



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios Avanzados
Maestría en Ciencias de la Salud

“Cambios en la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular y senescencia en células de cáncer de mama humano T47D enriquecidas con vitamina D y dexametasona”

Tesis

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. C. Jorge Edwin Dotor Hernández

Comité de Tutores

Director

Irazú Contreras García, Ph.D.

Co-director

José Antonio Estrada Guadarrama, Ph.D.

Asesor

Dr. en C. Rubén López Santiago

CONTENIDO

1.	RESUMEN	4
2.	ABSTRACT	5
3.	MARCO TEÓRICO	6
3.1.	Cáncer de mama	6
3.1.1.	Etiología.....	6
3.1.2.	Clasificación del cáncer de mama	7
3.1.3.	Tratamiento del cáncer de mama.....	7
3.2.	Vitamina D	9
3.2.1.	Síntesis de vitamina D	9
3.2.2.	Receptor de vitamina D: VDR.....	10
3.2.3.	Vitamina D y cáncer de mama	10
3.3.	Glucocorticoides.....	11
3.3.1.	Receptor de glucocorticoides.....	11
3.3.2.	Glucocorticoides y cáncer de mama.....	12
3.4.	Ciclo Celular.....	12
3.4.1.	Fase G1	13
3.4.2.	Fase S.....	13
3.4.3.	Fase G2.....	13
3.4.4.	Control del ciclo celular	13
3.5.	Senescencia celular.....	14
3.5.1.	p21 y arresto del ciclo celular.....	15
3.5.2.	Alteraciones morfológicas y funcionales en senescencia.....	15
3.5.3.	Senescencia celular y cáncer	15
3.5.4.	Marcadores de senescencia.....	16
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
5.	JUSTIFICACIÓN.....	18
6.	HIPÓTESIS	19
6.1.	Hipótesis alterna	19
6.2.	Hipótesis nula	19
7.	OBJETIVOS.....	20
7.1.	Objetivo general	20
7.2.	Objetivos específicos.....	20
8.	METODOLOGÍA.....	21
8.1.	Diseño del estudio	21

8.2.	Universo de Trabajo	21
8.3.	Método de muestreo	21
8.4.	Tamaño de muestra.....	21
8.5.	Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	21
8.6.	Procedimientos	21
8.6.1.	Cultivo Celular	21
8.6.2.	Suplementación y tratamiento de los grupos de estudio.....	21
8.6.3.	Extracción de proteínas totales.....	22
8.6.4.	Western Blot.....	22
8.8.	Implicaciones bioéticas.....	25
8.9.	Análisis estadísticos.....	25
9.	RESULTADOS	26
10.	DISCUSIÓN.....	28
11.	CONCLUSIONES.....	30
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. RESUMEN

El cáncer de mama es uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, es el tumor maligno más común diagnosticado en mujeres, así como la primer causa de muerte por tumores malignos. A pesar de los avances en las técnicas de prevención, diagnóstico y tratamiento temprano, su manejo continúa siendo un reto para los sistemas de salud. Se ha impulsado la búsqueda constante de estrategias terapéuticas eficaces y accesibles, tomando interés el estudio de medicamentos de uso común como los glucocorticoides y micronutrientes como la vitamina D por sus posibles efectos antineoplásicos.

Los glucocorticoides conocidos por sus efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios han demostrado tener efectos en el microambiente tumoral, en particular la dexametasona, han mostrado efectos antineoplásicos en distintos tipos de cáncer, efectos atribuidos a su capacidad para inducir apoptosis, inhibir la proliferación celular, modular la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y alterar el metabolismo celular. Por otro lado, la vitamina D, más allá de su papel en la homeostasis del calcio, es objeto de interés por sus propiedades anti proliferativas, se ha visto que puede modular la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular, apoptosis, angiogénesis y ciclo celular.

Sin embargo, la evidencia actual permanece en debate respecto al potencial antineoplásico de la dexametasona y la vitamina D en el contexto de cáncer de mama. En este estudio se analizó el efecto, en células T47D, de la suplementación con vitamina D y el tratamiento con dexametasona mediante el análisis del cambio en la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa, como marcador de senescencia celular, y el análisis en el cambio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161).

Los resultados de este estudio mostraron que la suplementación con vitamina D (100 μ M) durante 72 h y el tratamiento con dexametasona a dosis de 5, 10 y 40 μ M y en los tiempos de 24, 48 y 72 h indujo un incremento en el porcentaje de células senescentes. Se observó una disminución en la expresión de la proteína cdc2 (Thr161) con el tratamiento con dexametasona. La combinación de vitamina D + dexametasona (100 μ M/40 μ M) mostró un efecto sinérgico en la inducción del estado senescente y en la disminución de la expresión de las proteínas CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161).

Por lo tanto, uno de los posibles mecanismos implicados con el efecto antineoplásico de estas sustancias es la inducción del estado senescente, el cual puede funcionar como una barrera para detener la progresión tumoral, además de explicar los hallazgos contradictorios en los estudios actuales debido a la dualidad de efectos que el estado senescente representa en el contexto de cáncer. Sin embargo, se requieren más estudios en un mayor número de poblaciones celulares, así como el análisis de los efectos que estas sustancias tienen en el microambiente tumoral.

2. ABSTRACT

Breast cancer represents one of the most significant global public health challenges. It is the most frequently diagnosed malignant neoplasm in women and the leading cause of cancer-related mortality. Despite substantial advances in prevention, early detection, and therapeutic approaches, its management continues to pose a considerable challenge for healthcare systems. This has driven the ongoing pursuit of effective and accessible therapeutic strategies, with particular interest in the investigation of widely used agents such as glucocorticoids and micronutrients like vitamin D, given their potential antineoplastic properties.

Glucocorticoids, known for their immunomodulatory and anti-inflammatory properties, have been shown to exert effects on the tumor microenvironment. In particular, dexamethasone has demonstrated antineoplastic activity in different types of cancer, effects attributed to its ability to induce apoptosis, inhibit cell proliferation, modulate the expression of cell cycle-related genes, and alter cellular metabolism. On the other hand, vitamin D, beyond its established role in calcium homeostasis, has attracted interest due to its antiproliferative properties. It has been reported to modulate the expression of genes involved in cellular differentiation, apoptosis, angiogenesis, and cell cycle regulation.

However, current evidence remains inconclusive regarding the antineoplastic potential of dexamethasone and vitamin D in the context of breast cancer. In this study, the effects of vitamin D supplementation and dexamethasone treatment were evaluated in T47D cells by assessing changes in the activity of the lysosomal enzyme β -galactosidase, as a marker of cellular senescence, as well as alterations in the expression of the cell cycle regulatory proteins CDK2 (Thr160) and cdc2 (Thr161).

The results of this study showed that vitamin D supplementation (100 μ M) for 72 h and dexamethasone treatment at doses of 5, 10, and 40 μ M and time points of 24, 48, and 72 h induced an increase in the percentage of senescent cells. A decrease in the expression of the protein cdc2 (Thr161) was observed following dexamethasone treatment. The combination of vitamin D and dexamethasone (100 μ M/40 μ M) exhibited a synergistic effect in promoting cellular senescence and reducing the expression of the regulatory proteins CDK2 (Thr160) and cdc2 (Thr161).

Therefore, one of the possible mechanisms underlying the antineoplastic effects of these agents is the induction of cellular senescence, which may act as a barrier to tumor progression and may also account for the contradictory findings reported in current studies, given the dual role that senescence can exert in the cancer context. Nevertheless, further investigations in broader cellular populations, as well as analyses of the effects of these substances on the tumor microenvironment, are required.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres, es la quinta causa de muerte relacionada con el cáncer con un número estimado de 2.3 millones de casos nuevos en todo el mundo (1). En México es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con una incidencia de 38.4 por cada 100,000 mujeres y una mortalidad de 16.8 por cada 100,000 mujeres (2).

3.1.1. Etiología

El cáncer de mama tiene un origen multifactorial en el que intervienen factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. Entre los factores de riesgo para su desarrollo se encuentran: factores biológicos (sexo femenino, edad de 50 años o mayor, antecedentes familiares o personales de cáncer de mama, menarquia antes de los 12 años, menopausia después de los 52 años), factores asociados con el tratamiento de enfermedades previas (exposición a radiación ionizante terapéutica en el tórax), factores reproductivos (nuliparidad, no amamantar, primer embarazo a término después de los 30 años, terapia de reemplazo hormonal por más de cinco años) y estilo de vida (obesidad, consumo de alcohol, tabaquismo, sedentarismo) (2,3).

El origen espontáneo en el que no existen antecedentes familiares es responsable del 70-80% de los casos (2), un 10% es hereditario y se relaciona con antecedentes familiares, así, se ha asociado que tener un familiar de primer grado con este diagnóstico incrementa el riesgo por tres veces de desarrollar cáncer de mama; sin embargo, esta asociación es muy variable e intervienen otros factores ambientales (2,4).

Las mutaciones en *BRCA1* (17q21) y *BRCA2* (13q13), genes supresores de tumor, están asociados con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama del 69% y 72% respectivamente, además, las mutaciones en el gen *BRCA2* están asociadas con el desarrollo de cáncer de mama en hombres (4). Existen síndromes genéticos correlacionados con el cáncer de mama, los más frecuentes relacionados con un mayor riesgo se presentan en la tabla 1.

Síndrome	Gen	Incremento de riesgo de cáncer mama
Li Fraumeni	<i>TP53</i>	85%
Síndrome de cáncer hereditario asociado a <i>STK11</i> o síndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	54%
síndrome de cáncer hereditario asociado a <i>PALB2</i>	<i>PALB2</i>	53%
Ataxia telangiectasia	<i>ATM</i>	30-52%

Síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario	<i>CDHI</i>	42%
Neoplasia endocrina múltiple tipo1	<i>MEN1</i>	33%
Síndrome de cáncer hereditario asociado a <i>CHEK-2</i>	<i>CHEK2</i>	30%
Síndrome de Cowden	<i>PTEN</i>	30%
Neurofibromatosis tipo 1	<i>NF1</i>	18%

Tabla 1. Síndromes genéticos correlacionados con el desarrollo de cáncer de mama (4,5).

Para el desarrollo de cáncer de mama se han propuesto los modelos de evolución clonal y el de células madre cancerosas, el primero se asocia con acumulación de mutaciones y cambios epigenéticos de las células tumorales con sobrevivencia de las más aptas, mientras que el segundo propone que solo las células cancerosas precursoras inician y mantienen la progresión. Sin embargo, se acepta actualmente que ambos modelos están implicados (4).

3.1.2. Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea caracterizada por diferentes perfiles histológicos y moleculares, comúnmente se agrupa en cuatro categorías tomando como base la expresión de receptores hormonales: receptor de estrógenos (ER⁺), receptor de progesterona (PR⁺), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2⁺) y los tumores triple negativos (TNBC) los cuales no expresan ningún receptor mencionado (4,6). La cuantificación del ER⁺ es un determinante diagnóstico importante, ya que un 70-75% del cáncer de mama invasivo se caracteriza por una expresión alta de este receptor (7).

A nivel histológico el cáncer de mama se clasifica en *in situ* (carcinoma ductal, carcinoma lobulillar) 25%, e invasivo (ductal invasivo y lobulillar invasivo) 75% (2). Sin embargo, debido a su heterogeneidad clínica y al avance en las técnicas de biología molecular, la clasificación del cáncer de mama se ha ampliado y en la actualidad se clasifica desde una perspectiva inmunohistoquímica (4).

3.1.3. Tratamiento del cáncer de mama

Los pilares principales en el tratamiento del cáncer de mama son el tratamiento locorregional (cirugía y radioterapia) y el tratamiento sistémico (quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida) considerándose las características histológicas y moleculares para seleccionar el tratamiento más adecuado dependiendo de cada paciente (2).

En cáncer de mama no metastásico el objetivo principal del tratamiento es erradicar el tumor de la mama y de los ganglios linfáticos regionales mediante resección quirúrgica. Se puede administrar tratamiento sistémico, quimioterapia o radioterapia, antes del procedimiento quirúrgico (tratamiento neoadyuvante) en caso de tumores grandes donde se busca reducir la carga tumoral, o después del mismo (tratamiento adyuvante) si los hallazgos quirúrgicos o

biomarcadores indican un mayor riesgo de recurrencia; como se mencionó, el subtipo de cáncer de mama guiará el tratamiento sistémico administrado (4,8).

Para los casos avanzados con metástasis los objetivos del tratamiento son prolongar la vida y paliar los síntomas, actualmente los casos con metástasis siguen siendo incurables, sin embargo, se emplean las mismas categorías básicas de tratamiento, terapia local o sistémica con enfoques neoadyuvantes y adyuvantes (8).

Radioterapia

Se aplican radiaciones de alta energía a toda la mama o a una parte de la mama, a la pared torácica y a los ganglios linfáticos regionales. La radiación post mastectomía a la pared torácica en pacientes con ganglios linfáticos positivos se asocia con un menor riesgo de recurrencia y mortalidad. Se puede aplicar en todos los tipos de cáncer de mama, siendo su implicación más importante en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo. Puede ser administrada de manera simultánea con otros tratamientos sistémicos, sin embargo, en casos de cáncer de mama avanzado se puede presentar resistencia a la radioterapia (9).

Quimioterapia

Involucra a varias familias de fármacos citotóxicos como agentes alquilantes, antimetabolitos e inhibidores de tubulina. Se emplean en esquemas neoadyuvantes y adyuvantes; su uso está asociado con varios efectos secundarios como pérdida de cabello, náuseas, vómito, diarrea, fatiga, mayor susceptibilidad a infecciones, supresión de la médula ósea, y con menos frecuencia se ha asociado con miocardiopatía y deterioro de las funciones mentales (9).

Terapia endocrina

Es la principal estrategia para el tratamiento del cáncer de mama positivo para receptores hormonales, especialmente para aquellos que expresan receptores de estrógenos, teniendo como objetivo reducir los niveles de estrógenos o evitar que los estrógenos estimulen las células del cáncer de mama. Los medicamentos que bloquean los receptores de estrógenos incluyen: moduladores selectivos de los receptores de estrógenos y degradadores selectivos de los receptores de estrógenos; y los inhibidores de aromatasa, medicamentos que tienen como objetivo reducir los niveles de estrógeno (7).

Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos

El tamoxifeno, el toremifeno, el bazedoxifeno y el raloxifeno son anti-estrógenos que compiten con los estrógenos endógenos uniéndose al receptor de estrógenos, bloqueando el reclutamiento de cofactores y la posterior transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular, la proliferación y la migración celular. Los efectos adversos más frecuentes asociados con su uso son sofocos, náuseas, vómito, sangrado y secreción vaginal y mayor riesgo de eventos tromboembólicos (9).

Degradadores selectivos de los receptores de estrógenos

Bloquean completamente la vía de señalización del receptor de estrógenos, el fulvestrant es el principal medicamento de este grupo, se une con mayor afinidad que el tamoxifeno al receptor de estrógenos, inhibiendo su dimerización y bloqueando su translocación al núcleo, lo que lleva a su degradación (9).

Inhibidores de aromatasa

Los inhibidores de aromatasa bloquean la actividad de la enzima aromatasa inhibiendo la síntesis de estrógenos. Se clasifican en dos categorías: inhibidores de aromatasa esteroideos y no esteroideos, el exemestano es un inhibidor de aromatasa esteroideo, se une irreversiblemente a la aromatasa y la inactiva, los no esteroideos incluyen letrozol y anastrozol. Entre los efectos adversos asociados con su uso se encuentran aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, sofocos, sequedad vaginal, fatiga y osteoporosis (9).

Terapia biológica

En casos de cáncer de mama HER2⁺ los principales fármacos incluyen anticuerpos contra HER2 (trastuzumab, pertuzumab) e inhibidores de tirosina cinasa (lapatinib, nerotinib). También se emplean inhibidores de la angiogénesis como el anticuerpo anti-VEGF monoclonal humanizado recombinante y bevacizumab. Recientemente se han desarrollado fármacos que actúan sobre las vías de supervivencia celular independientes de estrógenos, como la vía de señalización mTOR/PI3K/AKT, y fármacos que actúan sobre los mecanismos de progresión del ciclo celular como los inhibidores de CDK4/6 (7,9).

3.2. Vitamina D

La vitamina D es una hormona esteroidea, su función más estudiada es la relacionada con el metabolismo del calcio y homeostasis del hueso, sin embargo, su metabolismo es más complejo, tomando particular interés sus efectos como hormona en tejidos extra esqueléticos.

3.2.1. Síntesis de vitamina D

La vitamina D se puede obtener de manera exógena y endógena, la primera se obtiene a través de la dieta, en forma de vitamina D3 (colecalfiferol) de origen animal y vitamina D2 (ergocalciferol) de origen vegetal, es responsable del 20% de la vitamina D circulante; el 80% restante se obtiene por síntesis en la piel (vía endógena) en forma de colecalfiferol derivado de un precursor. Ya sea obtenida de la dieta o de la síntesis en piel, es un metabolito inactivo y requiere de un proceso de doble hidroxilación para convertirse a su forma activa (10).

La vitamina D que se adquiere por la dieta se absorbe a través de los enterocitos y llega al torrente sanguíneo por medio de los quilomicrones, se asocia a la proteína de unión a la vitamina D (VDBP) que es una glicoproteína sérica, este complejo (vitamina D – VDBP) se transporta hacia el hígado en donde la enzima CYP2R1, enzima microsomal con actividad 25-hidroxilasa, realiza la primera hidroxilación obteniendo 25-hidroxivitamina D3

(25(OH)D₃). La 25(OH)D₃ se utiliza comúnmente como marcador de los niveles séricos de vitamina D, debido a que es el metabolito de vitamina D más abundante y estable (10,11).

A nivel renal la 25(OH)D₃ sufre una segunda hidroxilación por la enzima CYP27B1, enzima con actividad de 1 α -hidroxilasa, obteniéndose 1 α ,25-dihidroxitamina D₃, metabolito activo de la vitamina D comúnmente llamado calcitriol, caracterizado por su gran afinidad para unirse con el receptor de vitamina D (VDR) (11).

La enzima 1 α -hidroxilasa, además del riñón se expresa en otros tejidos periféricos, piel, cerebro, placenta, testículo, intestino, pulmón y células mieloides, la expresión de esta enzima se ve modulada por la acción del interferón gamma (IFN- γ) y de los receptores tipo Toll (TLR) (10).

La vía endógena de obtención de vitamina D es a través de la piel, el estrato espinoso es rico en 7-dehidrocolesterol (7DHC), precursor para la síntesis de vitamina D. La exposición a luz ultravioleta B (UVB) en el rango de 290-315 nm determina un reordenamiento electrolítico del anillo en la posición C9-C10, produciendo pre-vitamina D (pre-D), la cual, por isomerización térmica, cambio de un hidrógeno de C19 a C9, produce colecalciferol (11,12).

La conversión de 7DHC a colecalciferol depende de la actividad de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (DHCR7), esta enzima cataliza la reducción reversible de 7DHC en colesterol (11).

3.2.2. Receptor de vitamina D: VDR

El VDR, receptor intracelular perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligandos, al unirse a su ligando se transloca del citoplasma hacia el núcleo, donde junto con el receptor X retinoide (RXR), factor accesorio nuclear, se une a los elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE) en el ADN, involucrándose en la transcripción de más de 1,000 genes en una gran proporción de tejidos y células (10,13).

3.2.3. Vitamina D y cáncer de mama

La concentración sérica baja de vitamina D se ha descrito como un factor de riesgo para el desarrollo de diversos tipos de cáncer como cáncer de colon, próstata, hematológicos y de mama (14).

La vitamina D controla la proliferación y la progresión del ciclo celular a través de blancos génicos que regulan la expresión de oncogenes: *MYC*, *JUN*, *JUNB*, *JUND* y *FOS*; así como de genes supresores de tumor: *CCNC* (ciclina C), *CCND1*, *CDKN1A*, *CDKN1B* y *G0S2* (interruptor 2 G0/G1), además, la vitamina D se ha asociado con la modulación de procesos celulares como: adhesión, migración, organización de la matriz extracelular, angiogénesis, respuesta inflamatoria, comunicación celular, metabolismo esteroideo, estrés oxidativo y apoptosis (11).

Otra de las funciones de la vitamina D tiene relación con la modulación del sistema inmunológico que comparte el mismo conjunto de genes y vías que impulsan el crecimiento

de células cancerosas, con un efecto anticancerígeno principalmente en la prevención de la aparición de tumores, mediante la activación de linfocitos T citotóxicos que eliminan células con potencial cancerígeno (14).

3.3. Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas que se emplean en el tratamiento de procesos inflamatorios, en enfermedades autoinmunes y el cáncer. Tienen efectos importantes sobre el metabolismo, la diferenciación, las respuestas al estrés, la inmunidad, la proliferación y la supervivencia celular. Para llevar a cabo sus efectos fisiológicos y terapéuticos los glucocorticoides se unen al receptor de glucocorticoides (GR) el cual pertenece a la familia de factores de transcripción de receptores nucleares (15).

En el tratamiento del cáncer son útiles debido a su capacidad para prevenir los efectos adversos relacionados con la quimioterapia como náuseas y vómitos, además, se emplean para el tratamiento de síntomas asociados con el cáncer como el dolor, fatiga, caquexia y disnea, siendo la dexametasona una de las opciones más seguras para el control de estos (16).

El uso de glucocorticoides tiene efectos adversos relacionados con su tiempo de uso, a corto plazo se asocian con insomnio, ganancia de peso, hiperglucemia, amenorrea y edema; y a largo plazo con aumento del riesgo de osteoporosis, glaucoma, cataratas, úlceras gastrointestinales, enfermedad del hígado graso no alcohólico, insuficiencia adrenal y aumento del riesgo cardiovascular (16).

3.3.1. Receptor de glucocorticoides

El gen del receptor de glucocorticoides denominado NR3C1 (*nuclear receptor subfamily 3 group c member 1*) localizado en el brazo corto del cromosoma 5 (5q31.3) codifica para el GR, y mediante empalme alternativo produce isoformas del receptor incluyendo al GR α con 777 aminoácidos, el más abundante, y el GR β de 742 aminoácidos. El GR β no se une a glucocorticoides endógenos y actúa como un antagonista del GR α (17).

La actividad del GR es resultado de cambios alostéricos por ligando, interacciones intradominio, contactos con proteínas asociadas y elementos de respuesta específicos sobre el ADN (18).

Su principal ligando son los glucocorticoides endógenos entre ellos el cortisol, hormona derivada del colesterol secretada por la corteza de la glándula suprarrenal estimulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Bajo condiciones normales su secreción sigue un ritmo circadiano, su principal función es la respuesta al estrés, físico o emocional, y está involucrada en la regulación de la presión arterial, la inflamación, la inmunosupresión, la plasticidad neuronal, el control de la temperatura corporal, el control de la ingesta alimentaria y el control del sueño (17,19).

Por otro lado los glucocorticoides exógenos o sintéticos entre los que se encuentran: prednisolona, metilprednisolona, fluticasona, budesónida y dexametasona, actúan a través de la activación del GR, estas formas sintéticas son más potentes que el cortisol, se utilizan por sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores; sin embargo, su empleo está limitado por

sus efectos adversos: hipertensión, atrofia de la piel, hiperglucemia, retardo del crecimiento, osteoporosis, entre otros y por producir resistencia a los glucocorticoides con su uso crónico (17,20).

La activación del GR tiene efectos inmunosupresores como la disminución de la permeabilidad vascular, disminución del reclutamiento de leucocitos, inhibición de la liberación de citocinas y alteración en la diferenciación celular. Además, está asociada con la inducción de la apoptosis mediada por la regulación de los genes anti y pro apoptóticos, inhibiendo la expresión de *BCL2*, *MCL1* y *BCL2L1*, genes anti apoptóticos (18).

3.3.2. Glucocorticoides y cáncer de mama

El uso de glucocorticoides para el tratamiento del cáncer de mama es objeto de debate, ya que por un lado se han asociado con supresión de la progresión tumoral y de la metástasis, y por otro se ha demostrado que los glucocorticoides pueden evitar que las células cancerosas entren en apoptosis y disminuir los efectos citotóxicos de algunos quimioterapéuticos (21,22). Como se explica más adelante, estos efectos varían y son dependientes del subtipo de cáncer de mama.

Por ejemplo, para el cáncer de mama con receptor de estrógenos positivo el tratamiento con dexametasona ha mostrado una mejora en la supervivencia de las pacientes, sin embargo, el mecanismo a través del cual logra este efecto no está descrito, pero se piensa que está mediado por la inhibición de la señalización por factores de crecimiento; en contraposición, se ha demostrado que la expresión elevada del GR se correlaciona con mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama con receptor de estrógenos negativo (17,18).

La evidencia actual señala un efecto beneficioso con el uso de glucocorticoides sobre el cáncer de mama con ER⁺, la interacción entre estos dos receptores esteroideos hormonales muestra un resultado favorable en términos de pronóstico, lo que es sustentado por estudios *in vitro* que demuestran que los glucocorticoides pueden suprimir los efectos proliferativos de la activación del ER (18).

3.4. Ciclo Celular

El ciclo celular es un proceso altamente regulado que permite el crecimiento celular, la duplicación del material genético y la división celular para producir dos nuevas células hijas. El ciclo se compone de cuatro fases: G1, S, G2 y fase M; las fases G1, S y G2 en conjunto se denominan interfase, y la fase M incluye la mitosis en la que el material genético se divide y la citocinesis, en la que la membrana citoplásmica divide el material celular para formar dos células hijas (23,24).

La mitosis consta de cinco etapas consecutivas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Cada fase de la progresión del ciclo celular depende de la adecuada finalización de la fase anterior. Una célula podría salir del ciclo celular para entrar en la fase G0, que representa un estado de quiescencia (23).

La duración de las fases del ciclo celular varía considerablemente dependiendo de cada tipo celular, pero si se asume que la duración total del ciclo es de 24 h, la duración de la fase G1

sería de aproximadamente 11 horas, de la fase S de 8 horas, de la fase G2 de 4 horas y de la fase M de aproximadamente 1 hora (23).

3.4.1. Fase G1

Esta es la fase de crecimiento, la célula sintetiza muchas proteínas, aumenta el número de organelos como los ribosomas y las mitocondrias y la célula aumenta su tamaño. Durante esta fase diversas señales ambientales de estrés y metabólicas, pueden influir en la progresión del ciclo; con estas señales la célula puede autorrenovarse, diferenciarse o morir. Se requiere la activación de las CDK como requisito esencial para entrar en la fase S (23,25).

3.4.2. Fase S

Durante esta fase ocurre la replicación del ADN; después de la replicación, cada cromosoma está constituido por dos cromátides hermanas, esta fase también se caracteriza por una baja actividad en la expresión génica y de síntesis de proteínas, exceptuando la producción de proteínas histonas, ya que la mayoría de estas proteínas se producen durante esta fase (23).

Hay un punto de control durante esta fase el cual desactiva CDK2 como respuesta al daño del ADN, evitando la replicación del ADN dañado. La progresión de la fase S a la fase G2 está regulada por el punto de control de la cinasa ATR (ataxia telangiectasia y proteína relacionada Rad3) (23).

3.4.3. Fase G2

Durante esta fase la célula se prepara para la mitosis, se caracteriza por una síntesis significativa de proteínas, lípidos y crecimiento celular. La inhibición de la síntesis de proteínas puede llevar al arresto celular en esta fase, debido a la inhibición de p38, pero también se ha sugerido que la síntesis de proteínas no es un requerimiento absoluto para progresar a mitosis, algunos tipos de cáncer no pasan por la fase G2, su ciclo celular progresa directamente de la fase S a la fase M (23).

Durante esta fase se reparan las roturas de la doble cadena de ADN que se acumularon en la célula antes de poder progresar a la siguiente fase (23).

3.4.4. Control del ciclo celular

La progresión del ciclo celular es mediada por cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y su subunidad ciclina reguladora; además, hay tres puntos de control: G1/S (denominado punto de restricción), G2/M (punto de control de daños en el ADN) y el punto de control del huso mitótico los cuales se encargan de comprobar la integridad, fidelidad y secuencias de los principales eventos el ciclo celular como el crecimiento del tamaño celular y la replicación e integridad del ADN (23). CDK4/CDK6 forman complejos con la ciclina D, activa ADK4/6 e inicia la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb) en fase temprana de G1. La fosforilación de Rb estimula la liberación del factor de transcripción E2F, que estimula la transcripción de genes tempranos que responden a E2F necesarios para la progresión del ciclo celular. Los genes iniciales regulados por E2F incluyen a las ciclinas A y E; durante la fase

tardía de G1, la ciclina E se asocia con CDK2 y la activa, lo que provoca la fosforilación total de Rb y potencia la transcripción dependiente de E2F (23).

Estos eventos impulsan el paso de la célula a través del punto de restricción en el límite de la fase G1/S e inicia la fase S. Durante el inicio de la fase S se sintetiza la ciclina A y forma complejos con CDK2 la cual fosforila proteínas involucradas en la replicación del ADN y dirige a la célula a que progrese a la fase G2, al final de la fase G2 se forma el complejo CDK1/ciclina A el cual se requiere para la transición G2/M y el inicio de la profase. Finalmente, el complejo CDK1/ciclina B se forma en la fase M y permite que se complete la mitosis (23).

3.5. Senescencia celular

La senescencia celular se caracteriza por la detención o arresto irreversible del ciclo celular que puede ocurrir en la fase G1, para prevenir el inicio de la replicación del ADN en células dañadas, o posiblemente en la fase G2 para bloquear la mitosis en presencia de daño al ADN, la inhibición de la maquinaria del ciclo celular es la característica definitoria. Esta detención o arresto del ciclo celular se establece con la finalidad de garantizar que células dañadas o transformadas no propaguen mutaciones, y su mantenimiento está estrictamente regulado mediante mecanismos del ciclo celular que responden a señales de senescencia intracelulares y extracelulares con patrones de expresión génica distintos (26,27).

La senescencia celular tiene funciones fisiológicas dentro del desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la resolución de fibrosis y la supresión de tumores; pero además puede ser inducida por daño al ADN, disfunción de los telómeros, activación de oncogenes o pérdida de funciones supresoras de tumores, cambios epigenéticos, daño a orgánulos, estrés oxidativo, disfunción metabólica y agentes quimioterápicos. Es distintivo de la senescencia celular la detención prolongada del ciclo celular, cambios transcripcionales, daño macromolecular, metabolismo desregulado y la adquisición de un secretoma bioactivo que es conocido como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (26,27).

El SASP comprende la liberación de factores de crecimiento, factores angiogénicos, citocinas, quimiocinas y proteasas como las metaloproteinasas de matriz al entorno extracelular; de esta forma se refuerza y difunde la senescencia de forma autocrina y paracrina y se activan respuestas inmunológicas que eliminan a las células senescentes. Sin embargo, el SASP también se ha asociado con la estimulación de la tumorigénesis y metástasis (27,28).

Los componentes del SASP se pueden clasificar dentro de tres grandes grupos: proteasas extracelulares (metaloproteinasas de matriz, serina proteasas y controladores de la vía de activación del plasminógeno), componentes secretores proteínicos y no proteínicos insolubles (fibronectina, vesículas extracelulares) y moléculas de señalización solubles (interleucinas, quimiocinas y factores de crecimiento) (29).

3.5.1. p21 y arresto del ciclo celular

La respuesta al ADN dañado (DDR) es un mecanismo que activa la senescencia a través de la activación del eje p53-p21; p53 es una proteína supresora de tumores que induce la transcripción de p21, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, que inhibe CDK2 y tiene como resultado la detención de la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. p21 induce senescencia mediante la regulación negativa de genes mitóticos y la regulación positiva de genes asociados a la senescencia (30). Además de p53 muchos oncogenes, supresores de tumores, citocinas inflamatorias y nutrientes pueden iniciar la transcripción de p21 (31).

3.5.2. Alteraciones morfológicas y funcionales en senescencia

Los cambios morfológicos están controlados por cambios moleculares como un incremento en la expresión de p53 y la inhibición de la fosforilación de Rb, las células senescentes tienen un cuerpo más grande y plano, dichos cambios se asocian con la detención del ciclo celular en la fase G1/G2 tras la generación de contenido intracelular para la división celular y su acumulación en el citoplasma y núcleo; también se caracterizan por tener un núcleo celular grande o multinucleado, reorganización de cromatina en heterocromatina secundario a la pérdida de lámina β -1 de la superficie interna de la envoltura nuclear, se observa vacuolización, granularidad y restos celulares en el citoplasma (27).

Los orgánulos muestran cambios morfológicos anormales, como mitocondrias inflamadas, aumento en el número de lisosomas y expansión del retículo endoplásmico, lo cual está regulado por el factor de transcripción ATF6 α . Ocurre alteración en las fibras de actina y redistribución de las placas de adhesión focal (27).

La senescencia reduce la capacidad funcional celular para realizar funciones tisulares normales, hay un cambio hacia un aumento de la glucólisis con una actividad desequilibrada de las enzimas glucolíticas resultando en un estado energético reducido, las mitocondrias muestran una capacidad de fosforilación oxidativa deteriorada y un potencial de membrana interno reducido, resultando en una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (26). La actividad de la galactosidasa lisosomal aumenta significativamente como consecuencia del aumento de la masa lisosomal; la capacidad de sintetizar proteínas se ve alterada, se acumulan proteínas mal plegadas que inducen repuestas de estrés en el retículo endoplasmático (26).

3.5.3. Senescencia celular y cáncer

La senescencia celular puede tener efectos beneficiosos y perjudiciales en cáncer, puede representar una barrera supresora de tumores al bloquear la proliferación de células dañadas, pero puede facilitar la progresión del cáncer al activar metaloproteinasas de matriz (32).

La activación de oncogenes y el daño irreversible al ADN induce la activación de ATM y CHK2, lo que conduce a la fosforilación de la histona H2AX y P53 con la activación de la vía de p53-p21, otras vías como NLRP6-NF- κ B-p14^{ARF}-MDM2 y miR-203-ITPKA-MDM2 pueden activar la vía de p53-p21. En células de cáncer de mama la sobreexpresión del

oncogén ERBB2 induce senescencia a través del aumento de p21 independiente de p53. Estas vías conducen a la detención del ciclo celular; sin embargo, el microambiente inflamatorio crónico provocado por SASP puede promover la tumorigénesis (27,28).

Muchos factores SASP tienen funciones supresoras de tumores mediante cascadas de señalización autocrinas y paracrinas, atrayendo y activando células del sistema inmunitario para promover una respuesta antitumoral innata y adaptativa como el reclutamiento y activación de células T y células NK promoviendo la eliminación de células senescentes; sin embargo, de manera paradójica la expresión de estos factores también puede facilitar la progresión del cáncer al promover el crecimiento de células preneoplásicas y modificar el microambiente del tumor (26).

Los fibroblastos senescentes promueven un microambiente idóneo para el crecimiento de células epiteliales de mama premalignas y malignas, células epiteliales de próstata, queratinocitos y melanocitos, pero no de células normales. El efecto de las proteasas sobre la matriz extracelular altera el microambiente tumoral promoviendo la motilidad y la invasión de las células tumorales; las células estromales senescentes pueden conducir a la transición de epitelial a mesenquimal, mecanismo importante de la progresión tumoral. (26,27).

3.5.4. Marcadores de senescencia

Las células senescentes pueden expresar varios marcadores que pueden ser utilizados para identificarlas, algunos ejemplos son: los inhibidores del ciclo celular, factores SASP y la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa (33). Sin embargo, debe considerarse que la presencia de estos marcadores dependerá del tipo de célula y del estímulo que indujo la senescencia, además, la expresión de estos marcadores puede variar dentro del mismo tipo celular (34).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es uno de los cánceres más comunes en el mundo con una incidencia de 40.5 y una mortalidad del 10.6 por cada 100,000 habitantes, en México ocupa el primer lugar de prevalencia y mortalidad de todos los tipos de cáncer (1). Su tratamiento basado en cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia conlleva altos costos representando una carga financiera para los sistemas sanitarios y para los mismos pacientes, además de que no todas estas modalidades terapéuticas son fácilmente accesibles para la mayoría de la población.

El tratamiento del cáncer de mama en etapas tempranas es considerado como curable gracias a los avances en su tratamiento que han aumentado las posibilidades de curación en aproximadamente 70-80% (4), sin embargo, a pesar de las opciones terapéuticas actualmente disponibles, la enfermedad avanzada con metástasis se considera no curable. Lo anterior plantea la necesidad urgente de encontrar otras opciones anticancerígenas que adopten un potencial preventivo y terapéutico que permitan prolongar la sobrevida y controlar los síntomas, idealmente a bajo costo, más efectivos y con menor toxicidad.

En los últimos 20 años el apoyo nutricional como parte integral del tratamiento del cáncer ha tenido un mayor interés, existe evidencia de la asociación de terapias de suplementación con macro y micro nutrientes (vitaminas, ácidos grasos, antioxidantes, minerales) y el pronóstico, calidad de vida y eficacia de las terapias antitumorales (36). En nuestro equipo de trabajo, la suplementación de cultivos de la línea celular T47D con vitamina D y dexametasona ha mostrado de manera preliminar que la dexametasona aumenta la expresión del receptor VDR y disminuye la viabilidad de esta línea celular.

En este escenario, el uso de vitamina D y dexametasona para el tratamiento del cáncer de mama, en conjunto con diferentes tipos de fármacos antineoplásicos podría mejorar sus efectos beneficiosos de forma aditiva o sinérgica; la vitamina D y sus análogos se han asociado con un efecto antineoplásico a través de la modulación del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis de células cancerosas; por otro lado, los glucocorticoides, como la dexametasona, ejercen sus efectos terapéuticos mediante la supresión de la inflamación, su actividad inmunitaria y la inducción de la apoptosis en diferentes tipos de cáncer (12,19).

Mediante este proyecto de investigación se estudiaron los mecanismos asociados con el potencial anticancerígeno de la vitamina D y la dexametasona a nivel del mecanismo de senescencia y ciclo celular con la finalidad de aportar información para la identificación de posibles blancos terapéuticos y en el futuro, el desarrollo de fármacos específicos con efectos preventivos y terapéuticos, con pocos o idealmente, nulos efectos adversos.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles son los cambios en la expresión de las moléculas que regulan el ciclo celular y la senescencia en células de cáncer de mama humano T47D tratadas con vitamina D y dexametasona?

5. JUSTIFICACIÓN

Estudios actuales señalan que compuestos como la vitamina D y los glucocorticoides, específicamente la dexametasona, poseen propiedades antineoplásicas que pueden actuar sobre múltiples vías de señalización, las cuales incluyen la modulación del crecimiento, la apoptosis y la diferenciación celular (17,37), sin embargo, su papel como terapias adyuvantes en la prevención y manejo del cáncer de mamá continua en debate debido a la dualidad de efectos reportados, remarcando la importancia de estudios que profundicen en los mecanismos moleculares involucrados.

Un mecanismo poco estudiado es la capacidad que pueden tener la vitamina D y la dexametasona para inducir senescencia celular, estado irreversible de detención del ciclo celular, el cual se ha descrito como una barrera que puede limitar la progresión tumoral. No obstante, este estado de mantenerse en el tiempo puede originar un microambiente protumoral que promueve la inflamación crónica, angiogénesis y metástasis (29).

Frente a este escenario, el presente proyecto buscó aportar conocimiento sobre los efectos moleculares de la vitamina D y la dexametasona en células de cáncer de mama humano T47D, al evaluar su impacto específico sobre un marcador de senescencia, β galactosidasa, y sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, buscando fortalecer la base científica sobre su posible potencial antineoplásico, cuyo desarrollo a futuro permita establecer pautas terapéuticas para el uso de vitamina D como agente adyuvante en el manejo de cáncer de mamá, y se continúen explorando los mecanismos antineoplásicos de los glucocorticoides; a largo plazo se incorporen tratamientos personalizados basados en los niveles séricos de vitamina D y en la variabilidad de la expresión de los receptores VDR y glucocorticoide, que permita mejorar las opciones de tratamiento de pacientes con cáncer de mama.

6. HIPÓTESIS

6.1. Hipótesis alterna

Las células de cáncer de mama humano T47D suplementadas con vitamina D, dexametasona y su combinación modifica la síntesis de proteínas reguladores del ciclo celular y senescencia relacionado con su potencial antineoplásico.

6.2. Hipótesis nula

Las células de cáncer de mama humano T47D suplementadas con vitamina D, dexametasona y su combinación no modifican la síntesis de proteínas reguladoras del ciclo celular y senescencia relacionadas con su potencial antineoplásico.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Identificar las modificaciones moleculares en el ciclo celular y senescencia de células de cáncer de mama humano T47D suplementadas con vitamina D, dexametasona y su combinación a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

7.2. Objetivos específicos

- Analizar el efecto individual de la vitamina D y la dexametasona en el cambio de la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa en la línea celular T47D, expuestas a concentraciones y tiempos de exposición crecientes.
- Evaluar el efecto sinérgico de la combinación de vitamina D más dexametasona en el cambio de la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa en la línea celular T47D.
- Determinar si la suplementación individual con vitamina D y dexametasona modifica la expresión de las proteínas fosforiladas CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161) en la línea celular T47D, expuestas a concentraciones y tiempos de exposición crecientes.
- Evaluar el efecto sinérgico de la combinación de vitamina D más dexametasona en la modificación de la expresión de las proteínas fosforiladas CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161) en la línea celular T47D.
- Describir la relación de la inducción del estado senescente con el cambio en la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular como posible mecanismo antineoplásico de la vitamina D y la dexametasona.

8. METODOLOGÍA

8.1. Diseño del estudio

Experimental, comparativo y prospectivo.

8.2. Universo de Trabajo

Células epiteliales de cáncer de mama ductal de la línea celular T47D, establecido a partir del derrame pleural de un carcinoma ductal de mama de una mujer de 54 años.

8.3. Método de muestreo

Por conveniencia.

8.4. Tamaño de muestra

Cultivos de 1×10^6 de células por muestra, cultivo por triplicado para cada grupo.

8.5. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión

Cultivos de la línea celular T47D:

- Con una confluencia del 70%.
- Libres de contaminantes (bacterias y hongos).

Exclusión

Cultivos de la línea celular T47D

- Con una confluencia menor del 70%.

Eliminación

- Contaminación de los cultivos.

8.6. Procedimientos

8.6.1. Cultivo Celular

Se realizaron cultivos de la línea celular de cáncer de mama humano T47D, en medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM) adicionado con antibióticos y suplementado al 10% con suero fetal bovino a 37°C y atmósfera del 5% de CO₂.

8.6.2. Suplementación y tratamiento de los grupos de estudio

Se realizó la suplementación y tratamiento de acuerdo con los siguientes cuatro grupos:

- Grupo control sin suplementación/tratamiento.
- Grupo de colecalciferol a concentraciones de 10, 40, y 100 μM .
- Grupo de dexametasona a concentraciones de 5, 10 y 40 μM .
- Grupo combinación de vitamina D + dexametasona dosis bajas (5 μM / 10 μM) y dosis altas (100 μM / 40 μM).

Cada grupo tubo un tiempo de exposición a la suplementación con colecalciferol, dexametasona y su combinación de 24, 48 y 72 h.

8.6.3. Extracción de proteínas totales

Se retiró el medio de cultivo suplementado/tratado, las células se lavaron con PBS1x. Se incubaron las placas con 1-2 mL de tripsina-EDTA por 5 minutos. Se agregaron 5 mL de medio DMEM completo y se recolectó todo el contenido de la placa en tubos de centrifuga de 15 mL. Se centrifugaron los tubos durante 5 min a 3,000 rpm (314.16 rad/s), se descartó el sobrenadante y se retiró todo el medio. Posteriormente se resuspendieron las células y se añadieron 100 μL de solución de lisis, constituida por 10 mL de Tris 0.5M pH 6.8, 50 μL de EDTA 0.2M pH 8.0, 200 μL de EGTA 50mM pH 7.9, 102 μL de β -mercaptoetanol, 1 mL de IGEPAL. Se recuperaron las células en un tubo de 1.5 mL y se incubaron en hielo durante 45 min. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 13,000 rpm (1361.36 rad/s) por 25 min. Se recuperó el sobrenadante.

Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (BIO-RAD), utilizando como proteína de referencia albúmina bovina 2 mg/ml, y se prepararon los estándares a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL como se indica en la siguiente tabla para generar una curva de calibración:

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

Se preparó el reactivo de Bradford con agua destilada diluída 1:4, se preparó la cantidad de 200 μL /pozo. En una placa de 96 pozos se agregó, por duplicado, 5 μL de estándares y 1 μL de muestra. Se utilizó buffer de lisis como control negativo. Se realizó la lectura con espectrofotómetro con una longitud de onda de 595 nm. Se ajustaron las muestras para una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, considerando que se agregó buffer de carga (*sample loading buffer* SLB) 4x. Se calentaron las muestras a 95°C por 5 min. Posteriormente se incubaron 5 min en hielo antes de cargarlas.

8.6.4. Western Blot

Se utilizó la técnica de *Western blot* para determinar de manera semicuantitativa la producción de las cinasas dependientes de ciclina CDK2 (Thr160) y cdc (Thr161). Se realizó

la electroforesis desnaturante SDS-PAGE, usando un gel concentrador al 4 % y un gel separador al 10%. Se cargaron 35 µg de proteína de las muestras del lisado celular, así como marcador de peso molecular. Se corrió el gel a voltaje constante de 80 V durante 3 horas hasta que el frente de corrimiento llegó al final del gel.

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente sumergida en metanol por 30 segundos y enjuagada con buffer de transferencia. Se colocó el gel sobre la membrana en la cámara de transferencia y se llevó a cabo la transferencia durante 30 minutos a un voltaje de 25 V. Finalizada la transferencia se enjuagó la membrana con una solución de TBS Tween 20 y BSA al 1% durante 10 minutos, a temperatura ambiente en agitación suave.

Los anticuerpos anti CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161) se usaron a una concentración de 1:1,000 en BSA 1%. Se incubaron con la membrana durante toda la noche en agitación suave a 4°C. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS Tween 20 durante 5 min. Se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) ANTI-RABBIT IgG (Sigma A-2554), diluido en BSA al 1% a una dilución de 1:1000. La incubación se realizó durante dos horas en agitación suave, al término de la incubación las membranas se lavaron tres veces durante 5 min con TBS Tween 20. La membrana fue revelada con diaminobencidina (DAB) utilizando 150 µL de DAB y 30 µL de H₂O₂ en 10 mL de PBS. Los resultados obtenidos de la determinación de densidad óptica de las bandas de proteína fueron normalizados con base en el valor de densidad óptica del control para cada muestra. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ.

8.6.5. Técnica de β-galactosidasa

La actividad de la enzima β-galactosidasa se examinó con el Kit de tinción histoquímica de células senescentes (SIGMA-ALDRICH CS0039). Se retiró el medio de cultivo suplementado después de transcurrido el tiempo de exposición de acuerdo con cada grupo, se lavó 2 veces con 1 ml de PBS, cuidadosamente se retiró la totalidad de la solución de lavado por aspiración evitando despegar las células. Se agregó 1.5 ml del buffer de fijación y se incubó a temperatura ambiente durante 7 min. Posteriormente, se enjuagó 3 veces con PBS, se agregó 1 ml de la mezcla de tinción, se incubó a 37°C sin CO₂ hasta que las células se tiñeron de azul cubriendo la muestra para evitar que se seque. Se observaron las células por medio de microscopía de campo claro, se contó el número de células teñidas de azul y el número total de células por campo, se obtuvo el porcentaje de células que expresaban galactosidasa mediante el programa ImageJ.

8.7. Variables de estudio

Dependientes: Expresión de las proteínas CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161) y actividad de β-galactosidasa.

Independientes: Suplementación con vitamina D, Dexametasona y su combinación; tiempo de exposición.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de Medición	Análisis estadístico
DEPENDIENTES					
Cinasas dependientes de ciclinas CDK2 (Thr160), cdc2 (Thr161).	Serina/treonina quinasas cuyas actividades catalíticas están reguladas por interacciones con ciclinas e inhibidores de CDK. Son enzimas reguladoras clave involucradas en la proliferación celular mediante la regulación de puntos de control del ciclo celular y eventos transcripcionales en respuesta a señales extracelulares e intracelulares.	Expresión de CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161) en proteínas totales extraídas de células de cáncer de mama humano T47D	Semicuantitativa	Densidad óptica	ANOVA BIFACTORIAL
β -Galactosidasa lisosomal	Hidrolasa lisosomal, escinde los residuos terminales de β -D-galactósidos como la lactosa, los sulfatos de queratina, los esfingolípidos, entre otros.	Biomarcador cuya actividad es asociada a la senescencia, detectable a un pH de 6 que permite la identificación de células senescentes en cultivos y tejidos de mamíferos	Cuantitativa	% de células que expresan β -Galactosidasa	ANOVA DE UNA VÍA

8.8. Implicaciones bioéticas

Este protocolo se llevó a cabo tomando en consideración lo establecido en el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud, en su capítulo VI de la investigación en órganos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos y de control sanitario del mismo.

El uso de la línea celular para el desarrollo de este proyecto de investigación, células de cáncer de mama humano T47D, fue únicamente con fines de investigación para examinar los efectos directos sobre el fenotipo celular respecto a su proliferación, sin fines de uso terapéutico, consumo animal o humano o de uso diagnóstico.

Además, se aplicaron las recomendaciones establecidas en los reglamentos para el manejo de residuos peligrosos que aplicó para las técnicas de laboratorio que fueron empleadas en el desarrollo de este protocolo.

8.9. Análisis estadísticos

Se evaluó la normalidad de los datos obtenidos y se realizó la prueba ANOVA de una vía para realizar la comparación de los efectos de la concentración y tiempos de exposición sobre las variables dependientes, se utilizó como prueba post hoc la prueba de Tukey. El nivel de significancia que se utilizó fue del 5%. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism 8.0.1.

9. RESULTADOS

9.1. Carta de envío



[Manuscript Home](#)
[Author Instructions](#)
[Reviewer Instructions](#)
[Contact](#)
[Journal home](#)
[Change Journal](#)
[Logout](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	CRC-25-0622															
Current Revision #	0															
Submission Date	2025-10-13 12:39:27															
Title	Induction of senescence in breast cancer cells treated with dexamethasone and vitamin D															
Running Title	Senescence in breast cancer cells related to cell cycle															
Manuscript Type	Research Article: General															
Section	Therapeutic Research and Development															
Corresponding Author	Dr. Irazu Contreras García (Universidad Autónoma del Estado de México)															
Contributing Authors	Jorge E. Dotor-Hernández , Dr. Luis A. Zapi-Colín , Dr. Rubén López-Santiago , Dr. José A. Estrada															
Abstract	<p>Breast cancer is the most common neoplasm worldwide. It is a heterogeneous disease with multiple subtypes and involves various environmental and genetic risk factors. Dexamethasone and vitamin D are commonly used as adjuvants in breast cancer patients and have gained attention due to their potential antineoplastic effects, as they can modulate cell differentiation, proliferation, apoptosis, and certain immune functions; however, their role in breast cancer therapy remains unclear.</p> <p>This study analyzed the effect of treatment with dexamethasone, vitamin D or their combination, on the induction of senescence in human breast cancer cell line T47D, by assessment of lysosomal β-galactosidase activity and phosphorylation of cell cycle proteins cdc2 (Thr161) and CDK2 (Thr160). Cells treated with dexamethasone showed increased senescence-associated β-galactosidase activity and phosphorylation of cdc2 in a dose- and time-dependent manner, whereas treatment with vitamin D only showed a significant increase in β-galactosidase activity at the highest dose and exposure time, along with a non-significant trend toward increased CDK2 phosphorylation. Combination of both treatments showed potential synergistic effects on the induction of senescence.</p> <p>Our findings suggest that direct supplementation with dexamethasone promotes phosphorylation of cdc2 and cell cycle arrest at the G2/M transition, promoting a senescent phenotype in breast cancer cells.</p> <p>Word Count: 199</p>															
Significance	Our study explored changes in the presence of lysosomal senescence-associated β -galactosidase and the activity of key proteins involved in the regulation of cell cycle progression following stimulation of T47D cells with dexamethasone and vitamin D. Our results indicate that dexamethasone can enhance lysosomal β -galactosidase activity and this effect is probably associated with cell cycle arrest at the G2/M phase.															
Keywords	CELL CYCLE/Cell cycle checkpoints, CELL CYCLE/CELL CYCLE, BREAST CANCER/BREAST CANCER, CELL SIGNALING/CELL SIGNALING															
Funding Body Archiving Mandates	No Funders															
AACR Member	No															
Methods	Expand															
Use of Generative AI	Was generative AI used in any way to assist with the generation of this manuscript or the data supporting it? For more information, please see https://aacriournals.org/pages/editorial-policies#ai . No															
Request for Guaranteed Peer Review	No															
Information Authorization	Has authorization been given to use any information conveyed by either personal communication or release of unpublished experimental data? Yes															
SciScore Score	Processed <table border="1"> <thead> <tr> <th>Received</th> <th>Score</th> <th>Methods Text</th> <th>Report</th> <th>Table</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2025-10-13 11:19:54</td> <td>5</td> <td>View Methods</td> <td>Display</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2025-10-09 17:32:48</td> <td>3</td> <td>View Methods</td> <td>Display</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Received	Score	Methods Text	Report	Table	2025-10-13 11:19:54	5	View Methods	Display		2025-10-09 17:32:48	3	View Methods	Display	
Received	Score	Methods Text	Report	Table												
2025-10-13 11:19:54	5	View Methods	Display													
2025-10-09 17:32:48	3	View Methods	Display													

Stage	Start Date
Initial QC	2025-10-13 12:39:28
Manuscript Submission	2025-10-09 16:36:43

9.2. Resumen del artículo

Abstract

Breast cancer is the most common neoplasm worldwide. It is a heterogeneous disease with multiple subtypes and involves various environmental and genetic risk factors. Dexamethasone and vitamin D are commonly used as adjuvants in breast cancer patients and have gained attention due to their potential antineoplastic effects, as they can modulate cell differentiation, proliferation, apoptosis, and certain immune functions; however, their role in breast cancer therapy remains unclear.

This study analyzed the effect of treatment with dexamethasone, vitamin D or their combination, on the induction of senescence in human breast cancer cell line T47D, by assessment of lysosomal β -galactosidase activity and phosphorylation of cell cycle proteins cdc2 (Thr161) and CDK2 (Thr160). Cells treated with dexamethasone showed increased senescence-associated β -galactosidase activity and phosphorylation of cdc2 in a dose- and time-dependent manner, whereas treatment with vitamin D only showed a significant increase in β -galactosidase activity at the highest dose and exposure time, along with a nonsignificant trend toward increased CDK2 phosphorylation. Combination of both treatments showed potential synergistic effects on the induction of senescence.

Our findings suggest that direct supplementation with dexamethasone promotes phosphorylation of cdc2 and cell cycle arrest at the G2/M transition, promoting a senescent phenotype in breast cancer cells.

10. DISCUSIÓN

El efecto directo sobre modelos celulares de cáncer de mama de la suplementación con vitamina D y dexametasona en la inducción de senescencia no ha sido estudiado ampliamente. Se ha demostrado en estudios anteriores que la vitamina D y glucocorticoides como la dexametasona están implicados en la regulación de diferentes vías de señalización que modulan procesos celulares importantes en la proliferación, apoptosis, diferenciación, inflamación, invasión, angiogénesis, metabolismo y respuesta inmunológica las cuales son vías comunes a los procesos que impulsan o inhiben el desarrollo tumoral (38,39).

En nuestro estudio se encontró que el tratamiento con vitamina D a concentraciones de 100 μM por 72 horas, y con dexametasona con concentraciones de 5,10 y 40 μM durante los tres tiempos de exposición incrementaron el porcentaje de células senescentes en comparación con sus grupos control negativo; el uso conjunto de vitamina D (100 μM) más dexametasona (40 μM) mostraron una acción sinérgica en la inducción del estado senescente.

Aunque no hay estudios centrados en el efecto directo como inductores de senescencia de la vitamina D y la dexametasona sobre modelos celulares, investigaciones previas han estudiado efectos relacionados. Se ha reportado que concentraciones crecientes de vitamina D (7.78-500 μM) reducen de forma dosis-dependiente la viabilidad celular en las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB231 y MCF7 tras 24, 48 y 72 horas de exposición (40). Otros estudios destacan la asociación entre niveles séricos bajos de vitamina D con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (37). En contraste con nuestros hallazgos, estudios con dexametasona (1 μM por 24h) en las líneas MDA-MB-231, Hs578t, MCF7s, SK-BR y T47D indican un aumento en la proliferación y migración celular, especialmente en las líneas triple negativas (41).

Además de evaluar la capacidad de la vitamina D y la dexametasona para inducir senescencia celular, se examinó el efecto sobre la expresión de proteínas que son clave en la regulación del ciclo celular: CDK2 (Thr160) esencial para la transición de la fase G1 a S, y cdc2 (Thr161) fundamental para el paso de G2 a M (42). En este estudio no se observaron diferencias en la expresión de las proteínas CDK2 (Thr160) y de cdc2 (Thr161) tras la suplementación con vitamina D, esto difiere con estudios previos los cuales indican que la vitamina D puede inducir el arresto del ciclo celular principalmente en G0/G1, mientras que su efecto en G2/M se ha reportado con menor frecuencia en estudios *in vitro* (43).

La suplementación con dexametasona redujo la expresión de cdc2 (Thr161) en células expuestas a 40 μM durante 24 h y en las tres concentraciones probadas (5, 10 y 40 μM) tras 72 h. Un estudio previo reportó que el tratamiento con 39.25 $\mu\text{g/mL}$ de dexametasona en células TAMR-1 incrementó el arresto celular en la fase G2/M (44), resultado que coincide con nuestros hallazgos. Se evaluó el efecto combinado de vitamina D y dexametasona en sus concentraciones más altas (100 μM + 40 μM) sobre la expresión de CDK2 (Thr160) y cdc2 (Thr161), los resultados obtenidos indican que esta combinación redujo significativamente la expresión de cdc2 (Thr161) en los tres tiempos de exposición y de CDK2 (Thr160) tras 24 horas de tratamiento.

En resumen, nuestros resultados indican que el potencial antineoplásico de la vitamina D y la dexametasona está vinculado a su capacidad para inducir senescencia en células de cáncer de mama T47D *in vitro*, con una detención estable del ciclo celular en G2/M, regulada por la vía p53/p21^{WAF1/CIP1}. Aunque estos hallazgos destacan la senescencia como posible mecanismo antineoplásico, se requieren estudios adicionales para validar estos resultados. Es fundamental analizar marcadores adicionales de senescencia, profundizar en los mecanismos involucrados y evaluar el impacto de la vitamina D y la dexametasona en la inducción del SASP, considerando sus efectos en el microambiente tumoral y su relevancia clínica.

11. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio revelaron que ambas sustancias, vitamina D y dexametasona, aumentan la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa, marcador asociado a senescencia celular, además de promover una detención estable del ciclo celular en la fase G2/M, regulada por la vía p53/p21^{WAF1/CIP1}.

Si bien la senescencia celular puede actuar como un mecanismo supresor del crecimiento tumoral al frenar la proliferación celular, también podría contribuir a la progresión del cáncer en ciertos contextos. Estudios previos han señalado que las células en senescencia prolongada pueden desarrollar el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), cuyos factores pueden modificar el microambiente tumoral. Facilitando la proliferación celular y la metástasis; esto subraya la dualidad de la senescencia como posible estrategia terapéutica y la necesidad de evaluar cuidadosamente su impacto.

Por tanto, aunque la vitamina D y la dexametasona muestran potencial como agentes moduladores del ciclo celular en modelos *in vitro*, es fundamental profundizar en sus efectos a nivel del microambiente tumoral. La identificación de marcadores adicionales y el estudio de la influencia del SASP serán clave para determinar su relevancia clínica y definir estrategias terapéuticas con un enfoque individualizado del riesgo-beneficio.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3): 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
2. Palmero Picazo J, Lassard Rosenthal J, Juárez Aguilar LA, Medina Núñez CA. Cáncer de mama: una visión general. *Acta Médica Grupo Ángeles*. 2021;19(3): 354–360. <https://doi.org/10.35366/101727>.
3. Cárdenas-Sánchez J. Mexican consensus on breast cancer diagnosis and treatment. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2022;20(92). <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M21000215>.
4. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1): 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.
5. Garutti M, Foffano L, Mazzeo R, Michelotti A, Da Ros L, Viel A, et al. Hereditary Cancer Syndromes: A Comprehensive Review with a Visual Tool. *Genes*. 2023;14(5): 1025. <https://doi.org/10.3390/genes14051025>.
6. Turner KM, Yeo SK, Holm TM, Shaughnessy E, Guan JL. Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021;321(2): C343–C354. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00109.2021>.
7. Łukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*. 2021;13(17): 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>.
8. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment. *JAMA*. 2019;321(3): 288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.
9. Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(8): 808. <https://doi.org/10.3390/jpm11080808>.
10. Negri M, Gentile A, de Angelis C, Montò T, Patalano R, Colao A, et al. Vitamin D-Induced Molecular Mechanisms to Potentiate Cancer Therapy and to Reverse Drug-Resistance in Cancer Cells. *Nutrients*. 2020;12(6): 1798. <https://doi.org/10.3390/nu12061798>.
11. Carlberg C, Velleuer E. Vitamin D and the risk for cancer: A molecular analysis. *Biochemical Pharmacology*. 2022;196: 114735. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114735>.


12. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18): 6573. <https://doi.org/10.3390/ijms21186573>.
13. Voltan G, Cannito M, Ferrarese M, Ceccato F, Camozzi V. Vitamin D: An Overview of Gene Regulation, Ranging from Metabolism to Genomic Effects. *Genes*. 2023;14(9): 1691. <https://doi.org/10.3390/genes14091691>.
14. Carlberg C, Muñoz A. An update on vitamin D signaling and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2022;79: 217–230. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.018>.
15. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in Immunology*. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>.
16. Johnson KCC, Goldstein D, Tharakan J, Quiroga D, Kassem M, Grimm M, et al. The Immunomodulatory Effects of Dexamethasone on Neoadjuvant Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Oncology and Therapy*. 2023;11(3): 361–374. <https://doi.org/10.1007/s40487-023-00235-6>.
17. Nouredine LM, Trédan O, Hussein N, Badran B, Le Romancer M, Poulard C. Glucocorticoid Receptor: A Multifaceted Actor in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9): 4446. <https://doi.org/10.3390/ijms22094446>.
18. Mayayo-Peralta I, Zwart W, Prekovic S. Duality of glucocorticoid action in cancer: tumor-suppressor or oncogene? *Endocrine-Related Cancer*. 2021;28(6): R157–R171. <https://doi.org/10.1530/ERC-20-0489>.
19. Mitre-Aguilar IB, Moreno-Mitre D, Melendez-Zajgla J, Maldonado V, Jacobo-Herrera NJ, Ramirez-Gonzalez V, et al. The Role of Glucocorticoids in Breast Cancer Therapy. *Current Oncology*. 2022;30(1): 298–314. <https://doi.org/10.3390/curroncol30010024>.
20. Sinniah A, Yazid S, Flower RJ. From NSAIDs to Glucocorticoids and Beyond. *Cells*. 2021;10(12): 3524. <https://doi.org/10.3390/cells10123524>.
21. Zhidkova EM, Lylova ES, Savinkova A V, Mertsalov SA, Kirsanov KI, Belitsky GA, et al. A Brief Overview of the Paradoxical Role of Glucocorticoids in Breast Cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 2020;14: 117822342097466. <https://doi.org/10.1177/1178223420974667>.
22. Pang JM, Huang YC, Sun SP, Pan YR, Shen CY, Kao MC, et al. Effects of synthetic glucocorticoids on breast cancer progression. *Steroids*. 2020;164: 108738. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108738>.
23. Wang Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells*. 2021;10(12): 3327. <https://doi.org/10.3390/cells10123327>.

24. Suski JM, Braun M, Strmiska V, Sicinski P. Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell*. 2021;39(6): 759–778. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010>.
25. Ray S, Panda SK, Nayak SR, Behera S, Bhanja SS, Acharya V. A Review on Cell Cycle Checkpoints in Relation to Cancer. *The Journal of Medical Sciences*. 2020;5(4): 88–95. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10045-00138>.
26. Roger L, Tomas F, Gire V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23): 13173. <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>.
27. Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature Reviews Nephrology*. 2022;18(10): 611–627. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00601-z>.
28. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4): 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>.
29. Jin P, Duan X, Li L, Zhou P, Zou C, Xie K. Cellular senescence in cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *MedComm*. 2024;5(5). <https://doi.org/10.1002/mco2.542>.
30. Liao Z, Yeo HL, Wong SW, Zhao Y. Cellular Senescence: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biomedicines*. 2021;9(12): 1769. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121769>.
31. Kreis, Louwen, Yuan. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers*. 2019;11(9): 1220. <https://doi.org/10.3390/cancers11091220>.
32. Li C, Yuan Y, Jia Y, Zhou Q, Wang Q, Jiang X. Cellular senescence: from homeostasis to pathological implications and therapeutic strategies. *Frontiers in Immunology*. 2025;16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1534263>.
33. Ogrodnik M, Carlos Acosta J, Adams PD, d’Adda di Fagagna F, Baker DJ, Bishop CL, et al. Guidelines for minimal information on cellular senescence experimentation in vivo. *Cell*. 2024;187(16): 4150–4175. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.059>.
34. Dong Z, Luo Y, Yuan Z, Tian Y, Jin T, Xu F. Cellular senescence and SASP in tumor progression and therapeutic opportunities. *Molecular Cancer*. 2024;23(1): 181. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02096-7>.
35. Kamal N, Ilowefah MA, Hilles AR, Anua NA, Awin T, Alshwyeh HA, et al. Genesis and Mechanism of Some Cancer Types and an Overview on the Role of Diet and Nutrition in Cancer Prevention. *Molecules*. 2022;27(6): 1794. <https://doi.org/10.3390/molecules27061794>.

36. De Cicco P, Catani MV, Gasperi V, Sibilano M, Quaglietta M, Savini I. Nutrition and Breast Cancer: A Literature Review on Prevention, Treatment and Recurrence. *Nutrients*. 2019;11(7): 1514. <https://doi.org/10.3390/nu11071514>.
37. de La Puente-Yagüe M, Cuadrado-Cenzual MA, Ciudad-Cabañas MJ, Hernández-Cabria M, Collado-Yurrita L. Vitamin D: And its role in breast cancer. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2018;34(8): 423–427. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.03.004>.
38. Vanhevel J, Verlinden L, Doms S, Wildiers H, Verstuyf A. The role of vitamin D in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*. 2022;29(2): R33–R55. <https://doi.org/10.1530/ERC-21-0182>.
39. Pan D, Kocherginsky M, Conzen SD. Activation of the Glucocorticoid Receptor Is Associated with Poor Prognosis in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*. 2011;71(20): 6360–6370. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0362>.
40. Veeresh PKM, Basavaraju CG, Dallavalasa S, Anantharaju PG, Natraj SM, Sukocheva OA, et al. Vitamin D3 Inhibits the Viability of Breast Cancer Cells In Vitro and Ehrlich Ascites Carcinomas in Mice by Promoting Apoptosis and Cell Cycle Arrest and by Impeding Tumor Angiogenesis. *Cancers*. 2023;15(19): 4833. <https://doi.org/10.3390/cancers15194833>.
41. Crozier M, Tubman J, Fifield BA, Ferraiuolo RM, Ritchie J, Zuccato K, et al. Frequently used antiemetic agent dexamethasone enhances the metastatic behaviour of select breast cancer cells. *PLOS ONE*. 2022;17(9): e0274675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274675>.
42. 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 Transduction and Targeted Therapy*. 2025;10(1): 11. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02080-z>.
43. Bhoora S, Punchoo R. Policing Cancer: Vitamin D Arrests the Cell Cycle. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(23): 9296. <https://doi.org/10.3390/ijms21239296>.
44. Gaballah AI, Elsherbiny AA, Sharaky M, Hamed NO, Raslan NA, Almilaibary A, et al. Dexamethasone–tamoxifen combination exerts synergistic therapeutic effects in tamoxifen-resistance breast cancer cells. *Bioscience Reports*. 2024;44(7). <https://doi.org/10.1042/BSR20240367>.

Jorge Edwin Dotor Hernandex

Tesis JEDH.docx

 Universidad Autónoma del Estado de México

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:516198178

Fecha de entrega

21 oct 2025, 3:34 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

21 oct 2025, 3:39 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

Tesis_Jorge Edwin Dotor Hernández.docx

Tamaño del archivo

1.2 MB

34 páginas

10.589 palabras

59.923 caracteres

18% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)
- ▶ Methods and Materials

Exclusiones


- ▶ N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 18%  Fuentes de Internet
- 3%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad




N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
25 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Fuentes principales

- 18%  Fuentes de Internet
- 3%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	Internet	ri.uaemex.mx	6%
2	Internet	hdl.handle.net	2%
3	Internet	dspace.ucacue.edu.ec	<1%
4	Internet	www.coursehero.com	<1%
5	Internet	vbook.pub	<1%
6	Internet	digibug.ugr.es	<1%
7	Internet	repositoriousco.co	<1%
8	Internet	rics.org.mx	<1%
9	Internet	www.jove.com	<1%
10	Internet	repositorio.uam.es	<1%
11	Internet	www.researchgate.net	<1%

12	Internet	revistas.anahuac.mx	<1%
13	Internet	www.scribd.com	<1%
14	Internet	link.springer.com	<1%
15	Internet	roderic.uv.es	<1%
16	Internet	www.scielo.org.mx	<1%
17	Internet	doi.org	<1%
18	Internet	es.slideshare.net	<1%
19	Internet	repositorio.unal.edu.co	<1%
20	Internet	repositorio.unemi.edu.ec	<1%
21	Internet	www.maulee.cl	<1%
22	Internet	patents.glgoo.top	<1%
23	Internet	cajalesygalileos.wordpress.com	<1%
24	Internet	diposit.ub.edu	<1%
25	Internet	rdu.unc.edu.ar	<1%

26	Internet	repositorio.ucam.edu	<1%
27	Internet	repositorio.uwiener.edu.pe	<1%
28	Internet	repositorioinstitucional.uaslp.mx	<1%
29	Internet	riunet.upv.es	<1%
30	Internet	www.colibri.udelar.edu.uy	<1%
31	Internet	www.elblogdelasalud.info	<1%
32	Internet	www.slideshare.net	<1%
33	Internet	1library.co	<1%
34	Publicación	Rafael Carlos Ferreira, Sâmia Sousa Duarte, Valgrécia Matias de Sousa, Ramon Ra...	<1%
35	Internet	files8.webydo.com	<1%
36	Internet	sedici.unlp.edu.ar	<1%
37	Publicación	Nataniel Lopes, Diogo Manuel Teixeira Monteiro, Rui Manuel Neto Matos, Sergio J...	<1%
38	Internet	ddd.uab.cat	<1%
39	Internet	doku.pub	<1%

40	Internet	epage.pub	<1%
41	Internet	es.unionpedia.org	<1%
42	Internet	pesquisa.bvsalud.org	<1%
43	Internet	repositorio.unne.edu.ar	<1%
44	Internet	repositorio2.unican.es	<1%
45	Internet	sciencenewsnet.in	<1%
46	Internet	www.databridgemarketresearch.com	<1%
47	Internet	www.grafiati.com	<1%
48	Internet	www.smorlccc.org.mx	<1%
49	Internet	www.stomachillness.com	<1%
50	Publicación	Milena Guerrero Florez, Olivia Alexandra Guerrero Gómez. "MicroRNAs asociados..."	<1%
51	Internet	conservancy.umn.edu	<1%
52	Internet	core.ac.uk	<1%
53	Internet	digibuo.uniovi.es	<1%

54	Internet	fr.slideshare.net	<1%
55	Internet	idoc.pub	<1%
56	Internet	journal.frontiersin.org	<1%
57	Internet	mejorconsalud.as.com	<1%
58	Internet	osau.edu.ua	<1%
59	Internet	patents.google.com	<1%
60	Internet	repositorio.ucsm.edu.pe	<1%
61	Internet	repositorio.xoc.uam.mx	<1%
62	Internet	www.cancer.gov	<1%
63	Internet	www.regionalcancer.org	<1%
64	Internet	www.rticcc.org	<1%
65	Internet	www.tdx.cat	<1%