular, señalización mitogénica y respuesta a estímulos hormonales y metabólicos, incluyendo insulina, factores de crecimiento y fármacos hipoglucemiantes. Se ha descrito que estas células expresan el receptor de insulina, así como el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, lo que permite la activación de vías intracelulares como PI3K/Akt y MAPK en respuesta a estímulos hormonales. Asimismo, existe evidencia de la expresión de transportadores de cationes orgánicos, como OCT1, los cuales facilitan la entrada de la metformina al interior celular.

Por ello, su empleo en el presente estudio se justifica por su perfil hormonal, sus alteraciones moleculares relevantes y su capacidad de responder a estímulos metabólicos, lo que la convierte en un modelo adecuado para analizar el efecto de la insulina y la metformina sobre la viabilidad y ciclo celular de células de cáncer de mama en un sistema *in vitro* (42,58).

3. Planteamiento del problema

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres a nivel mundial y en México, y constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Paralelamente, la diabetes mellitus tipo 2 representa uno de los principales problemas de salud pública en el país, con una prevalencia creciente en la población adulta femenina. Diversos estudios epidemiológicos han señalado que la coexistencia de ambas enfermedades se asocia con un peor pronóstico clínico y mayor mortalidad en pacientes con cáncer de mama (61).

Por otra parte, la diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por hiperglucemia crónica e hiperinsulinemia, condiciones que generan un ambiente metabólico capaz de favorecer la supervivencia y proliferación de células tumorales. En este contexto, la insulina, además de su papel metabólico, puede actuar como un factor de crecimiento que estimula la proliferación celular y la progresión del ciclo celular en células de cáncer de mama, lo que ha sido relacionado con un comportamiento tumoral más agresivo (62).

Asimismo, la metformina, fármaco de primera línea para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, ha mostrado efectos antiproliferativos y proapoptóticos en diferentes modelos experimentales de cáncer. Estos efectos se han asociado con la detención del ciclo celular y la disminución de la proliferación celular, lo que ha despertado interés en su posible papel como modulador del comportamiento biológico de las células de cáncer de mama (63).

La insulina constituye otro pilar terapéutico fundamental en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2; sin embargo, en la actualidad no existe evidencia concluyente que demuestre un aumento significativo en el riesgo de desarrollar cáncer de mama asociado a la administración de insulina exógena, que justifique la modificación de su uso en la práctica clínica en pacientes que presentan de manera concomitante ambas patologías.

Estos dos fármacos forman parte integral del abordaje terapéutico de la diabetes mellitus. Si bien se ha documentado evidencia de estos fármacos y sus efectos individuales en las células neoplásicas de mama, aún no se ha esclarecido

completamente la forma en que, al ser administrados de manera conjunta, modulan la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular en células de cáncer de mama.

Por lo tanto, resulta necesario evaluar experimentalmente el efecto de la insulina y la metformina sobre la viabilidad celular y los cambios en las fases del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de mama, con el fin de comprender mejor cómo el contexto metabólico y el tratamiento anti-glucémico pueden influir en la supervivencia y el comportamiento proliferativo de las células cancerosas, por lo que surge la siguiente pregunta de investigación:

¿La administración conjunta de insulina y metformina modifica la viabilidad y el ciclo celular en células de cáncer de mama?

4. Justificaciones

1. El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres en el mundo y en México, constituyendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con una incidencia que continúa en aumento cada año.
2. La coexistencia de un estado de hiperinsulinemia y cáncer de mama se asocia con un peor pronóstico clínico, menor respuesta a tratamientos antitumorales y mayor mortalidad, lo que genera un gran impacto para el sistema de salud y para la población.
3. En estudios realizados anteriormente, se ha descrito que la insulina juega un papel importante en ambas enfermedades, actuando como un factor de crecimiento capaz de estimular la proliferación de células tumorales.
4. En investigaciones recientes se ha demostrado que la metformina, uno de los principales fármacos utilizados en primera línea de tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, tiene posibles efectos antitumorales.
5. Evaluar un modelo *in vitro* de los efectos inhibitorios de la insulina y de la metformina sobre el proceso de la proliferación celular de células de cáncer de mama, permitirá comprender de una mejor forma los efectos farmacológicos sobre las células cancerosas cuando ambas enfermedades coexisten.
6. El presente estudio se plantea como una aproximación inicial en un modelo *in vitro*, cuyo objetivo es generar evidencia preliminar sobre el efecto combinado de la insulina y la metformina en las diferentes fases del ciclo celular en células de cáncer de mama. Los hallazgos obtenidos permitirán establecer bases experimentales que podrán ser posteriormente evaluadas y validadas en modelos animales, como paso previo a su posible traslación a contextos fisiológicos más complejos.
7. Este estudio tiene relevancia no sólo científica, sino también social y clínica, al aportar evidencia sobre las interacciones moleculares, brindando herramientas para el diseño de futuras estrategias terapéuticas más efectivas y adaptadas a las pacientes que padecen simultáneamente diabetes mellitus tipo 2 y cáncer de mama.

5. Hipótesis

5.1 Hipótesis nula

El uso simultáneo de los fármacos antiglucémicos metformina e insulina, no tendrá efectos de inhibición sobre el proceso del ciclo y viabilidad celular de células de cáncer de mama *in vitro.*

5.2 Hipótesis alterna

El uso simultáneo de los fármacos antiglucémicos metformina e insulina, tendrá efectos inhibitorios sobre el proceso del ciclo y viabilidad celular de las células de cáncer de mama *in vitro*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la insulina y la metformina, en aplicación combinada, sobre el ciclo celular y viabilidad de células de cáncer de mama T47D en un modelo *in vitro*.

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar la viabilidad celular de células T47D tratadas con insulina y metformina, mediante espectrofotometría.
2. Cuantificar la frecuencia de células T47D en las distintas fases del ciclo celular, mediante la incorporación de yoduro de propidio, por citometría de flujo.
3. Evaluar las modificaciones asociadas al tratamiento combinado con ambos fármacos y comparar con células no tratadas o tratadas individualmente con metformina o insulina únicamente.

7. Metodología

7.1 Tipo de estudio

Experimental, comparativo y transversal.

7.2 Universo de trabajo

Células tumorales humanas: línea celular T47D (cáncer de mama).

7.3 Método de muestreo

A conveniencia.

7.4 Tamaño de muestra

A conveniencia, dependiendo del proceso experimental, se utilizaron entre 2 x 10^5 y 2 x 10^6 células viables de cáncer de mama TD47, cultivadas bajo métodos estandarizados. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.5 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

Células viables, libres de contaminación, cultivadas bajo métodos estandarizados en el laboratorio.

Exclusión:

1. Células no viables, contaminadas, ya sea con hongos o bacterias.
2. Cultivos en condiciones de baja confluencia, establecida en un rango menor a 80%.
3. Cultivos con cualquier otra alteración morfológica

7.6 Desarrollo del proyecto

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, donde se llevaron a cabo los procedimientos de cultivo celular, estimulación experimental y evaluación de la viabilidad y ciclo celular.

8. Variables de estudio

Variable	***Descripción conceptual***	***Descripción operativa***	***Unidades de medida***	***Tipo***
Tratamientos	*Insulina*: Hormona peptídica utilizada como fármaco anti-glucémico, capaz de modular procesos metabólicos y proliferativos celulares.	Administración de los fármacos en concentraciones definidas: 5 µL, 10 µL y 16 µL de PreDial Metformina Solución (500 mg/5mL de densidad) y 0.1 nM, 0.5 nM y 1.0 nM de Insulina Glargina durante 24 horas respectivamente. Sus efectos se analizarán mediante la evaluación de la proliferación celular y la distribución del ciclo celular**,** en comparación con cultivos sin tratamiento.	nM	Independiente Cuantitativa discreta
	Metformina: Fármaco hipoglucemiante oral perteneciente al grupo de las biguanidas, ampliamente utilizado en el tratamiento de la		µL	Independiente Cuantitativa discreta

	diabetes mellitus tipo 2.			
Proliferación celular	Incremento controlado del número de células como resultado del crecimiento y la división celular.	Determinación de la intensidad media de fluorescencia del marcador yoduro de propidio y del número de células positivas al marcador, mediante citometría de flujo.	Intensidad de fluorescencia del marcador yoduro de propidio y porcentaje de células positivas al marcador.	Dependiente Cuantitativa continua
Viabilidad celular	Método simple para cuantificar la viabilidad celular de forma indirecta mediante el uso de colorante cristal violeta el cual se une a proteínas y ADN.	Cuantificación relativa de la absorbancia del colorante de las células viables respecto a las células que no fueron estimuladas por los fármacos anti-glucémico, por medio de espectrofotometría.	Densidad óptica Unidades arbitrarias	Dependiente cuantitativa continua

9. Material y métodos

a. *Cultivo celular T47D de mama*

1. Las células fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C y transferidas a un tubo cónico estéril que contenía medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina–estreptomicina.
2. Posteriormente, se centrifugaron suavemente y se resuspendieron en medio fresco.
3. Se dejaron en un periodo de adaptación de 24 horas en incubación a 37°C con 5% de CO_2 y cuando las células alcanzaran una confluencia aproximada del 75–80 %, se procedió al subcultivo.
4. Se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS estéril para eliminar residuos de suero.
5. Se añadió una solución de tripsina–EDTA para favorecer el desprendimiento celular.
6. Las células se resuspendieron cuidadosamente y se sembraron nuevamente en placas de cultivo de 6 y 96 pozos, según los requerimientos experimentales de cada técnica.

b. *Tratamiento con insulina y metformina*

1. Para los ensayos experimentales, se sembraron $0.2x10^6$ células T47D en placas de 64 pozos y $0.1x10^6$ en placas de 6 pozos según los requerimientos de cada experimento, con la técnica de cultivo previamente comentada y se dejaron en un periodo de adaptación de 24 horas, para que se adhieran a la placa. Todos los tratamientos se realizaron en condiciones estériles y por triplicado.

2. Las células se dividieron en diferentes grupos experimentales, incluyendo un grupo control y se añadieron los fármacos de acuerdo con las siguientes condiciones:

a. 10 mM, 15 mM, 25 Mm, 50 Mm y 100 Mm de PreDial Metformina Solución (500 mg/5mL de densidad) por 24 horas, respectivamente.
b. 0.5 nM, 1.0 nM, 1.5 nM, 3.0 nM y 6.0 nM de Insulina Glargina (100UI/mL de densidad) por 24 horas, respectivamente.
c. 25 mM de de PreDial Metformina Solución (500 mg/5mL de densidad) y 1.5 nM de Insulina Glargina (100UI/mL de densidad), por 24 horas.
d. 50 mM de de PreDial Metformina Solución (500 mg/5mL de densidad) y 3.0 nM de Insulina Glargina (100UI/mL de densidad) por 24 horas.
e. 100 mM de PreDial Metformina Solución oral (500 mg/5mL de densidad) y 6.0 nM de Insulina Glargina (100UI/mL de densidad), por 24 horas.

c. *Viabildad celular: colorante cristal violeta*

1. En una placa de 96 pozos, se sembraron $0.2x10^5$ células. Se permitió que se adhieran a la placa mediante una incubación de 24 horas a una temperatura de 37°C y con CO^2 al 5%.
2. Posteriormente, se estimularon con las diferentes concentraciones de metformina e insulina, por 24 horas.
3. Al finalizar el tiempo de tratamiento, se retiró el medio y se agregaron 30 µL de metanol para fijar las células. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS.
4. A cada pozo se le administraron 50 µL de cristal violeta al 0.5%, preparado en 1:5 metanol-agua y se incubaron con agitación suave por 20 minutos.
5. Transcurrido el tiempo, se realizaron nuevamente lavados con agua destilada, 2 rápidos y 3 de 10 minutos cada uno.
6. Se dejó secar sin tapa, por 4 horas a temperatura ambiente.
7. Una vez seca, se colocaron 200 µL de metanol y posteriormente, se incubaron en agitación suave durante 20 minutos.
8. Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura de absorbancia a 580 nm de la placa por medio de espectrofotometría, con el equipo *Stat Fax 4200* de Awareness Technology.
9. Se incluyeron controles negativos (pozos sin células de cáncer de mama) y controles de viabilidad al 100% (cultivos de células de cáncer de mama sin estímulo de anti-glucémicos), para la normalización de los resultados.

10. Se incluyó también un control positivo de muerte: células tratadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), con concentraciones en un rango de 3000-5000 μM, en tiempos de incubación de 6 horas.
11. La viabilidad se expresó como un porcentaje relativo respecto al control sin estímulo.

d. *Determinación de células en ciclo celular por medio de citometría de flujo*

1. Se utilizaron $0.1x10^6$ células previamente incubadas a 37° con 5% de CO^2, tratadas como se ha descrito previamente.
2. Se realizó 1 lavado con 1 mL de PBS; se fijaron con etanol al 70% y se incubaron a 4°C por 30 minutos
3. Luego, se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS y se centrifugaron por 10 min.
4. Se resuspendieron en 250 µL de PBS.
5. Se añadieron 0.1 mg/mL de RNAsa, agitando suavemente, por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Se agregó yoduro de propidio a una concentración de 0.05 mg/mL y se incubaron por 30 minutos a 37°C, protegiendo de la luz.
7. Se realizó la lectura en el citómetro BD Accuri™ C6, con un mínimo de 10,000 eventos y excluyendo células muertas.

e. *Análisis estadístico*

Una vez obtenidos los datos experimentales, se evaluó la distribución de estos mediante pruebas de normalidad. Para aquellos conjuntos de datos que cumplieron con los supuestos de normalidad, se aplicó un ANOVA de una vía, con el fin de comparar las diferencias entre los distintos grupos experimentales. Posteriormente, se realizó una prueba Bonferroni *post-hoc* de comparaciones múltiples para identificar diferencias específicas entre grupos.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 6.0.

Implicaciones éticas

El presente estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos y las disposiciones aplicables a la investigación para la salud establecidos en la Ley General de Salud y en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Debido a que el estudio se realizó exclusivamente con la línea celular humana establecida T47D, sin participación de seres humanos, animales de experimentación ni obtención directa de muestras biológicas de pacientes, no se realizaron procedimientos de intervención, toma de muestras, recopilación de datos personales ni información clínica de individuos.

El uso de la línea celular T47D se efectuó bajo las condiciones de bioseguridad establecidas por la institución y de acuerdo con los procedimientos internos para el manejo, cultivo, almacenamiento y eliminación de material biológico. El trabajo con material celular humano se llevó a cabo procurando la protección del personal, del ambiente y de la integridad del material biológico utilizado.

Asimismo, se dio cumplimiento a las disposiciones institucionales y normativas aplicables para el manejo y disposición de los residuos generados durante los procedimientos experimentales, incluyendo aquellos considerados residuos peligrosos biológico-infecciosos, conforme a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, relativa a su clasificación y especificaciones de manejo.

El desarrollo experimental se realizó conforme a las Buenas Prácticas de Laboratorio y a los lineamientos institucionales de bioseguridad, procurando la trazabilidad de los procedimientos y materiales empleados.

Financiamiento

Los gastos administrativos y de papelería del presente trabajo fueron cubiertos por la tesista. El desarrollo experimental fue financiado mediante una beca otorgada por la Universidad Autónoma del Estado de México, por medio del programa *Proyectos de Investigación para la Transformación Social; Ciencias, Humanidades, Tecnologías e Innovación 2026*, mediante el proyecto titulado *Desarrollo y validación experimental de un índice de agotamiento inmunológico en cáncer mediante marcadores funcionales y metabólicos en un modelo in vitro*, con clave *7459/2026CIB*, registrado ante la Secretaría de Ciencia, así como, los recursos e infraestructura del Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

10. Resultados

Viabilidad celular con técnica de crista violeta

La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de tinción con cristal violeta, la cual se basa en la capacidad del colorante para unirse a proteínas y ADN celulares. Este método permite evaluar de manera indirecta la viabilidad, ya que las células viables mantienen su capacidad de adherencia a la superficie de cultivo, reteniendo mayor cantidad de colorante. En contraste, las células que han perdido viabilidad presentan disminución en su adherencia, lo que resulta en una menor retención del colorante.

El ensayo se realizó por triplicado, se analizaron células estimuladas con diferentes concentraciones de metformina, insulina y sus combinaciones descritas previamente. Posterior a la obtención de la absorbancia, se calculó la viabilidad. Los resultados se expresan como un porcentaje relativo respecto al control negativo sin estímulo (Tabla 1).

La viabilidad celular en los grupos tratados con H_2O_2, disminuyó a 14.21 ± 1.45%, 14.78 ± 3.71% y 16.45 ± 5.63% para las concentraciones de 3000 μM, 4000 μM y 5000 μM, respectivamente, en comparación con el grupo control.

El tratamiento con metformina mostró valores de viabilidad de 67.62 ± 11.73%, 70.35 ± 15.31%, 62.00 ± 12.73%, 40.26 ± 25.51% y 13.83 ± 3.93% para las concentraciones de 10 mM, 15 mM, 25 mM, 50 mM y 100 mM, respectivamente.

Por otra parte, la insulina presentó viabilidades celulares de 88.36 ± 13.23%, 91.54 ± 16.67%, 90.21 ± 17.04%, 90.34 ± 20.97% y 86.72 ± 15.51% para las concentraciones de 0.5 nM, 1.0 nM, 1.5 nM, 3.0 nM y 6.0 nM, respectivamente.

Finalmente, las combinaciones de metformina e insulina mostraron viabilidades de 29.61 ± 12.39%, 19.80 ± 12.87% y 17.20 ± 7.19% para las combinaciones de 25 mM + 1.5 nM, 50 mM + 3.0 nM y 100 mM + 6.0 nM, respectivamente (Tabla 2).

El análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni mostró diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados con H_2O_2 a concentraciones de 3000, 4000 y 5000 μM ($p < 0.05$).

Asimismo, se observaron diferencias significativas dependientes de control con los tratamientos de metformina, las concentraciones más elevadas (50 y 100 mM) provocaron una reducción significativa en la viabilidad celular respecto al grupo control ($p < 0.05$). Por el contrario, las concentraciones de 10, 15 y 25 mM de metformina no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($p > 0.05$), lo que sugiere que, en dichos rangos, el efecto sobre la viabilidad celular es limitado o no detectable bajo las condiciones del ensayo.

En los grupos tratados con insulina no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las concentraciones evaluadas ($p > 0.05$) manteniéndose valores comparables a los del grupo control. Por lo tanto, esto sugiere que, de manera individual, la insulina no ejerce un efecto relevante sobre la viabilidad celular en el modelo experimental utilizado.

En cuanto a los tratamientos combinados, la administración conjunta de metformina e insulina (25 mM + 1.5 nM, 50 mM + 3.0 nM y 100 mM + 6.0 nM) mostraron disminuciones significativas de la viabilidad celular en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Este efecto fue más pronunciado en comparación con el observado para la insulina administrada de forma individual, lo que pone de manifiesto una respuesta diferencial al combinar ambos tratamientos. En conjunto, estos hallazgos evidencian que la interacción entre la metformina y la insulina modifica la viabilidad celular bajo las condiciones evaluadas (Figura 2).

Ciclo celular con tinción yoduro de propidio

La determinación del ciclo celular se realizó mediante tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. El yoduro de propidio es un agente fluorescente que se une a las bases del ADN. Debido a que la fluorescencia emitida es proporcional al contenido de ADN celular, esta técnica permite distinguir la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular: G0/G1, S y G2/M del ciclo celular.

El ensayo se realizó por triplicado, se analizaron células estimuladas con diferentes concentraciones de metformina, insulina y sus combinaciones descritas previamente. Posterior a la tinción con yoduro de propidio, se obtuvo la fluorescencia del reactivo.

Los resultados se expresan como un porcentaje relativo respecto al control sin estímulo (Tabla 2).

En la fase G0/G1, el grupo control presentó un porcentaje promedio de 49.48 ± 4.37% de células. El tratamiento con metformina 15 mM mostró un incremento en esta población (62.47 ± 8.65 %), mientras que la insulina 1.5 nM presentó valores similares al control (49.47 ± 5.53 %). Por otra parte, la combinación de metformina 15 mM e insulina 1.0 Nm también mostró un aumento en la proporción de células en G0/G1 (61.40 ± 12.90 %). En contraste, la combinación de metformina 25 mM e insulina presentó un porcentaje promedio de 50.96 ± 5.54 % (Figura B).

En la fase S, el grupo control presentó un promedio de 16.68 ± 3.12 % de células. La administración de metformina 15 mM disminuyó esta población a 8.69 ± 5.62 %, mientras que la insulina 1.5 nM mantuvo porcentajes semejantes al control (15.93 ± 0.82 %). Asimismo, la combinación de metformina 15 mM e insulina 1.0 nM redujo el porcentaje de células en fase S (9.27 ± 7.32 %). En el tratamiento con metformina 25 mM e insulina 1.5 Mm se observó un promedio de 12.55 ± 9.17 % (Figura B).

Respecto a la fase G2/M, el grupo control presentó un promedio de 22.30 ± 2.44 % de células. El tratamiento con metformina 15 mM mostró un porcentaje promedio de 18.26 ± 4.14 %, mientras que la insulina 1.5 nM presentó un promedio de 20.31 ± 2.97 %. Por su parte, las combinaciones de metformina 15 mM e insulina 1.0 nM y metformina 25 mM e insulina 1.5 nM presentaron porcentajes promedio de 24.07 ± 5.14 % y 24.13 ± 8.71 %, respectivamente (Figura B).

Los datos obtenidos en la citometría de flujo se analizaron mediante un ANOVA de una vía para comparar los diferentes tratamientos.

En la fase G0/G1 se observó un mayor porcentaje de células en el grupo tratado con metformina (62.47 ± 8.65 %) respecto al grupo control (49.48 ± 4.37 %); sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$). De manera similar, en la fase S se observó una tendencia a una menor proporción de células en el grupo tratado con metformina (8.69 ± 5.62 %) en comparación con el control (16.68 ± 3.12 %), sin alcanzar significancia estadística ($p > 0.05$). Finalmente, en la fase G2/M tampoco se identificaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p > 0.05$).

En conjunto, estos resultados indican que los tratamientos con metformina, insulina y sus combinaciones no modificaron significativamente la distribución de las fases del ciclo celular de las células T47D bajo las condiciones experimentales evaluadas, aunque se observó una tendencia hacia una acumulación de células en G0/G1 y una disminución de la fracción en fase S en el grupo tratado con metformina.

11. Tablas, figuras y leyendas de figuras

Tabla 1. Porcentajes de viabilidad celular en los grupos experimentales

Tratamiento por grupos	Media	Desviación estándar	p
H_2O_2 3000 μM	14.21	± 1.449	< 0.0001
H_2O_2 4000 μM	14.78	± 3.712	< 0.0001
H_2O_2 5000 μM	16.45	± 5.625	< 0.0001
Metformina 10 mM	67.62	± 11.73	0.7483
Metformina 15 mM	70.35	± 15.31	> 0.9999
Metformina 25 mM	62	± 12.73	0.1901
Metformina 50 mM	40.26	± 25.51	< 0.0001
Metformina 100 mM	13.83	± 3.934	> 0.9999
Insulina 0.5 nM	88.36	± 13.23	> 0.9999
Insulina 1.0 nM	91.54	± 16.67	> 0.9999
Insulina 1.5 nM	90.21	± 17.04	> 0.9999
Insulina 3.0 nM	90.34	± 20.97	> 0.9999
Insulina 6.0 nM	86.72	± 15.51	> 0.9999
Metformina 25 mM + Insulina +1.5 nM	29.61	± 12.39	< 0.0001
Metformina 50 mM + Insulina 3.0 nM	19.8	± 12.87	< 0.0001
Metformina 100 mM + Insulina 6.0 nM	17.2	± 7.19	< 0.0001

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas con diferentes concentraciones de H_2O_2, metformina e insulina, así como con combinaciones de metformina e insulina. Los datos se expresan como media ± desviación estándar (DE) de tres muestras por grupo. Los valores de p corresponden a las comparaciones post hoc de Bonferroni de cada grupo experimental respecto al grupo control. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. (n =9).

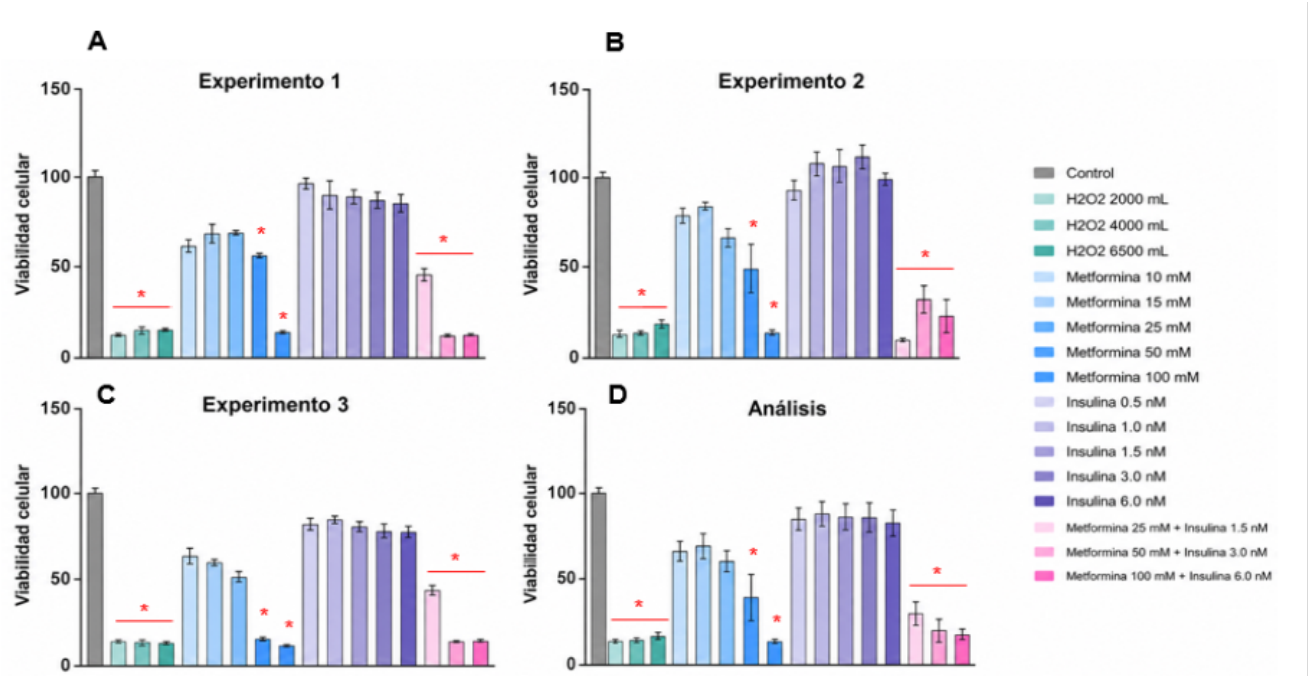


Figura 2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad celular de células T47D. La figura muestra los resultados de porcentaje de células viables en cada grupo experimental, determinados por el método de cristal violeta. Los porcentajes son relativos al 100% de viabilidad con base al grupo control. **A, B y C** corresponden a los resultados de cada uno de tres experimentos independientes y la imagen **D** muestra el promedio de los resultados obtenidos. Los datos se muestran en medias ± DE de tres muestras por grupo (n = 9). Los valores de p corresponden a las comparaciones de Bonferroni de cada grupo experimental respecto al grupo control. Se consideró estadísticamente significativo un valor de * $p < 0.05$.

Tabla 2. Porcentajes de viabilidad celular en los grupos experimentales

Tratamiento	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	p
Control	49.48 ± 4.37	16.68 ± 3.12	22.30 ± 2.44	> 0.9999
Metformina 15 mM	62.47 ± 8.65	8.69 ± 5.62	18.26 ± 4.14	> 0.9999
Insulina 1.5 nM	49.47 ± 5.53	15.93 ± 0.82	20.31 ± 2.97	> 0.9999
Metformina 15 mM + Insulina 1.0 nM	61.40 ± 12.90	9.27 ± 7.32	24.07 ± 5.14	> 0.9999
Metformina 25 mM + Insulina 1.5 nM	50.96 ± 5.54	12.55 ± 9.17	24.13 ± 8.71	> 0.9999

Tabla 2. Porcentaje de células vivas en cada fase del ciclo celular tratadas con diferentes concentraciones metformina e insulina, así como con combinaciones de metformina e insulina. Los datos se muestran en medias ± DE de tres muestras por grupo (n =9). Se realizó un análisis *post-hoc* Bonferroni el cual no reportó valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

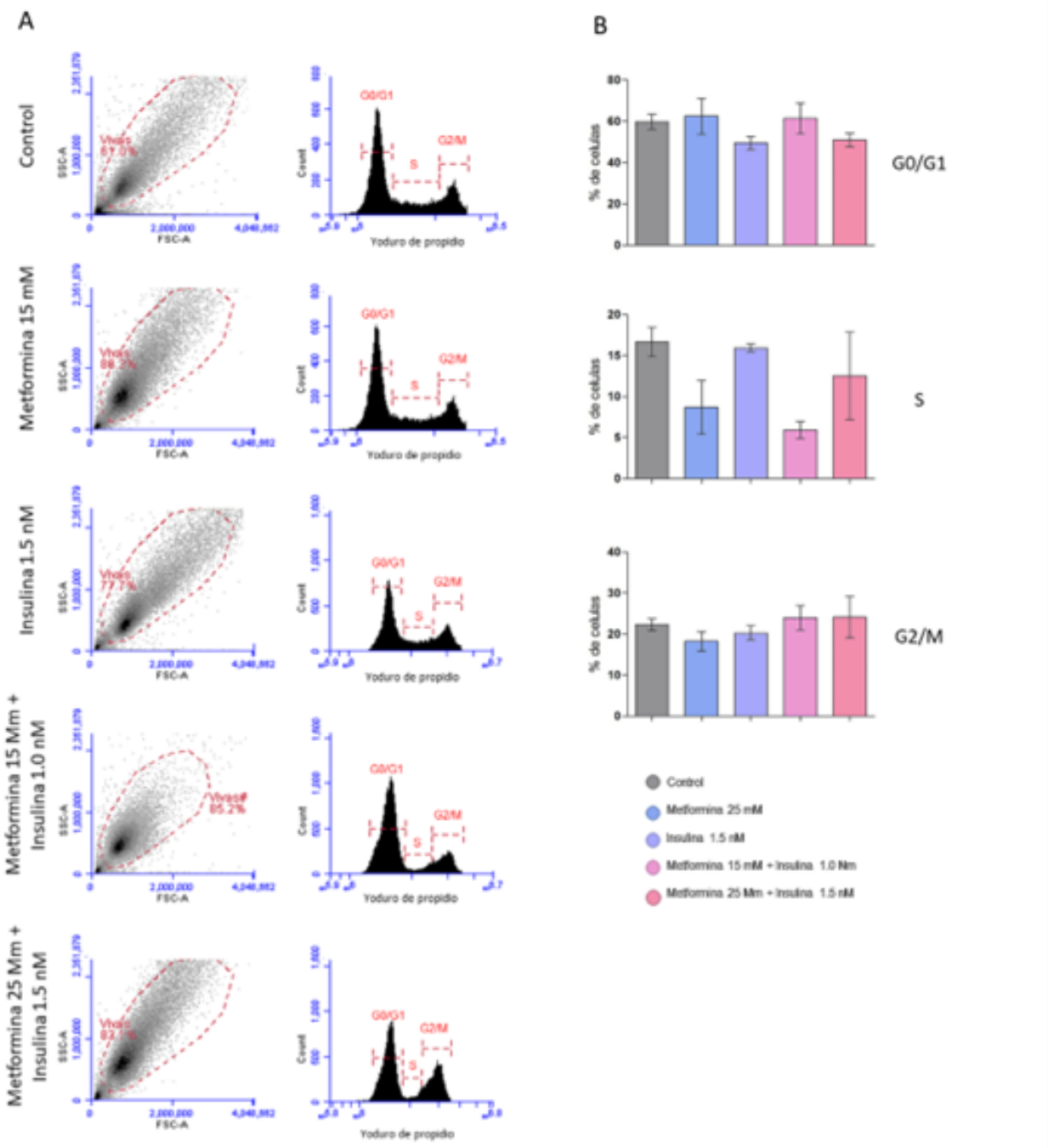


Figura A. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el ciclo celular de células T47D. La figura muestra los diagramas de puntos de la población celular viable seleccionada y los histogramas de fluorescencia para células positivas a yoduro de propidio. Los resultados se expresan en porcentajes de células vivas en cada fase del ciclo celular de cada grupo experimental. Los porcentajes se ajustaron con base al grupo control, cada una corresponde a los resultados de tres muestras por grupo (n =3). **Figura B. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el ciclo celular de células T47D**. La figura muestra los resultados de porcentaje de células vivas de cada grupo experimental en cada fase del ciclo celular (fase G0/G1, S, G2/M), determinados por el método de tinción con yoduro de propidio. Los porcentajes se ajustaron con base al grupo control. Los datos obtenidos son de tres muestras por grupo (n =3).

12. Discusión

El cáncer de mama y la diabetes mellitus tipo 2 representan dos de las enfermedades crónicas más prevalentes a nivel mundial y constituyen un importante problema de salud en México, donde su incidencia y mortalidad han mostrado una tendencia creciente en las últimas décadas. Por lo tanto, el estudio de los fármacos que son utilizados como parte de los tratamientos para la diabetes mellitus resulta de interés, particularmente en poblaciones como la mexicana, donde la carga de ambas enfermedades es elevada y su coexistencia clínica es muy común (1,61).

La regulación del metabolismo celular y de las vías de señalización asociadas a la proliferación constituye un elemento clave en la biología de las células tumorales. En este sentido, la disponibilidad de nutrientes, particularmente de glucosa, y la capacidad de las células para incorporarlos y metabolizarlos pueden modificar su comportamiento y su respuesta a los tratamientos farmacológicos. Por ello, las condiciones del medio de cultivo constituyen un factor importante para interpretar los resultados obtenidos en modelos experimentales de cáncer de mama (64,65).

En este contexto, la metformina actúa como un modulador del estado celular mediante la inhibición de procesos relacionados con la respiración mitocondrial, lo que puede provocar una disminución en la producción de ATP y favorecer la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). De este modo, la célula puede experimentar estrés energético, limitando los procesos anabólicos necesarios para su crecimiento y proliferación (51,64). Por su parte, la insulina promueve la activación de vías anabólicas como PI3K/AKT/mTOR, asociadas con la supervivencia y la proliferación celular (33,35).

La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR favorece procesos como la síntesis de proteínas, la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis, mecanismos que contribuyen al mantenimiento de la viabilidad celular. Por el contrario, cuando esta vía se inhibe, disminuyen las señales asociadas al crecimiento celular y pueden activarse mecanismos que conducen a la muerte celular programada (66).

Los hallazgos encontrados en el presente estudio son compatibles con lo reportado por Chen S. y colaboradores, quienes demostraron que la metformina activa AMPK

en células T47D y modifica procesos relacionados con la regulación de la expresión génica y la proliferación celular. En dicho estudio, la disminución de la proliferación inducida por metformina dependió, al menos parcialmente, de la actividad de AMPK, lo que respalda la participación de esta vía en la respuesta de las células T47D al tratamiento (64,67).

Debido a que ambos fármacos pueden actuar sobre procesos metabólicos y vías de señalización con efectos diferentes, la respuesta observada en la viabilidad celular podría depender del balance entre las señales que promueven la supervivencia celular y aquellas que limitan el crecimiento o favorecen la muerte celular. Sin embargo, en el presente estudio no se evaluó directamente la activación de estas vías, por lo que su participación constituye una explicación mecanística posible y no un mecanismo confirmado experimentalmente.

Por otro lado, aunque la insulina es un reconocido activador de las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/MAPK, la ausencia de cambios significativos en la viabilidad celular observada en el presente estudio, es consistente con lo reportado por Wickenden quien demostró que la proliferación celular no es uniforme entre los diferentes modelos experimentales *in vitro* y que la respuesta depende de múltiples factores, entre ellos la concentración y el tiempo de exposición a la insulina, el subtipo molecular del cáncer de mama, la expresión del receptor de insulina y de proteínas adaptadoras como IRS-1 e IRS-2, así como de las condiciones del cultivo celular (66).

En consecuencia, la activación de la señalización intracelular inducida por la insulina no siempre se traduce en un incremento detectable de la viabilidad celular. Además, cuando las células se cultivan en medios ricos en nutrientes y factores de crecimiento, el efecto adicional de la insulina puede ser limitado debido a la activación basal de vías proliferativas.

Una posible explicación para los resultados observados es que la combinación de ambos fármacos genere un desbalance entre las señales anabólicas inducidas por la insulina y el estrés energético que podría promover la metformina. Mientras la insulina puede estimular la vía PI3K/AKT/mTOR, favoreciendo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, la metformina puede alterar la respiración mitocondrial, modificar el estado energético celular y favorecer la activación de AMPK. Como consecuencia,

podría disminuir la disponibilidad de energía para sostener determinados procesos relacionados con el crecimiento y la división celular (64,68).

Esta interacción podría contribuir a una alteración de la homeostasis metabólica celular, afectando negativamente la viabilidad. Sin embargo, no puede establecerse que la combinación haya producido disfunción mitocondrial o un incremento de especies reactivas de oxígeno, ya que estos parámetros no fueron evaluados directamente. Por lo tanto, estos mecanismos deben considerarse hipótesis que requieren comprobación mediante ensayos específicos.

Para interpretar la respuesta de las células T47D a la insulina es importante considerar la expresión y funcionalidad de sus receptores. La insulina ejerce sus efectos mediante la unión a su receptor, un receptor con actividad tirosina cinasa que desencadena la fosforilación de proteínas adaptadoras, entre ellas los sustratos del receptor de insulina (IRS). Estas proteínas pueden transmitir señales hacia vías como PI3K/AKT y RAS/MAPK, implicadas en la regulación del metabolismo, la supervivencia y la proliferación celular (69).

No obstante, la presencia de un receptor no garantiza que la señalización intracelular se encuentre plenamente funcional. En las células T47D se ha descrito que las respuestas a factores de crecimiento pueden variar según la disponibilidad de proteínas adaptadoras y las características particulares del modelo celular. Por ejemplo, estudios realizados en variantes de esta línea han mostrado que las proteínas IRS-1 e IRS-2 pueden contribuir de manera diferente a la señalización mediada por el receptor de IGF-1, lo que evidencia la importancia de considerar el contexto molecular de las células estudiadas (7,69).

En el presente trabajo no se determinó la expresión del receptor de insulina ni la activación de sus principales vías de señalización. Por consiguiente, la ausencia de un incremento significativo de la viabilidad celular tras la exposición a insulina podría relacionarse con una respuesta proliferativa limitada bajo las condiciones experimentales empleadas; sin embargo, no es posible atribuirla directamente a una menor expresión del receptor, a una alteración de las proteínas adaptadoras o a una falta de activación de las vías intracelulares.

Por otra parte, la incorporación de glucosa constituye un elemento importante para comprender el metabolismo de las células tumorales. Este proceso está mediado, entre otros mecanismos, por transportadores de glucosa de la familia GLUT, que facilitan su entrada a la célula. En células de cáncer de mama se ha descrito la participación de transportadores como GLUT1 y GLUT3, mientras que GLUT4 también ha sido identificado en determinados modelos de células mamarias tumorales (70,71).

En particular, los estudios realizados en células T47D han demostrado que estas poseen mecanismos funcionales de captación de glucosa y que su metabolismo puede modificarse en respuesta a estímulos extracelulares. Se ha reportado, por ejemplo, que la estimulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico puede incrementar la captación de glucosa y la expresión de GLUT1 en estas células, lo que demuestra que la utilización de glucosa puede estar regulada por vías de señalización asociadas al crecimiento celular (70).

Sin embargo, en el presente estudio no se evaluaron la expresión de los transportadores GLUT ni la captación de glucosa. Por esta razón, no puede afirmarse que las variaciones en dichos transportadores hayan participado directamente en la disminución de la viabilidad celular. Su evaluación constituiría una estrategia complementaria para determinar si las diferencias observadas se relacionan con modificaciones en el metabolismo de la glucosa.

Por lo tanto, la disponibilidad de glucosa en el medio y la capacidad de las células para incorporarla podrían influir en la respuesta a la metformina. Si bien la metformina puede limitar determinados procesos relacionados con la producción mitocondrial de energía, la disponibilidad de glucosa también puede modificar la capacidad de las células tumorales para mantener su metabolismo mediante otras vías, particularmente la glucólisis. En consecuencia, las condiciones nutricionales del cultivo podrían contribuir a explicar las diferencias en la magnitud de la respuesta observada frente al tratamiento farmacológico (65,68).

Las formulaciones de los medios de cultivo pueden presentar concentraciones diferentes de glucosa, en este estudio se empleó DMEM de alta concentración de glucosa (Sigma-Aldrich), condición que debe considerarse al analizar los efectos de

la metformina sobre la viabilidad y el ciclo celular de las células. La disponibilidad de glucosa puede influir en el metabolismo de las células tumorales y modificar su respuesta a los tratamientos farmacológicos. En este contexto, la exposición a una concentración elevada de glucosa podría constituir una variable relevante en los efectos observados tras el tratamiento con metformina. Sin embargo, debido a que no se compararon diferentes concentraciones de glucosa, no es posible determinar si esta condición modificó la magnitud de la respuesta celular observada. Asimismo, aunque el empleo de un medio con alta concentración de glucosa es relevante para estudiar el metabolismo tumoral en condiciones de elevada disponibilidad de este sustrato, no demuestra por sí solo que se haya establecido un modelo experimental que simule todas las características metabólicas y hormonales de la diabetes mellitus tipo 2.

Para investigar esta relación, futuros estudios podrían comparar células cultivadas en medios con concentraciones fisiológicas y elevadas de glucosa, tanto en ausencia como en presencia de metformina, y evaluar los cambios en la viabilidad celular y la distribución del ciclo celular.

Por ello, sería importante considerar que las diferencias entre los resultados del presente estudio y los descritos en la literatura podrían relacionarse, al menos parcialmente, con las condiciones de cultivo, la disponibilidad de nutrientes, la concentración de los fármacos y el tiempo de exposición. Esta posibilidad refuerza la necesidad de documentar y controlar las condiciones metabólicas del medio al estudiar los efectos de la metformina y la insulina en modelos celulares de cáncer de mama.

Los resultados obtenidos en el ensayo de tinción con yoduro de propidio para la evaluación del ciclo celular muestran que, aunque el tratamiento con metformina produjo una tendencia hacia un incremento de la población celular en la fase G0/G1 y una disminución de la fracción en fase S, dichas diferencias no alcanzaron significancia estadística. La acumulación relativa de células en G0/G1, acompañada de una menor proporción de células en fase S, puede ser compatible con una disminución en la progresión del ciclo celular hacia la fase de síntesis de ADN y, por tanto, con un posible efecto antiproliferativo. En otras palabras, una mayor permanencia de las células en G0/G1 podría limitar su entrada a la fase S y reducir

su progresión hacia las etapas posteriores del ciclo celular. Sin embargo, dado que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, los resultados no permiten establecer la presencia de un arresto del ciclo celular inducido por metformina. Asimismo, la insulina y las combinaciones evaluadas no produjeron modificaciones estadísticamente significativas en la distribución de las fases del ciclo celular bajo las condiciones experimentales empleadas.

Sin embargo, estos resultados coinciden con diversos estudios que han demostrado que la metformina puede inducir arresto del ciclo celular en G0/G1 en células de cáncer de mama mediante la activación de AMPK, la inhibición de la vía mTOR y la disminución de la expresión de ciclina D1, limitando así la transición de la fase G1 hacia la fase S. Además, este efecto depende de la participación de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27, cuya expresión puede variar entre diferentes líneas celulares y condiciones experimentales (72).

Du Y., describió específicamente que en células T47D, la metformina incrementa la proporción de células en G0/G1 y reduce la población en fase S, acompañándose de una disminución de la proliferación celular mediada por la activación de AMPK. Estos efectos suelen observarse con concentraciones mayores de metformina o con tiempos de exposición más prolongados que los utilizados en el presente estudio, lo que podría explicar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en nuestros resultados (64).

Es importante destacar que, en el presente trabajo, previamente se observó una disminución significativa de la viabilidad celular inducida por la metformina. Esto sugiere que el efecto antiproliferativo del fármaco podría estar relacionado principalmente con mecanismos de muerte celular o con alteraciones metabólicas antes que con una detención detectable del ciclo celular. La inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial por la metformina reduce la producción de ATP, incrementa la relación AMP/ATP y activa AMPK, promoviendo un estado de estrés energético que limita la proliferación celular e inhibe vías anabólicas dependientes de mTOR (73). Sin embargo, el ensayo de viabilidad empleado no permite distinguir por sí solo entre estos mecanismos. Por ello, no puede establecerse que la disminución de la viabilidad se deba principalmente a apoptosis o a una detención del ciclo celular sin contar con ensayos complementarios que permitan diferenciarlos.

Por otra parte, la ausencia de un efecto significativo de la insulina sobre el ciclo celular coincide con los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad, donde tampoco se observaron cambios importantes. Aunque la insulina puede activar las vías PI3K/AKT/mTOR y MAPK favoreciendo la proliferación celular, este efecto depende de la concentración utilizada, del tiempo de exposición y de la expresión de los receptores de insulina e IGF-1 presentes en la línea celular. Es probable que las condiciones experimentales empleadas no hayan sido suficientes para generar una respuesta proliferativa medible.

En conjunto, los resultados sugieren que la metformina ejerce un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células T47D bajo las condiciones experimentales evaluadas, mientras que los cambios observados en la distribución del ciclo celular representan una tendencia biológica que no alcanzó significancia estadística. La relación entre ambos hallazgos debe interpretarse con cautela, ya que los ensayos realizados no permiten establecer de manera definitiva si la disminución de la viabilidad se debió a una reducción de la proliferación, a muerte celular o a alteraciones metabólicas que afectaron la respuesta celular.

Estos hallazgos resaltan la necesidad de realizar estudios adicionales que permitan profundizar en los mecanismos moleculares involucrados. En primer lugar, sería pertinente evaluar diferentes concentraciones de los fármacos y tiempos de exposición, así como controlar la concentración de glucosa del medio para determinar si las condiciones nutricionales modifican la respuesta a la metformina y a la insulina. Asimismo, la evaluación de la expresión del receptor de insulina y del receptor de IGF-1, junto con el análisis de proteínas adaptadoras como IRS-1 e IRS-2, permitiría explorar la capacidad de las células T47D para responder a la señalización inducida por la insulina.

De igual manera, la determinación de la expresión de transportadores de glucosa, particularmente GLUT1, y la medición de la captación de glucosa contribuirían a caracterizar el componente metabólico de la respuesta celular. La evaluación de la fosforilación de AMPK y de proteínas relacionadas con las vías AKT/mTOR mediante Western blot permitiría determinar si los cambios observados en la viabilidad se acompañan de modificaciones en estas vías de señalización. Finalmente, la

incorporación de ensayos de apoptosis, proliferación celular y función mitocondrial ayudaría a diferenciar los mecanismos responsables de la respuesta observada.

En conclusión, los resultados del presente estudio aportan evidencia experimental sobre la respuesta de las células T47D a los tratamientos con metformina e insulina bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, la confirmación de los mecanismos moleculares propuestos requiere experimentos adicionales que permitan establecer la participación de las vías metabólicas, los receptores y los transportadores de glucosa. La validación de estos hallazgos en otros subtipos de cáncer de mama y, posteriormente, en modelos in vivo, contribuiría a establecer con mayor precisión el alcance de estos efectos y su posible relevancia en el contexto de la coexistencia clínica del cáncer de mama y la diabetes mellitus tipo 2.

13. Referencias bibliográficas

1. Catherine Sánchez N. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. Revista Médica Clínica Las Condes. 2013 Jul;24(4):553–62. doi:10.1016/S0716-8640(13)70659-X
2. Song K, Farzaneh M. Signaling pathways governing breast cancer stem cells behavior. Stem Cell Res Ther. 2021 Apr 16;12(1):245. doi:10.1186/s13287-021-02321-w
3. Ruiz-Betancourt BS, González-León M, Nájera N, Ceballos G, Ovalle O, López-Reyna JCB, et al. [Breast cancer, the risk attributable to type 2 diabetes]. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2021 Jun 14;59(2):141–50. PubMed PMID: 34232007.
4. Boyle P, Boniol M, Koechlin A, Robertson C, Valentini F, Coppens K, et al. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. Br J Cancer. 2012 Oct 20;107(9):1608–17. doi:10.1038/bjc.2012.414
5. Zhao X, An X, Yang C, Sun W, Ji H, Lian F. The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. Front Endocrinol (Lausanne). 2023;14:1149239. doi:10.3389/fendo.2023.1149239.
6. Rahman MS, Hossain KS, Das S, Kundu S, Adegoke EO, Rahman MdA, et al. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. Int J Mol Sci. 2021 Jun 15;22(12):6403. doi:10.3390/ijms22126403
7. Belfiore A, Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer. Endocr Relat Cancer. 2011 Aug;18(4):R125–47. doi:10.1530/ERC-11-0074
8. Yan JB, Lai CC, Jhu JW, Gongol B, Marin TL, Lin SC, et al. Insulin and Metformin Control Cell Proliferation by Regulating TDG-Mediated DNA Demethylation in Liver and Breast Cancer Cells. Mol Ther Oncolytics. 2020 Sep;18:282–94. doi:10.1016/j.omto.2020.06.010
9. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways. Pharmacogenet Genomics. 2012 Nov;22(11):820–7. doi:10.1097/FPC.0b013e3283559b22
10. Corleto KA, Strandmo JL, Giles ED. Metformin and Breast Cancer: Current Findings and Future Perspectives from Preclinical and Clinical Studies. Pharmaceuticals. 2024 Mar 19;17(3):396. doi:10.3390/ph17030396

11. Ferlay J EM LFLMCMML et al. International Agency for Research on Cancer; 2026 (https://gco.iarc.fr/today). Global Cancer Observatory: Cancer Today [website].
12. INEGI. Estadísticas a propósito del Día Internacional de la Lucha contra el Cáncer de Mama (19 de octubre). 2025.
13. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. Medicine. 2024 Jan 19;103(3):e36905. doi:10.1097/MD.0000000000036905
14. Xiong X, Zheng LW, Ding Y, Chen YF, Cai YW, Wang LP, et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments. Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2025. doi:10.1038/s41392-024-02108-4.
15. Montaño Méndez VE, Barragán Pelcastre O, Monter Pérez GV, Uribe Vázquez Y. Cáncer de mama: factores de riesgo, clasificación anatomopatológica y generalidades del tratamiento. Archivos en Medicina Familiar. 2024 May 1;26(3):137–9. doi:10.62514/amf.v26i3.50
16. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. Oncologist. 2018 May 1;23(5):556–65. doi:10.1634/theoncologist.2017-0535
17. Pellegrino B, Hlavata Z, Migali C, De Silva P, Aiello M, Willard-Gallo K, et al. Luminal Breast Cancer: Risk of Recurrence and Tumor-Associated Immune Suppression. Molecular Diagnosis and Therapy. Adis; 2021. p. 409–24. doi:10.1007/s40291-021-00525-7.
18. Jingwen B, Yaochen L, Guojun Z. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. Cancer Biol Med. 2017;14(4):348. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0033
19. Pellarin I, Dall'Acqua A, Favero A, Segatto I, Rossi V, Crestan N, et al. Cyclin-dependent protein kinases and cell cycle regulation in biology and disease. Signal Transduct Target Ther. 2025 Jan 13;10(1):11. doi:10.1038/s41392-024-02080-z
20. Haase SB, Wittenberg C. Topology and Control of the Cell-Cycle-Regulated Transcriptional Circuitry. Genetics. 2014 Jan 1;196(1):65–90. doi:10.1534/genetics.113.152595
21. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Jun 23;14(6):329–40. doi:10.1038/nrm3591

22. Enders GH. Mammalian Interphase Cdks: Dispensable Master Regulators of the Cell Cycle. Genes Cancer. 2012 Nov 1;3(11–12):614–8. doi:10.1177/1947601913479799
23. Kashyap D, Garg VK, Sandberg EN, Goel N, Bishayee A. Oncogenic and Tumor Suppressive Components of the Cell Cycle in Breast Cancer Progression and Prognosis. Pharmaceutics. 2021 Apr 17;13(4):569. doi:10.3390/pharmaceutics13040569
24. Vilchis K. Ciclo celular, creado en BioRender. 2026.
25. Wang Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. Cells. 2021 Nov 26;10(12):3327. doi:10.3390/cells10123327
26. Panda VK, Mishra B, Mahapatra S, Swain B, Malhotra D, Saha S, et al. Molecular Insights on Signaling Cascades in Breast Cancer: A Comprehensive Review. Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/cancers17020234
27. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003 Jun 17;36(3):131–49. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x
28. Fuentes-Antrás J, Bedard PL, Cescon DW. Seize the engine: Emerging cell cycle targets in breast cancer. Clin Transl Med. 2024 Jan 24;14(1). doi:10.1002/ctm2.1544
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011 Mar;144(5):646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
30. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):153–66. doi:10.1038/nrc2602
31. Kozłowski J, Kozłowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis – insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. Postepy Hig Med Dosw. 2015 Apr 8;69:447–51. doi:10.5604/17322693.1148710
32. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2023 Apr 6;24(7):6834. doi:10.3390/ijms24076834
33. Kumar LD. EMT in breast cancer metastasis an interplay of microRNAs signaling pathways and circulating tumor cells. Frontiers in Bioscience. 2020;25(5):4844. doi:10.2741/4844

34. Pan L, Li J, Xu Q, Gao Z, Yang M, Wu X, et al. HER2/PI3K/AKT pathway in HER2-positive breast cancer A review. Medicine (United States). Lippincott Williams and Wilkins; 2024. p. e38508. doi:10.1097/MD.0000000000038508.
35. Fu D, Hu Z, Xu X, Dai X, Liu Z. Key signal transduction pathways and crosstalk in cancer: Biological and therapeutic opportunities. Transl Oncol. 2022 Dec;26:101510. doi:10.1016/j.tranon.2022.101510
36. Chen P, Liang K, Mao X, Wu Q, Chen Z, Jin Y, et al. Single-cell transcriptomes of dissecting the intra-tumoral heterogeneity of breast cancer microenvironment. J Cancer Res Clin Oncol. 2025 Jan 1;151(1). doi:10.1007/s00432-024-06015-7
37. Arcidiacono B, Iiritano S, Nocera A, Possidente K, Nevolo MT, Ventura V, et al. Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms. Exp Diabetes Res. 2012;2012:1–12. doi:10.1155/2012/789174
38. Campos-Nonato I, Galván-Valencia Ó, Hernández-Barrera L, Oviedo-Solís C, Barquera S. Prevalencia de obesidad y factores de riesgo asociados en adultos mexicanos: resultados de la Ensanut 2022. Salud Publica Mex. 2023 Jun 14;65:s238–47. doi:10.21149/14809
39. John SA, Ottolia M, Weiss JN, Ribalet B. Dynamic modulation of intracellular glucose imaged in single cells using a FRET-based glucose nanosensor. Pflugers Arch. 2008 May 11;456(2):307–22. doi:10.1007/s00424-007-0395-z
40. Lu Y, Hajjar A, Cryns VL, Trentham-Dietz A, Gangnon RE, Heckman-Stoddard BM, et al. Breast cancer risk for women with diabetes and the impact of metformin: A meta-analysis. Cancer Med. 2023 May 19;12(10):11703–18. doi:10.1002/cam4.5545
41. Gallagher EJ, LeRoith D. The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2010 Oct;21(10):610–8. doi:10.1016/j.tem.2010.06.007
42. Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE, Manson JE, et al. Insulin, Insulin-Like Growth Factor-I, and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. JNCI Journal of the National Cancer Institute. 2009 Jan 7;101(1):48–60. doi:10.1093/jnci/djn415
43. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and Cancer. Diabetes Care. 2010 Jul 1;33(7):1674–85. doi:10.2337/dc10-0666

44. Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, Inflammation, and Cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2016 May 23;11(1):421–49. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044359
45. Zhang X. Molecular Classification of Breast Cancer Relevance and Challenges. In: Archives of Pathology and Laboratory Medicine. College of American Pathologists; 2023. p. 46–51. doi:10.5858/arpa.2022-0070-RA
46. Col NF, Ochs L, Springmann V, Aragaki AK, Chlebowski RT. Metformin and breast cancer risk: a meta-analysis and critical literature review. Breast Cancer Res Treat. 2012 Oct 31;135(3):639–46. doi:10.1007/s10549-012-2170-x
47. Yee LD, Mortimer JE, Natarajan R, Dietze EC, Seewaldt VL. Metabolic Health, Insulin, and Breast Cancer: Why Oncologists Should Care About Insulin. Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2020. doi:10.3389/fendo.2020.00058
48. Bailey CJ. Metformin: historical overview. Diabetologia. 2017 Sep 3;60(9):1566–76. doi:10.1007/s00125-017-4318-z
49. Foretz M, Viollet B. Les nouvelles promesses de la metformine. médecine/sciences. 2014 Jan 24;30(1):82–92. doi:10.1051/medsci/20143001018
50. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. Diabetologia. 2017 Sep 3;60(9):1577–85. doi:10.1007/s00125-017-4342-z
51. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2019 Oct 22;15(10):569–89. doi:10.1038/s41574-019-0242-2
52. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, et al. Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 in a Rag GTPase-Dependent Manner. Cell Metab. 2010 May;11(5):390–401. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.014
53. Vedilei DA, Marante D. CAPÍTULO IX INSULINA Y OTROS AGENTES PARENTERALES.
54. Lee SH, Yoon KH. A Century of Progress in Diabetes Care with Insulin: A History of Innovations and Foundation for the Future. Diabetes Metab J. 2021 Sep 30;45(5):629–40. doi:10.4093/dmj.2021.0163
55. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001 Dec;414(6865):799–806. doi:10.1038/414799a

56. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. Physiol Rev. 2018 Oct 1;98(4):2133–223. doi:10.1152/physrev.00063.2017
57. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Research. 2011 Aug 12;13(4):215. doi:10.1186/bcr2889
58. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell. 2006 Dec;10(6):515–27. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
59. Yu S, Kim T, Yoo KH, Kang K. The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2017 May;486(3):752–8. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.114
60. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012 Oct 23;490(7418):61–70. doi:10.1038/nature11412
61. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021 May 4;71(3):209–49. doi:10.3322/caac.21660
62. Basto-Abreu A, López-Olmedo N, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, Moreno-Banda GL, Carnalla M, et al. Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: Ensanut 2022. Salud Publica Mex. 2023 Jun 13;65:s163–8. doi:10.21149/14832
63. Roshan MH, Shing YK, Pace NP. Metformin as an adjuvant in breast cancer treatment. SAGE Open Med. 2019 Jan 16;7. doi:10.1177/2050312119865114
64. DU Y, ZHENG H, WANG J, REN Y, LI M, GONG C, et al. Metformin inhibits histone H2B monoubiquitination and downstream gene transcription in human breast cancer cells. Oncol Lett. 2014 Aug;8(2):809–12. doi:10.3892/ol.2014.2158
65. Wahdan-Alaswad R, Fan Z, Edgerton SM, Liu B, Deng XS, Arnadottir SS, et al. Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. Cell Cycle. 2013 Dec 15;12(24):3759–69. doi:10.4161/cc.26641
66. Wickenden JA, Watson CJ. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Signalling downstream of PI3 kinase in mammary

epithelium: a play in 3 Akts. Breast Cancer Research. 2010 Apr 9;12(2):202. doi:10.1186/bcr2558

67. Chen S, Gan D, Lin S, Zhong Y, Chen M, Zou X, et al. Metformin in aging and aging-related diseases: clinical applications and relevant mechanisms. Theranostics. 2022;12(6):2722–40. doi:10.7150/thno.71360
68. Varghese S, Samuel SM, Varghese E, Kubatka P, Büsselberg D. High Glucose Represses the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effect of Metformin in Triple Negative Breast Cancer Cells. Biomolecules. 2019 Jan 8;9(1). doi:10.3390/biom9010016
69. Byron SA, Horwitz KB, Richer JK, Lange CA, Zhang X, Yee D. Insulin receptor substrates mediate distinct biological responses to insulin-like growth factor receptor activation in breast cancer cells. Br J Cancer. 2006 Nov 17;95(9):1220–8. doi:10.1038/sj.bjc.6603354
70. Jung KH, Lee EJ, Park JW, Lee JH, Moon SH, Cho YS, et al. EGF receptor stimulation shifts breast cancer cell glucose metabolism toward glycolytic flux through PI3 kinase signaling. PLoS One. 2019 Sep 18;14(9):e0221294. doi:10.1371/journal.pone.0221294
71. Rivenzon-Segal D, Rushkin E, Polak-Charcon S, Degani H. Glucose transporters and transport kinetics in retinoic acid-differentiated T47D human breast cancer cells. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2000 Sep 1;279(3):E508–19. doi:10.1152/ajpendo.2000.279.3.E508
72. Zhuang Y, Miskimins WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27^{Kip1} or p21^{Cip1} J Mol Signal. 2008 Dec 1;3:18. doi:10.1186/1750-2187-3-18
73. Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F. Metformin: A Therapeutic Opportunity in Breast Cancer. Clinical Cancer Research. 2010 Mar 15;16(6):1695–700. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1805