

**UNIVERSIDAD LATINA DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. WILLIAM C. GORGAS**  
**PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Evaluación comparativa de la proliferación y respuesta a quimioterapia en esferas tumorales 3D derivadas de líneas celulares de cáncer de mama”**

**ELABORADO POR:**

Paulette Gabriela Pérez Afú

Ashlin Mariel Orocu Bello

**TRABAJO DESARROLLADO  
PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
BIOTECNOLOGÍA**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2026

## DECLARACIÓN JURADA

Yo, Paulette Pérez con cédula No. 8-993-2259, y Ashlin Orocu con cédula No. 8-979-2014, estudiantes graduandas de la carrera de Biotecnología declaro bajo la gravedad de juramento que el material que aparece en esta tesis de grado es de nuestra producción intelectual, en razón de lo cual asumo toda la responsabilidad sobre el uso de producción intelectual.

Firmado: \_\_\_\_\_

Cédula: \_\_\_\_\_

Firmado: \_\_\_\_\_

Cédula: \_\_\_\_\_

El Proyecto Final de Graduación de la carrera de Licenciatura en Biotecnología  
presentado por Paulette Pérez y Ashlin Orocu fue aprobado por el siguiente comité asesor:

**Asesor**

**Firma**

Doctora Erika N. Guerrero Houghton

Director

---

María Fernanda Alves Rosa

Jurado

---

Universidad Latina de Panamá

Panamá, República de Panamá

2026

## ***DEDICATORIA***

### **Paulette Gabriela Pérez Afú:**

Dedico este trabajo a mis padres, por ser mi apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. De ustedes aprendí que el esfuerzo, la disciplina y el sacrificio siempre dan frutos, y que los sueños se alcanzan con constancia y determinación. Cada logro mío lleva la huella de sus enseñanzas, su amor y su ejemplo.

A mi familia, quienes han sido un pilar fundamental a lo largo de este camino. A todos y cada uno de ustedes, por su respaldo sincero, por estar presentes en los momentos de duda y por brindarme apoyo en todo lo que fue necesario. Su confianza en mí se convirtió en una de mis mayores motivaciones para seguir adelante.

A mi asesora de tesis, la Dra. Erika Guerrero, por darme la oportunidad de formar parte de esta investigación y por inspirarme a crecer en el ámbito científico.

También dedico este logro a todas aquellas personas que hicieron que este proceso fuera más llevadero y significativo. A quienes, de distintas maneras, ofrecieron su ayuda, su tiempo, sus palabras de ánimo y su compañía. Cada gesto marcó una diferencia en esta etapa.

**Ashlin Mariel Orocu Bello:**

Dedico este trabajo, con profundo cariño y gratitud, a mi familia, quienes fueron mi mayor fuente de apoyo y fortaleza durante todo este camino. Su amor, comprensión y paciencia me acompañaron en cada etapa, incluso en los momentos de cansancio, dudas y sacrificios.

Asimismo, dedico este logro a todas las personas que estuvieron presentes a lo largo de este proceso, brindándome ánimo, confianza y palabras de aliento cuando más lo necesitaba. Cada gesto, cada consejo y cada muestra de apoyo fueron fundamentales para alcanzar esta meta.

Este trabajo es reflejo del esfuerzo compartido, del respaldo constante y del amor recibido, y representa no solo el cierre de una etapa académica, sino también el inicio de nuevos retos y oportunidades.

## ***AGRADECIMIENTO***

### **Paulette Gabriela Pérez Afú:**

Agradezco primeramente a Dios, por darme la sabiduría, la capacidad y la fortaleza necesarias para culminar esta etapa de crecimiento y superación. Por ser mi guía y permitirme vivir cada una de las experiencias que me han traído hasta este momento.

A mis padres, por ser mi mayor ejemplo de perseverancia y amor. Gracias por cada sacrificio que hicieron para que yo pudiera llegar hasta aquí, por enseñarme que los sueños se construyen con esfuerzo y por nunca dejar de creer en mí.

A la Dra. Erika Guerrero, por su paciencia, dedicación y compromiso a lo largo de esta investigación. Gracias por brindarme la oportunidad de ser parte de su proyecto, por confiar en mí y por su apoyo, especialmente cuando los resultados no eran los esperados. Más allá de su rol como tutora, admiro profundamente la persona que es y valoro todo lo aprendido bajo su guía.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas, por abrirme las puertas y brindarme el espacio y los recursos que hicieron posible la realización de este trabajo. Formar parte de este entorno científico aportó significativamente a mi formación académica y profesional.

A mis familiares, amigos y compañeros, así como a todas aquellas personas que estuvieron presentes de distintas maneras durante este proceso. Su apoyo, sus palabras oportunas y su compañía contribuyeron a la culminación de esta meta.

**Ashlin Mariel Orocu Bello:**

Primero le agradezco a Dios, por ser mi guía constante a lo largo de este camino académico, por brindarme fortaleza en los momentos de dificultad, claridad en las decisiones y la perseverancia necesaria para culminar esta etapa tan importante de mi formación profesional.

A mis tíos, de manera muy especial a mi tío Carlos Navarro y a mi tía Isalia Palacio, por su apoyo incondicional, su confianza en mí y por ser un pilar fundamental tanto en lo personal como en lo académico. Su acompañamiento, consejos y palabras de aliento fueron esenciales para no rendirme y seguir adelante aun en los momentos más exigentes de este proceso.

A mi tutora, Erika Guerrero, por su orientación, paciencia y compromiso durante el desarrollo de esta investigación. Su acompañamiento académico, sus observaciones oportunas y su disposición para guiarme contribuyeron de manera significativa al fortalecimiento de este trabajo y a mi crecimiento como futura profesional.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación en sus instalaciones, así como por el apoyo técnico y científico recibido. La experiencia adquirida en esta institución representó un aporte invaluable para mi formación académica y profesional.

De igual manera, agradezco a todas las personas que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de este trabajo, ya sea mediante apoyo académico, orientación o palabras de motivación a lo largo de este proceso.

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	I
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	III
<b>ÍNDICE</b> .....	V
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	VIII
<b>ÍNDICE DE TABLA</b> .....	VIII
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Planteamiento del problema .....	2
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivos .....	5
1.3.1 General .....	5
1.3.2 Específicos .....	5
1.4 Hipótesis.....	5
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	6
2.1 Introducción .....	7
2.1.1 Contexto general .....	8
2.1.2 Cáncer de mama como problema de salud pública .....	9
2.1.3 Heterogeneidad tumoral e importancia de los subtipos moleculares .....	10
2.1.4 Relevancia en salud pública .....	12
2.1.5 Avances terapéuticos y desafíos actuales.....	13
2.1.6 Heterogeneidad biológica y su impacto en la respuesta terapéutica .....	14
2.1.7 Transición hacia modelos preclínicos más predictivos .....	16
2.2 Modelos celulares en investigación.....	17
2.2.1 Modelos bidimensionales (2D) .....	17
2.2.2 Modelos tridimensionales (3D).....	18
2.2.3 Limitaciones de modelos 2D y valor del modelo 3D (esferoides) .....	19
2.3 ¿Por qué usar esferoides para proliferación y quimiorrespuestas?.....	22
2.4 Justificación de las líneas celulares .....	23
2.4.1 Línea celular MCF-7 (subtipo luminal, dependiente de estrógeno) .....	23
2.4.2 Línea celular MDA-MB-231 (subtipo triple negativo, altamente invasiva) .....	24
2.4.3 Justificación comparativa: extremos del espectro del cáncer de mama .....	25
2.5 Relevancia de los fármacos elegidos.....	26
2.5.1 Paclitaxel y Docetaxel.....	26
2.6 Vacío de conocimiento.....	27
2.6.1 Predominio de estudios en modelos 2D .....	27
2.6.2 Limitada evidencia comparativa en modelos 3D con MCF-7 y MDA-MB-231.....	28

<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
3.1 Diseño experimental.....	30
3.2 Materiales y reactivos.....	30
3.3 Líneas celulares y condiciones de cultivo .....	30
3.3.1 Cultivo y mantenimiento de células adherentes (2D).....	30
3.3.2 Cultivo y mantenimiento de esferas tumorales (3D).....	31
3.4 Proliferación celular .....	32
3.4.1 Formación de esferas tumorales .....	32
3.4.2 Curva de crecimiento .....	32
3.5 Análisis de la viabilidad celular .....	33
3.5.1 Ensayo MTT.....	33
3.6 Análisis molecular.....	34
3.6.1 Expresión génica mediante qPCR en tiempo real .....	34
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b> .....	37
4.1 Dinámica proliferativa en modelo bidimensional (2D).....	38
4.1.1 Cinética proliferativa de MDA-MB-231 en presencia de taxanos .....	38
4.1.2 Cinética proliferativa de MCF-7 en presencia de taxanos.....	39
4.1.3 Comparación del efecto de paclitaxel y docetaxel sobre la cinética proliferativa en 2D ...	39
4.2 Evaluación de viabilidad celular mediante ensayo MTT .....	40
4.2.1 Viabilidad celular en modelo 2D.....	41
4.2.2 Viabilidad celular en modelo 3D.....	42
4.3 Evaluación de citotoxicidad derivada del ensayo MTT .....	44
4.3.1 Citotoxicidad en modelo bidimensional (2D) .....	44
4.3.2 Citotoxicidad en modelo tridimensional (3D).....	46
4.4 Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR tras tratamiento con taxanos .....	48
4.4.1 Expresión de p21 .....	48
4.4.2 Expresión de BAX .....	50
4.4.3 Expresión de TUBB3 .....	51
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN</b> .....	53
5. Discusión.....	54
5.1 Dinámica proliferativa bajo tratamiento con taxanos en modelo 2D .....	54
5.2 Sensibilidad farmacológica en modelo 2D: análisis de viabilidad e IC <sub>50</sub> .....	55
5.3 Correlación entre viabilidad y citotoxicidad inducida por taxanos .....	57
5.4 Influencia de la arquitectura tridimensional en la respuesta farmacológica.....	57
5.5 Implicaciones biológicas y relevancia traslacional .....	59
5.6 Integración molecular de la respuesta a taxanos .....	60
5.6.1 Regulación de p21 en la respuesta a taxanos .....	61

5.6.2 Regulación de BAX y activación apoptótica inducida por taxanos .....	61
5.6.3 Alteraciones de TUBB3 y resistencia a taxanos .....	62
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	64
6.1 Conclusión.....	65
6.2 Limitaciones .....	66
6.3 Recomendaciones.....	67
Referencias bibliográficas .....	69
<b>CAPÍTULO VII: ANEXOS</b> .....	79

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfica 1. Curva de crecimiento de células MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con Paclitaxel y Docetaxel en modelos 2D.</i> .....	40
<i>Gráficas 2. Viabilidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 2D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.</i> .....	42
<i>Gráficas 3. Viabilidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 3D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.</i> .....	44
<i>Gráficas 4. Citotoxicidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 2D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.</i> .....	46
<i>Gráficas 5. Citotoxicidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 3D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.</i> .....	47
<i>Gráficas 6. Expresión relativa de p21 tras tratamiento con paclitaxel y docetaxel en modelos 2D y 3D.</i> .....	49
<i>Gráficas 7. Expresión relativa de BAX inducida por taxanos en modelos 2D y 3D.</i> .....	51
<i>Gráficas 8. Expresión relativa de TUBB3 en respuesta a taxanos en modelos 2D y 3D.</i> .....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Genes evaluados para el análisis molecular</i> .....	36
--	----

# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama constituye una de las neoplasias más prevalentes a nivel mundial y representa una de las principales causas de mortalidad en mujeres, pese a los avances alcanzados en su diagnóstico y tratamiento. En 2022, se estimaron 2,3 millones de casos nuevos y 670 000 muertes por cáncer de mama a escala global, lo que evidencia su elevada carga biológica y socioeconómica. La magnitud del problema demanda el desarrollo continuo de estrategias experimentales y terapéuticas más eficaces, sustentadas en evidencia reproducible y modelos preclínicos con mayor capacidad predictiva (World Health Organization, 2025).

Desde la biotecnología y la biología molecular, un reto central es comprender cómo la organización celular y el microambiente modulan la proliferación tumoral y la respuesta a compuestos antineoplásicos. Los taxanos, como el paclitaxel (PTX) y el docetaxel (DTX), actúan principalmente mediante la estabilización de microtúbulos y la alteración de la dinámica mitótica; sin embargo, su eficacia puede verse limitada por fenómenos de resistencia celular. Entre estos mecanismos se incluyen la sobreexpresión de transportadores de eflujo, cambios en el citoesqueleto, reprogramación de vías de supervivencia y variaciones en el estado proliferativo, factores que reducen la respuesta citotóxica bajo presión farmacológica (Vaidyanathan et al., 2016).

En investigación preclínica, la evaluación de proliferación y quimiorrespuesta se ha basado tradicionalmente en cultivos bidimensionales (2D). Aunque estos sistemas son reproducibles y permiten un control experimental estricto, no representan de forma adecuada la arquitectura tisular y la heterogeneidad microambiental de tumores sólidos, particularmente las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, ni los gradientes de oxígeno y nutrientes. Esta simplificación puede sesgar la interpretación de la potencia farmacológica y, en consecuencia, contribuir a discrepancias entre resultados *in vitro* y observaciones en sistemas biológicos más complejos (Edmondson et al., 2014).

Frente a estas limitaciones, los modelos tridimensionales (3D), como los esferoides multicelulares, han emergido como plataformas *in vitro* más fisiológicamente relevantes. En estos sistemas se generan gradientes internos y se favorecen interacciones espaciales que influyen en fenotipos de proliferación, supervivencia, expresión génica y resistencia a fármacos. Por ello, con frecuencia se observa una disminución de la sensibilidad a

quimioterápicos en 3D respecto de 2D, atribuible a barreras de difusión y penetración del fármaco, a la presencia de subpoblaciones quiescentes en regiones internas y a programas adaptativos inducidos por hipoxia y estrés metabólico (Kapałczyńska et al., 2016).

A pesar del crecimiento de la literatura sobre cultivos 3D, persisten vacíos de información en estudios comparativos que evalúen, bajo condiciones experimentales estandarizadas, las diferencias en proliferación y respuesta a taxanos entre líneas celulares de cáncer de mama con perfiles contrastantes, como MCF-7 y MDA-MB-231, tanto en modelos 2D como 3D. Abordar esta brecha permitirá optimizar la selección de modelos *in vitro*, fortalecer la interpretabilidad de los ensayos farmacológicos y mejorar la relevancia biotecnológica de los resultados para la investigación aplicada en cribado de fármacos y caracterización funcional de fenotipos tumorales.

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

El estudio de la respuesta a quimioterapia en cáncer de mama enfrenta un desafío metodológico clave: los modelos celulares bidimensionales (2D) tradicionales, aunque útiles para ensayos rápidos y reproducibles, no reproducen de manera adecuada la complejidad estructural del microambiente tumoral, lo cual puede sesgar la evaluación farmacodinámica de agentes antineoplásicos, ya que los gradientes de oxígeno, proliferación y matriz extracelular influyen en la sensibilidad a los fármacos (Breslin & O'Driscoll, 2016).

Los modelos tridimensionales (3D), especialmente los esferoides multicelulares, permiten formar estructuras celulares organizadas que generan gradientes internos fisiológicamente relevantes y establecen interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular más parecidas a las observadas *in vivo*. En estos sistemas, la eficacia de compuestos citotóxicos suele ser disminuida en comparación con cultivos 2D, lo que se ha observado tanto en líneas de cáncer de mama como en otros tumores sólidos, posicionando los cultivos 3D como una herramienta más representativa para análisis funcionales de fenotipos y de respuesta farmacológica (Cha et al., 2025).

Respecto a agentes basados en taxanos como PTX y DTX, diversos estudios han reportado que la resistencia observada en modelos 3D es mayor que en cultivos 2D, lo que se asocia tanto a barreras físicas de penetración como a diferencias en estados celulares proliferativos, activación de mecanismos de transporte y variaciones en la expresión de proteínas relacionadas con resistencia terapéutica (Lovitt et al., 2015).

Sin embargo, persisten vacíos metodológicos en estudios que comparen de manera estandarizada el comportamiento de líneas celulares de cáncer de mama con perfiles biológicos contrastantes, como MCF-7 y MDA-MB-231, cuando son expuestas a taxanos bajo condiciones experimentales equivalentes en modelos 2D y 3D. Este vacío limita la comprensión precisa de la interacción entre arquitectura microambiental y respuesta farmacológica, dificultando la identificación de modelos *in vitro* con mayor predictividad para cribado farmacológico (Imamura et al., 2015).

En este contexto, la presente investigación se justifica por su diseño comparativo sistemático entre modelos 2D y 3D bajo condiciones experimentales homogéneas, utilizando líneas celulares con perfiles biológicos contrastantes como MCF-7 y MDA-MB-231 para evaluar proliferación celular y sensibilidad a taxanos mediante parámetros cuantificables. Esta aproximación permitirá generar evidencia metodológica que fortalezca la selección de modelos *in vitro* con mayor relevancia predictiva en estudios de cribado farmacológico y caracterización funcional de fenotipos tumorales.

Finalmente, al aportar datos comparativos bajo un mismo esquema experimental, este estudio contribuirá a la estandarización de modelos tridimensionales en investigación oncológica y a desarrollar estrategias experimentales más robustas para el análisis funcional de fenotipos tumorales en el ámbito de la biología molecular.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 GENERAL**

- Evaluar y comparar la proliferación y respuesta a paclitaxel y docetaxel en esferoides 3D derivados de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, en comparación con cultivos 2D.

#### **1.3.2 ESPECÍFICOS**

- Caracterizar la formación de esferas tumorales.
- Determinar el IC<sub>50</sub> de paclitaxel y docetaxel, mediante ensayos de viabilidad (MTT).
- Caracterizar la proliferación de esfera tumorales en comparación con cultivos 2D.

### **1.4 HIPÓTESIS**

- El cultivo de esferas tumorales presenta mayor resistencia a taxanos en comparación con modelos de cultivo *in vitro* 2D.
- Los taxanos reducen mayormente la viabilidad celular en la línea MCF-7 en comparación con las células de cáncer triple negativo MDA-MB-231.

# **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un proceso biológico complejo caracterizado por proliferación descontrolada y expansión clonal de células con alteraciones genéticas y epigenéticas, acompañado de una marcada heterogeneidad molecular. Esta diversidad se expresa en diferencias en programas transcriptómicos, fenotipo celular, capacidad proliferativa y respuesta a agentes antineoplásicos, lo que constituye un reto para la interpretación experimental de la eficacia farmacológica (Weigelt et al., 2014). En este contexto, la investigación preclínica basada en modelos *in vitro* e *in vivo* resulta esencial para dilucidar mecanismos de progresión tumoral y de respuesta/adaptación a compuestos bioactivos.

Entre las herramientas experimentales más empleadas se encuentran los modelos de cultivo celular *in vitro*, los cuales permiten estudiar de forma controlada distintos aspectos del comportamiento tumoral. En particular, las líneas celulares humanas de cáncer de mama MCF-7, representativa del subtipo luminal, y MDA-MB-231, correspondiente al subtipo triple negativo, han sido ampliamente utilizadas debido a que exhiben fenotipos biológicos contrastantes (Holliday & Speirs, 2011). Estas líneas constituyen modelos relevantes para evaluar procesos de proliferación celular y respuesta a agentes quimioterapéuticos empleados en la práctica clínica.

Tradicionalmente, estos estudios se han desarrollado utilizando cultivos bidimensionales (2D), en los que las células crecen como monocapas adheridas a superficies planas. Si bien este enfoque ha permitido importantes avances en la comprensión de mecanismos celulares básicos, su capacidad para reproducir la complejidad estructural y funcional de los tumores sólidos es limitada. Los cultivos 2D no reflejan adecuadamente las interacciones célula-célula, la comunicación con la matriz extracelular ni los gradientes de oxígeno, nutrientes y señales bioquímicas presentes en el microambiente tumoral *in vivo*, factores que influyen de manera determinante en la respuesta terapéutica (Weigelt et al., 2014).

Como alternativa, los modelos tridimensionales (3D) de cultivo celular han emergido como sistemas experimentales más fisiológicamente relevantes. En estos modelos, las células forman estructuras multicelulares organizadas, como esferoides tumorales, que reproducen de manera más cercana la arquitectura del tumor y su microambiente

(Edmondson et al., 2014). La presencia de gradientes internos y una mayor complejidad estructural permite evaluar fenómenos biológicos que no son evidentes en cultivos 2D, incluyendo cambios en la proliferación, la supervivencia celular y la respuesta a fármacos antineoplásicos.

Diversos estudios han demostrado que la respuesta de las células tumorales a la quimioterapia puede diferir de forma significativa entre modelos 2D y 3D, evidenciando una menor sensibilidad a determinados agentes citotóxicos en condiciones tridimensionales. Estas diferencias han sido atribuidas, entre otros factores, a la organización celular, la limitada penetración de los fármacos y la influencia del microambiente tumoral. No obstante, a pesar del creciente interés en los modelos 3D, aún es necesario profundizar en la evaluación comparativa de la proliferación celular y la respuesta a quimioterapia en distintos subtipos de cáncer de mama utilizando sistemas tridimensionales bien caracterizados (Zhang et al., 2024).

En este contexto, el presente estudio se plantea como una aproximación experimental para evaluar de manera comparativa la proliferación celular y la respuesta a quimioterapia en modelos tridimensionales de esferas tumorales derivadas de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, contribuyendo a una mejor comprensión del impacto del modelo de cultivo en la evaluación preclínica de agentes quimioterapéuticos y resaltando la relevancia de los cultivos 3D como herramientas más representativas de la biología tumoral.

### **2.1.1 CONTEXTO GENERAL**

El cáncer de mama se define biológicamente como la proliferación descontrolada de células en la glándula mamaria, y este proceso da lugar a la formación de un tumor altamente complejo. Lo que comúnmente se siente es un bulto o masa extra de tejido, que puede notarse tanto en la superficie de la piel como debajo de ella. A veces puede doler o inflamarse, pero no siempre presenta síntomas visibles. Aunque tanto hombres como mujeres pueden desarrollar la enfermedad, las mujeres son mucho más propensas a padecerla. En términos de salud pública, este tipo de cáncer es la segunda neoplasia

maligna más diagnosticada entre las mujeres, y genera un impacto social y económico considerable (American Cancer Society, 2024).

La transformación tumoral suele asociarse con disrupciones en los puntos de control del ciclo celular y en vías de muerte celular programada, lo que favorece la proliferación sostenida. Adicionalmente, la aparición de resistencia a fármacos puede emerger por selección clonal, plasticidad fenotípica, reprogramación metabólica y mecanismos de transporte/eflujo, entre otros; esto limita la eficacia de compuestos citotóxicos y subraya la necesidad de comprender, a nivel molecular, cómo inducir muerte celular y/o vulnerabilizar subpoblaciones resistentes (Burgués Gasió et al., 2005).

La gran mayoría de los cánceres de mama corresponden a un tipo llamado adenocarcinoma, que surge principalmente en los conductos mamarios (alrededor del 85%) y en menor medida en los lobulillos (15%). Dentro de estos, la gravedad puede variar desde formas más localizadas hasta otras que invaden los tejidos vecinos y avanzan en la enfermedad. Existen también formas menos comunes, como la enfermedad de Paget o el cáncer mamario inflamatorio, y otros tipos muy raros como algunos sarcomas. Un aspecto fundamental para decidir cómo tratar el cáncer es conocer si las células tumorales tienen o no receptores hormonales o el receptor HER2, pues esta información guía las opciones de tratamiento más adecuadas (Katsura et al., 2022).

### **2.1.2 CÁNCER DE MAMA COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA**

En 2022, el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres alrededor del mundo, con un estimado de 2,3 millones de casos nuevos, lo que significa casi una décima parte de todos los cánceres que se detectaron ese año. Esta enfermedad también es una de las principales causas de muerte a nivel global, causando más de 660,000 defunciones. De hecho, en muchísimos países es el cáncer más diagnosticado en mujeres y también la principal causa de muertes por esta enfermedad (Bray et al., 2024).

Cuando el cáncer de mama está en una etapa avanzada, entre un 10-16% de los pacientes pueden desarrollar tumores secundarios en el cerebro, y esto suele venir acompañado de un pronóstico menos favorable y menor tiempo de vida. Este riesgo varía dependiendo

del subtipo específico del cáncer de mama, lo que influye mucho en el tratamiento y manejo del paciente (Tuasha & Petros, 2020).

América tuvo un papel significativo en la incidencia mundial, al concentrarse cerca de una cuarta parte de los nuevos casos en 2022, con más de 525.000 casos reportados. En particular, América Latina y el Caribe presentan una alta proporción de mujeres diagnosticadas antes de los 50 años, mucho más elevada que en Norteamérica. La tasa de mortalidad en mujeres jóvenes por esta enfermedad también es mayor en esta región en comparación con América del Norte (Organización Panamericana de la Salud, 2025).

El sexo femenino es el principal factor asociado a la incidencia poblacional, dado que la mayoría de los casos se diagnostican en mujeres. Aunque el cáncer de mama también puede presentarse en hombres, su frecuencia es baja; en términos biotecnológicos, esta distribución refleja interacciones complejas entre endocrinología, regulación transcripcional y susceptibilidad genética (World Health Organization, 2025).

### **2.1.3 HETEROGENEIDAD TUMORAL E IMPORTANCIA DE LOS SUBTIPOS MOLECULARES**

El cáncer de mama no es una enfermedad homogénea, sino que presenta una notable diversidad biológica. La heterogeneidad se expresa a nivel genómico, epigenómico, transcriptómico y proteómico, lo que da lugar a subpoblaciones celulares con diferentes características funcionales, agresividad y sensibilidad a los tratamientos (Tellez-Gabriel et al., 2016; Candanedo-Gonzalez et al., 2025).

Estudios recientes han demostrado que estas diferencias no solo varían entre un tumor y otro (heterogeneidad intertumoral), sino también dentro de un mismo tumor (heterogeneidad intratumoral), que además pueden cambiar con el tiempo y dependiendo de la ubicación dentro del tejido. Estas variaciones impactan aspectos clave como biomarcadores, metabolismo celular, la manera en que las células interactúan con su entorno, y la progresión clínica de la enfermedad (Guo et al., 2023).

Cuando se examinan las células tumorales, es evidente que no todas son iguales, incluso en tumores del mismo órgano o entre diferentes personas. Esta diferencia, conocida como heterogeneidad entre tumores, ayuda a clasificar los cánceres en distintos subtipos basados en sus características moleculares y marcadores expresados. Además, dentro de un solo tumor, las células pueden variar en comportamiento y funciones, lo que permite que el tumor se adapte a su entorno y cambie su potencial para crecer y diseminarse. Estos cambios también afectan la capacidad de ciertos tratamientos y dificultan la precisión de los diagnósticos basados en biopsias limitadas (Tellez-Gabriel et al., 2016).

El cáncer de mama es una enfermedad que cambia y evoluciona constantemente. A medida que avanza, tiende a volverse más complejo, al punto que el tumor original puede contener diferentes grupos de células, cada uno con características moleculares distintas y con respuestas variadas a la exposición experimental. Esta diversidad puede observarse en diferentes áreas del tumor o manifestarse a lo largo del tiempo, complicando el manejo clínico. Detectar y comprender esta heterogeneidad es fundamental para poder desarrollar terapias que realmente funcionen (Candanedo-Gonzalez et al., 2025).

#### Subtipos moleculares:

La clasificación molecular del cáncer de mama ha permitido identificar cuatro subtipos principales con implicaciones pronósticas y terapéuticas:

- El subtipo luminal A, es el más frecuente y se caracteriza por la expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (PR), suele asociarse con un mejor pronóstico y es llamado ER positivo.
- El luminal B comparte la positividad para receptores de estrógeno, pero presenta un índice proliferativo más alto y, en algunos casos, sobreexpresión de HER2.
- El cáncer de mama HER2 positivo se caracteriza por la ausencia de receptores hormonales y la sobreexpresión de HER2,
- El cáncer de mama triple negativo (TNBC), carece de los tres receptores, siendo el subtipo más agresivo y asociado a menor supervivencia.

Esta clasificación ha permitido optimizar la selección de terapias y personalizar los esquemas de exposición experimental (Martinez-Pacheco & O'Driscoll, 2021).

El tipo luminal de cáncer de mama comprende aproximadamente el 60% de los casos, caracterizado por la expresión de ER, aunque con mayor uniformidad en el tipo A que en el tipo B. Clínicamente, tiende a presentarse como una etapa temprana del cáncer. Se han desarrollado múltiples ensayos específicos para este subgrupo con el fin de proporcionar una guía para el manejo clínico óptimo de cada modelo celular. Hasta la fecha, este es el grupo de tumores donde las herramientas moleculares han tenido mayor éxito en la predicción del comportamiento biológico tumoral y las respuestas terapéuticas (Goldhirsch et al., 2013).

#### **2.1.4 RELEVANCIA EN SALUD PÚBLICA**

El cáncer de mama representa un problema prioritario de salud global, con desigualdades significativas en la incidencia y mortalidad según el nivel de desarrollo de los países. En naciones con un Índice de Desarrollo Humano (IDH) muy alto, se estima que una de cada doce (12) mujeres será diagnosticada con esta enfermedad a lo largo de su vida, y una de cada setenta (70) morirá a causa de ella. En cambio, en países con bajo IDH, aunque solo una de cada veintisiete (27) mujeres recibe el diagnóstico, la mortalidad es mayor con una de cada cuarenta y ocho (48) falleciendo por cáncer de mama. Estas diferencias reflejan la influencia del acceso a servicios de detección temprana, diagnóstico y tratamiento oportuno (World Health Organization, 2025b; Wilkinson & Gathani, 2021).

Según proyecciones recientes del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), para el año 2050 se espera un aumento del 38 % en la incidencia global del cáncer de mama y un incremento del 68 % en la mortalidad. Estas cifras enfatizan la necesidad de reforzar estrategias globales de prevención, detección temprana y tratamiento. La Iniciativa Mundial contra el Cáncer de Mama de la OMS busca reducir en un 2,5 % anual la mortalidad, lo que podría evitar 2,5 millones de muertes prematuras entre 2020 y 2040 (International Agency for Research on Cancer, 2025; Organización Panamericana de la Salud, 2025).

El cáncer, y en particular el de mamá, representa un reto creciente para la salud pública mundial debido al aumento de casos y muertes. Aunque las opciones disponibles, como

la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, ayudan a prolongar la vida, muchos obstáculos pueden limitar su efectividad (Bashi et al., 2024).

Al ser una enfermedad multifactorial, los factores causales asociados a esta enfermedad son diversos. Se desarrolla a partir de una combinación de factores genéticos, hormonales y ambientales. Se estima que solo entre el 5 y el 10% de los casos se deben a causas hereditarias, mientras que la mayoría están relacionadas con el entorno y estilo de vida. Además, existen diferentes tipos de cáncer de mama que varían según el tejido afectado y los mecanismos moleculares involucrados, lo que también influye en la agresividad de cada tumor (National Cancer Institute, 2023).

Además de su creciente incidencia, un desafío crítico en salud pública lo constituyen las limitaciones de los tratamientos convencionales, los efectos secundarios de los fármacos quimioterapéuticos y la falta de servicios de salud especializados en países en desarrollo. Estas barreras, junto con factores ambientales, genéticos y de estilo de vida, contribuyen al aumento de la carga de esta enfermedad, que sigue siendo un reto prioritario para los sistemas de salud (Bashi et al., 2024 b; Wilkinson & Gathani, 2021).

### **2.1.5 AVANCES TERAPÉUTICOS Y DESAFÍOS ACTUALES**

Durante el siglo XX la medicina logró grandes avances al reducir notablemente las muertes causadas por enfermedades infecciosas comunes, lo que extendió la esperanza de vida humana. Sin embargo, esta mejora también coincidió con un aumento en el número de casos de cáncer. Fue en esta época cuando Paul Ehrlich introdujo el concepto de quimioterapia y sentó las bases para el desarrollo experimental de medicamentos contra el cáncer. Un evento clave para avanzar en este campo ocurrió durante la Segunda Guerra Mundial, cuando en un bombardeo se liberan sustancias químicas que producen efectos adversos severos en los sobrevivientes, llevando a que los científicos investiguen su potencial en tratamientos para ciertos tipos de cáncer. Así comenzó la era en la que se utilizaron compuestos bioactivos, inicialmente naturales y luego semisintéticos, para combatir enfermedades tumorales. En particular, el paclitaxel, descubierto en los años 60, se convirtió en un fármaco importante, aunque su fabricación enfrentaba varios desafíos

que motivaron la búsqueda de métodos más eficientes para producirlo en laboratorio (Sousa-Pimenta et al., 2023).

El paclitaxel se probó por primera vez en modelos celulares con cáncer de pulmón para evaluar su capacidad de inhibir el tumor. En un estudio clínico donde se compararon diferentes tratamientos, quienes recibieron paclitaxel mostraron una mejor tasa de supervivencia a un año en comparación con otros medicamentos. Además, el tiempo promedio que vivieron con la enfermedad es mayor para el grupo tratado con este fármaco, evidenciando su eficacia en este tipo de cáncer. El docetaxel, otra exposición experimental importante, es identificado durante la síntesis del paclitaxel a partir de un compuesto intermediario. Este medicamento actúa bloqueando el procesamiento de ciertas proteínas responsables de la estructura celular, interrumpiendo la división celular de forma más estable y eficiente. Además, tiene la ventaja de ser más soluble y contar con mejor biodisponibilidad, lo que facilita su uso clínico. Un estudio con más de 800 modelos celulares que tenían cáncer de mama avanzado con expresión del receptor HER2 mostró que la exposición experimental con docetaxel junto a otros medicamentos prolongaba significativamente el tiempo durante el cual la enfermedad no progresaba, comparado con terapias estándar, mejorando las perspectivas para estos modelos celulares (Sousa-Pimenta et al., 2023).

El cáncer de mama representa un enorme desafío para la salud a nivel mundial, especialmente en regiones con menos recursos. Aunque han mejorado las opciones de tratamiento y la esperanza de vida, la realidad es que la enfermedad sigue en aumento, y las disparidades en el acceso a terapias efectivas deben ser enfrentadas mediante esfuerzos coordinados a nivel global (Wilkinson & Gathani, 2021).

### **2.1.6 HETEROGENEIDAD BIOLÓGICA Y SU IMPACTO EN LA RESPUESTA TERAPÉUTICA**

La heterogeneidad dentro de los tumores es una de las marcas más características del cáncer y representa un gran desafío para los especialistas en oncología. Esta diversidad es la razón principal por la que muchos tratamientos farmacológicos no tienen éxito, ya que diferentes células dentro del mismo tumor pueden reaccionar distinto a un mismo

medicamento. Esta variabilidad afecta directamente las dianas a las que se dirigen los fármacos, o modifica el ambiente que rodea al tumor, definiendo perfiles moleculares y características celulares que dificultan la efectividad de los medicamentos (Zhang et al., 2022).

La resistencia a los tratamientos es la principal causa por la cual muchos pacientes con cáncer no logran remisión. Son varios los factores biológicos que influyen en esta resistencia, desde la velocidad de crecimiento del tumor, la cantidad total de células cancerosas, hasta las barreras físicas y los mecanismos del sistema inmunológico. De todos ellos, la heterogeneidad tumoral se destaca como la más importante, ya que, a lo largo de la progresión del tumor, las células evolucionan y generan cambios no solo en sus genes, sino también en la forma en que se comunican entre sí y con su entorno, favoreciendo la resistencia a distintos medicamentos (Zhang et al., 2022).

Hoy en día, las terapias dirigidas han mejorado los resultados para algunos pacientes con tumores sólidos, pero la caída sigue siendo un problema importante debido a mecanismos de resistencia. Cuando un tumor ya es resistente antes de iniciar el tratamiento, hablamos de resistencia primaria. En cambio, la resistencia secundaria se adquiere después de una primera respuesta favorable y puede surgir por mutaciones nuevas o cambios en las vías de señalización celular. También existe otro tipo de resistencia secundaria, que aparece porque algunas células resistentes ya estaban presentes desde el origen y se favorecen bajo presión del tratamiento al eliminar a las sensibles (Baliu-Piqué et al., 2020).

Un problema particular de las terapias con conjugados anticuerpo-fármaco es la variabilidad en la expresión de las dianas a las que se dirigen. Estos tratamientos combinan un anticuerpo con una toxina para atacar las células cancerosas, pero si no todas las células expresan el objetivo, la exposición experimental puede no eliminar todo el tumor, generando resistencia. Además de la variabilidad genética, los tumores también presentan cambios epigenéticos que regulan cuándo y dónde se activan ciertos genes. Modificaciones como la metilación del ADN o las alteraciones de las histonas pueden silenciar genes que normalmente protegen contra el cáncer. Estas alteraciones epigenéticas influyen en la selección de ciertos clones celulares y pueden permitir que

algunas células cambien temporalmente su sensibilidad a los medicamentos, contribuyendo a la resistencia (Baliu-Piqué et al., 2020).

### **2.1.7 TRANSICIÓN HACIA MODELOS PRECLÍNICOS MÁS PREDICTIVOS**

Los avances en oncología han generado un abanico de tratamientos innovadores que incluyen medicamentos biológicos, vacunas dirigidas contra el cáncer, anticuerpos monoclonales y agentes como inhibidores de tirosina quinasa, xenoinjertos tumorales y fármacos antiangiogénicos. Estas innovaciones brindan nuevas esperanzas a los modelos celulares, mejorando tanto las tasas de curación como la supervivencia. Sin embargo, este progreso entraña desafíos cruciales, especialmente en la necesidad de trasladar de manera efectiva estos descubrimientos a la práctica mediante modelos preclínicos confiables (Wang et al., 2024).

El avance en tratamientos contra el cáncer se ha visto retardado, en gran parte, por la atención de modelos preclínicos confiables con alto poder predictivo para los resultados en modelos celulares. En este contexto, los modelos de xenoinjerto tumoral derivados directamente de tejidos de pacientes han surgido como una estrategia para superar muchas de estas limitaciones. Los pacientes conservan fielmente la heterogeneidad tumoral del modelo celular original y han demostrado un desempeño superior al de métodos convencionales, evidenciando su valor en la investigación traslacional. Actualmente, diversos grupos han generado numerosos modelos celulares estables y específicos que conservan la anatomía, genética y respuestas terapéuticas del tumor original (Altogen Labs, 2018).

El uso de estos y otros modelos preclínicos es esencial para el desarrollo traslacional de nuevas terapias oncológicas. Aunque el cultivo en monocapa y algunos xenoinjertos murinos ofrecen ventajas para pruebas iniciales, éstos no logran replicar el entorno tumoral completo ni las interacciones con el sistema inmunológico. Por ello, se hace cada vez más urgente desarrollar y aplicar modelos que reflejen mejor la fisiología tumoral y permitan una predicción clínica más precisa como lo son las esferas tumorales (Altogen Labs, 2018).

Por otro lado, los modelos murinos, tanto convencionales como genéticamente modificados, son imprescindibles para estudiar los mecanismos moleculares que rigen la progresión y metástasis del cáncer de mama. Poseen un sistema inmunológico funcional, permitiendo examinar la relación dinámica entre las células tumorales y el sistema inmune. A pesar de ello, su complejidad y ciertas limitaciones en modelar procesos metastásicos y tratamientos clínicos representan retos que aún se enfilan a superar (Pedroza et al., 2024).

## **2.2 MODELOS CELULARES EN INVESTIGACIÓN**

### **2.2.1 MODELOS BIDIMENSIONALES (2D)**

El cultivo celular bidimensional o 2D ha sido la técnica *in vitro* más empleada en estudios de cáncer desde su establecimiento en el siglo XIX. Su simplicidad, bajo costo y reproducibilidad lo convirtieron en una herramienta central para los primeros avances en biología celular y ensayos farmacológicos. En estos modelos, las células crecen en una monocapa adherente sobre una superficie plana, como placas Petri o matraces de cultivo, sumergidas en un medio de cultivo enriquecido con nutrientes, suero y factores de crecimiento esenciales para la supervivencia y proliferación celular. Este método permite un control estricto de las condiciones experimentales y facilita la manipulación y observación directa de las células, lo que la hace ideal para estudios iniciales de toxicidad, proliferación y mecanismos moleculares básicos (Nayak et al., 2023).

Sin embargo, pese a sus ventajas prácticas, los modelos 2D presentan limitaciones críticas que comprometen su capacidad para simular la complejidad de los tumores sólidos *in vivo*. La naturaleza plana de estos cultivos altera profundamente la morfología, la polaridad y el modo de división celular, ya que las células se ven forzadas a adaptarse a un sustrato artificialmente rígido. Esto conduce a una pérdida de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC), que son fundamentales para la señalización, la diferenciación y función tisular normal de las células. En un cultivo 2D, todas las células están expuestas de manera homogénea a los nutrientes, el oxígeno y los agentes terapéuticos, una situación que no refleja la realidad de los tumores sólidos, donde existen gradientes de difusión que generan microambientes heterogéneos. Esto elimina la

complejidad fisiológica de los tumores y limita la capacidad de los modelos 2D para predecir mecanismos de resistencia adquirida. Además, se ha reportado que estos cultivos pueden alterar la expresión génica y proteica, modificando la respuesta celular a diversos estímulos y disminuyendo su validez como representación del entorno tumoral real (Kapalczyńska et al., 2016).

La principal consecuencia de estas limitaciones es la falta de predictividad en la respuesta a fármacos. Muchos compuestos que demuestran una alta eficacia citotóxica en monocapas fallan en ensayos preclínicos más avanzados o en la práctica clínica, ya que no logran superar las barreras físicas y microambientales presentes en un tumor tridimensional. Esta discrepancia contribuye al elevado costo y prolongado tiempo del desarrollo de fármacos, además de promover el uso de modelos animales que podrían reducirse con sistemas *in vitro* más representativos (Nayak et al., 2023; Guan & Huang, 2022).

### **2.2.2 MODELOS TRIDIMENSIONALES (3D)**

Ante las limitaciones de los cultivos 2D, surgieron los modelos tridimensionales (3D), como los esferoides tumorales, que reproducen con mayor fidelidad la arquitectura y fisiología de los tumores sólidos. Estos modelos permiten la formación de estructuras multicelulares organizadas en capas, generando gradientes de oxígeno, nutrientes y metabolitos similares a los encontrados *in vivo*. Como resultado, las células cultivadas en condiciones 3D exhiben comportamientos fisiológicos y respuestas farmacológicas más cercanas a las observadas en pacientes (Kapalczyńska et al., 2016).

Los esferoides tumorales han demostrado replicar con precisión aspectos clave de los tumores, tales como la secreción de mediadores solubles, la activación de vías de resistencia a fármacos, la variación en la expresión génica y las respuestas adaptativas al microambiente. Su estructura multicapa permite distinguir zonas con diferentes características celulares: una región periférica con células altamente proliferativas, una zona media con células quiescentes bajo condiciones hipóxicas y una zona central con células necróticas. Esta organización confiere a los modelos 3D un alto valor predictivo

en el estudio de proliferación tumoral y eficacia de agentes quimioterapéuticos (Nayak et al., 2023).

### **2.2.3 LIMITACIONES DE MODELOS 2D Y VALOR DEL MODELO 3D (ESFEROIDES)**

Los cultivos celulares en dos dimensiones, o 2D, son una técnica muy utilizada para estudiar la biología celular y el impacto de los medicamentos, así como para observar la morfología de los tejidos y estudiar diversas enfermedades. Aunque este método es sencillo y reproducible, también presenta importantes limitaciones, ya que no refleja las complejas interacciones entre la célula y su entorno, ni reproduce fielmente la morfología, polaridad y forma de división celular que ocurre en el cuerpo. Estas deficiencias han motivado el desarrollo de modelos más avanzados destinados a reproducir con mayor realismo las condiciones biológicas que enfrentan las células *in vivo* (Kapalczyńska et al., 2016).

Una de las principales limitaciones de los cultivos 2D es la ausencia de heterogeneidad celular y un microambiente tumoral funcional, elementos clave que influyen en el avance del cáncer y en la resistencia a los tratamientos. Para avanzar en la creación de terapias efectivas que realmente mejoren los resultados clínicos, es esencial contar con modelos que puedan reflejar la complejidad y variabilidad de las enfermedades humanas. Las interacciones multicelulares y con la matriz extracelular, que son esenciales para la formación y crecimiento de los tumores, son difíciles de replicar en cultivos planos (National Cancer Institute, 2023).

Las ventajas de los cultivos 2D están la simpleza del mantenimiento y su bajo costo, además de que permiten realizar distintos ensayos funcionales con facilidad. Sin embargo, las células en estos sistemas no se organizan como en los tejidos reales, lo que limita la representación de las interacciones necesarias para funciones celulares vitales como la proliferación, diferenciación, metabolismo y respuesta al estrés. Tras la transición desde el tejido vivo a las condiciones 2D, las células suelen modificar su forma y comportamiento, perdiendo diversidad fenotípica. También, al crecer en monocapa, todos los nutrientes y factores están accesibles de forma uniforme, algo que contrasta con la variabilidad de recursos dentro de un tumor real. Además, esta técnica suele estudiar un

solo tipo celular, lo que impide recrear el microambiente heterogéneo requerido por las células iniciadoras del cáncer (Kapalczyńska et al., 2016).

En los organismos vivos, las células no se encuentran en ambientes planos sino tridimensionales. Por ello, los cultivos 2D no logran simular con exactitud las condiciones y fisiología celular natural que existen dentro del cuerpo. Además, las células crecen en contacto uniforme con el medio, por lo que están expuestas de manera constante a medicamentos y factores externos, diferentes de la distribución heterogénea que ocurre *in vivo* (Guan & Huang, 2022).

- 3D (esferoides): reproducen gradientes de oxígeno y nutrientes, zonas proliferativas/hipóxicas/necróticas y barreras de penetración del fármaco.

Los esferoides multicelulares en 3D, creados a partir de células cancerosas, son modelos ideales para estudiar los gradientes de presión parcial de oxígeno y sus efectos en el crecimiento tumoral. La estructura de estos esferoides simula muy bien la heterogeneidad que existe en una pequeña región tumoral, incluyendo las interacciones de las células entre sí y con el microambiente que las rodea. Al igual, que un microdominio tumoral sin vasos sanguíneos, el crecimiento del esferoide conduce a zonas centrales donde faltan oxígeno y nutrientes, generando hipoxia y acidosis, mientras que las partes externas reciben más oxígeno, similar al estroma tumoral cerca de los vasos sanguíneos (Gomes et al., 2016).

La rápida proliferación de células cancerosas, junto con la deficiencia de vasos sanguíneos, genera en los tumores sólidos regiones deficientes de nutrientes y oxígeno. Algunas células tienen la capacidad de sobrevivir en estas condiciones hipóxicas extremas y contribuyen al avance del tumor. La hipoxia dentro del tumor se ha relacionado con un pronóstico más desfavorable. Los modelos tridimensionales *in vitro*, como los esferoides y organoides, reproducen espontáneamente estos gradientes de oxígeno, lo que los hace útiles para estudiar el comportamiento tumoral bajo estas condiciones (Godet et al., 2022).

En la mayoría de los tumores sólidos, aproximadamente el 90%, surgen áreas de hipoxia debido a la rápida proliferación celular y al desarrollo vascular limitado. En modelos celulares con cáncer de mama, las concentraciones medias de oxígeno en el tumor son

significativamente menores que en el tejido mamario normal. La presencia de hipoxia en los tumores se asocia con mayor riesgo de metástasis y mortalidad, y es un factor pronóstico negativo independientemente del estadio clínico al diagnóstico. Las células tumorales pueden adaptarse a la escasez de oxígeno, principalmente a través de la activación de factores inducibles por hipoxia (HIF), que regulan la expresión de genes que les permiten sobrevivir en entornos desfavorables (Godet et al., 2022).

Los tumores sólidos crecen formando estructuras tridimensionales en las que se establecen gradientes de nutrientes y oxígeno debido a la distribución limitada por la vascularización. La hipoxia activa vías celulares y cambios en la expresión genética que favorecen la supervivencia de las células malignas y la formación de células madre cancerosas con capacidad de autorrenovación y comienzo del tumor. Tanto la hipoxia como estas células madre cancerosas están asociadas a la resistencia terapéutica y a las caídas en los pacientes (Ham et al., 2016).

En las fases iniciales del cáncer epitelial, las células malignas invaden la membrana basal y proliferan formando masas tridimensionales que obtienen nutrientes por difusión desde los vasos sanguíneos cercanos. Estas masas tumorales contienen células diversas en cuanto a función y forma, y su crecimiento continúa hasta que los niveles de oxígeno y nutrientes disminuyen en las zonas más alejadas de los vasos. La hipoxia activa la vía del factor inducible por hipoxia (HIF), aumentando la estabilidad de sus componentes y su transporte al núcleo, donde promueven la expresión de genes que facilitan la adaptación y supervivencia celular bajo condiciones de bajo oxígeno (Ham et al., 2016).

Los esferoides formados por células tumorales constituyen modelos muy relevantes en investigación debido a su estructura tridimensional, la complejidad de sus redes de interacción entre células y la limitada distribución de nutrientes y oxígeno dentro de estos agregados (Ham et al., 2016).

### **2.3 ¿POR QUÉ USAR ESFEROIDES PARA PROLIFERACIÓN Y QUIMIORRESPUESTAS?**

Los esferoides tumorales se están imponiendo como una alternativa más avanzada y precisa en comparación con los cultivos celulares tradicionales en dos dimensiones (2D). Estos sistemas permiten recrear de mejor forma la compleja estructura y organización de las células *in vivo* aportando nuevas posibilidades en la investigación oncológica (Nikdouz & Orso, 2023).

Una de las grandes ventajas de los cultivos 3D es la capacidad para mantener interacciones entre las células y componentes de la matriz extracelular (ECM). Estos cultivos presentan una organización espacial definida que influye directamente en el comportamiento celular. Dentro de estos modelos conviven células en diferentes estados: algunas se están dividiendo activamente, otras permanecen en reposo y algunas se encuentran muriendo, lo cual se asemeja mucho a la dinámica que se da en los tumores reales. Los modelos 3D también ofrecen mayor precisión en la predicción de cómo responderán los pacientes a ciertos medicamentos, siendo un modelo útil para analizar la actividad biológica y toxicidad de los medicamentos en comparación con los cultivos 2D (Nikdouz & Orso, 2023).

Se ha demostrado que organoides y esferoides derivados de pacientes pueden ser empleados para evaluar la eficacia individualizada de fármacos, permitiendo el desarrollo de tratamientos adaptados al perfil tumoral de cada paciente. Esta capacidad de predecir respuestas clínicas con mayor precisión convierte a los cultivos 3D en aliados clave para la traslación de hallazgos de laboratorio a la práctica clínica (Huang et al., 2020).

Finalmente, en comparación con los cultivos 2D, los modelos 3D reproducen de mejor manera el microambiente de los tumores primarios, modificando funciones celulares como la proliferación, la viabilidad, la migración, la respuesta a hipoxia, la diferenciación y la sensibilidad a fármacos, lo que los convierte en una herramienta imprescindible para la investigación y el desarrollo de nuevas terapias oncológicas (Huang et al., 2020).

## **2.4 JUSTIFICACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES**

### **2.4.1 LÍNEA CELULAR MCF-7 (SUBTIPO LUMINAL, DEPENDIENTE DE ESTRÓGENO)**

La línea celular MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), que representa un modelo luminal dependiente de estrógeno y menos agresivo, es uno de los modelos más utilizados en estudios de cáncer de mama. Esta línea celular ha sido cultivada extensamente por diversos grupos a lo largo de los años, se caracteriza por ser positiva para receptores de estrógeno y progesterona, perteneciendo al subtipo molecular luminal A. Se considera que tiene un bajo potencial metastásico, siendo no invasiva y menos agresiva en comparación con otras (Comşa & Şerban, 2015).

Desde su establecimiento hace más de 40 años, MCF-7 ha servido como línea celular estándar para investigaciones sobre receptores hormonales y para la evaluación de fármacos en oncología. Su estabilidad genética y amplia disponibilidad en laboratorios de todo el mundo han facilitado el desarrollo de múltiples estudios orientados a comprender la biología del cáncer y explorar nuevas terapias (Kleensang et al., 2016).

Las células MCF-7 se originaron del tejido mamario de una mujer de 69 años con adenocarcinoma metastásico, reflejando el subtipo luminal A, el cual se asocia con menor grado de malignidad y mejor pronóstico que otros subtipos más agresivos (Cytion, 2025).

A nivel funcional, las células MCF-7 expresan receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides, lo que las hace especialmente útiles para estudios hormonales. En cultivo presentan propiedades típicas de epitelio mamario, como la formación de monocapas y domos, y son las primeras en demostrar respuesta a hormonas *in vitro* (Lee et al., 2015; Biology Insights, 2025).

En la investigación las células MCF-7, permiten evaluar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer de mama y estudiar la dinámica celular, incluyendo el comportamiento de las células madre cancerosas. Son un contraste fundamental frente a líneas más agresivas como la MDA-MB-231, contribuyendo a comprender diferentes perfiles tumorales. Los estudios con MCF-7 incluyen sistemas de cultivo tanto en 2D como 3D,

incluyendo el uso de esferoides que reproducen mejor el microambiente tumoral. Esto facilita el análisis en profundidad de cómo crecen estos modelos celulares y cómo se comportan las células madre dentro de estructuras que simulan tejidos usando andamios (Cytion, 2025).

Al ser un modelo basado en células epiteliales con características similares al adenocarcinoma humano, la línea MCF-7 es esencial para la evaluación de nuevos fármacos, mecanismos de resistencia y el papel de células madre mesenquimales, tanto *in vitro* como en estudios preclínicos (Cytion, 2025).

En investigaciones sobre cáncer de mama metastásico, MCF-7 se utiliza en tecnologías avanzadas como microtejidos autocontenidos en hidrogeles o andamios, que imitan el entorno natural del tumor. Este enfoque ha revelado características específicas de la enfermedad en distintas etapas y diferencias clínicas, incluyendo respuestas farmacogenéticas y epigenéticas relevantes para tratamientos personalizados, especialmente en mujeres posmenopáusicas (Cytion, 2025).

#### **2.4.2 LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 (SUBTIPO TRIPLE NEGATIVO, ALTAMENTE INVASIVA)**

La línea celular MDA-MB-231 corresponde a un subtipo de cáncer de mama triple negativo (TNBC), definido por la ausencia de receptores de estrógeno, progesterona y HER2. Este subtipo representa entre el 15 % y 20 % de los casos de cáncer de mama y se asocia con peor pronóstico clínico, alta recurrencia y resistencia a los tratamientos convencionales (National Cancer Institute, 2023).

MDA-MB-231 es aislada a partir de un derrame pleural de una paciente con carcinoma ductal invasivo avanzado. Se caracteriza por su alto potencial invasivo, mutaciones en p53 y agrupamiento dentro del subtipo basal de cáncer de mama. Además, genera xenoinjertos metastásicos espontáneos en modelos animales, lo que la convierte en una herramienta fundamental para investigar metástasis y progresión tumoral (Huang et al., 2020; Lv et al., 2024).

Estudios recientes muestran que esta línea celular posee subpoblaciones con mayor capacidad migratoria y un fenotipo fuertemente asociado a la transición epitelial-mesenquimal (TEM). Estos rasgos no solo aumentan su capacidad metastásica, sino que también explican su resistencia frente a la quimioterapia estándar (Amaro et al., 2016).

En cultivo tridimensional, MDA-MB-231 exhibe una morfología estrellada con proyecciones invasivas que conectan distintas colonias celulares, imitando el comportamiento de tumores altamente agresivos. Asimismo, se han descrito subclones con tropismo hacia hueso, cerebro y pulmón, lo que permite utilizarla para estudios de metástasis órgano-específica (Culture Collections, 2022).

Finalmente, la principal limitante clínica asociada al TNBC modelado por MDA-MB-231 es su elevada quimiorresistencia, la cual se relaciona estrechamente con procesos de plasticidad tumoral mediados por la transición epitelial-mesenquimal. Esta característica hace de MDA-MB-231 un modelo clave para probar estrategias terapéuticas innovadoras frente a tumores refractarios a tratamientos convencionales (Blaszczak et al., 2025).

#### **2.4.3 JUSTIFICACIÓN COMPARATIVA: EXTREMOS DEL ESPECTRO DEL CÁNCER DE MAMA**

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 representan modelos contrastantes dentro del espectro biológico del cáncer de mama, lo que las convierte en candidatas ideales para una comparación en estudios de proliferación y respuesta terapéutica en esferas tumorales 3D. En primer lugar, estas líneas difieren en su perfil molecular y subtipo de cáncer. MCF-7 es una línea dependiente de estrógeno, lo que significa que en presencia de este estímulo hormonal su proliferación se incrementa, mientras que MDA-MB-231 carece de los receptores hormonales principales (como los receptores de estrógeno y progesterona), haciéndola inmune a terapias basadas en hormonas. Esta diferencia refleja la variabilidad clínica entre tumores hormonodependientes y los que no lo son, siendo estos últimos generalmente más difíciles de tratar con terapias hormonales estándar (Theodossiou et al., 2019; Flodrova et al., 2016).

Además, tienen comportamientos tumorales distintos. MDA-MB-231 exhibe características más agresivas: invasión, migración y proliferación más rápida en muchos ensayos experimentales, mientras que MCF-7 tiende a mostrar un crecimiento más lento, menor capacidad invasiva y una morfología más epitelial y organizada. Estas diferencias permiten modelar extremos de agresividad tumoral dentro de un mismo tipo de cáncer de mama, lo cual es útil para evaluar cuánto difieren la proliferación, la formación de esferas y la respuesta a tratamientos en un contexto tridimensional (Theodossiou et al., 2019).

Otra razón para compararlas es su uso extendido en la investigación científica, lo que facilita la comparación de resultados con otros estudios. Al elegir estas dos líneas contrastantes, se pueden observar diferencias claras en proliferación, supervivencia y sensibilidad a fármacos, lo que permite extraer conclusiones relevantes sobre la biología y resistencia del cáncer de mama en modelos tridimensionales (Farhadi et al., 2021).

## **2.5 RELEVANCIA DE LOS FÁRMACOS ELEGIDOS**

### **2.5.1 PACLITAXEL Y DOCETAXEL**

El paclitaxel fue descubierto gracias a un programa conjunto del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), que evaluó cerca de 15.000 plantas medicinales y más de 115.000 extractos crudos para identificar compuestos con actividad anticancerígena. De esta búsqueda se aisló el paclitaxel, un agente con eficacia comprobada en ensayos clínicos para diversas neoplasias, incluido el cáncer de mama (Sharifi-Rad et al., 2021).

El paclitaxel se deriva de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), cuya acción citotóxica se documentó inicialmente sobre cultivos celulares humanos. El aislamiento de su componente activo fue realizado por Monroe Wall y Mansukh Wani en colaboración con el NCI, denominándose paclitaxel en 1967. Este fármaco demostró un amplio rango de acción antitumoral en modelos murinos y su mecanismo se basa en la estabilización de microtúbulos, estructuras cilíndricas formadas por heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, impidiendo su despolimerización. Al bloquear la dinámica microtubular, paclitaxel induce arresto del ciclo celular en G2/M y muerte celular programada (Sharifi-Rad et al., 2021).

El docetaxel es un taxano de segunda generación extraído de las agujas de los tejos. Presenta de 1,3 a 12 veces más actividad anticancerígena que el paclitaxel frente a varios tipos de tumores (mama, pulmón, ovario, próstata, cabeza y cuello). Comparte el mismo sitio de unión a la  $\beta$ -tubulina, pero con mayor afinidad y un tiempo de retención intracelular más prolongado, lo que potencia su efecto supresor de la dinámica microtubular y su capacidad para inducir apoptosis a través de la fosforilación de BCL2 y activación de caspasas (Alalawy, 2024).

## **2.6 VACÍO DE CONOCIMIENTO**

### **2.6.1 PREDOMINIO DE ESTUDIOS EN MODELOS 2D**

Desde principios del siglo XX, el cultivo celular bidimensional (2D) se ha utilizado como la principal técnica para hacer crecer células en entornos artificiales controlados, lo que ha permitido avances significativos en la investigación biomédica. Durante décadas, este método ha sido fundamental para estudiar diversos aspectos de la biología celular, como la morfología, la proliferación, la respuesta a diferentes estímulos, el metabolismo de medicamentos y la producción de proteínas. Sin embargo, a medida que se reconocieron las limitaciones inherentes a los cultivos 2D, como la falta de tridimensionalidad y la incapacidad de reproducir fielmente las condiciones en que las células se encuentran en un organismo vivo, surgió el cultivo celular tridimensional (3D). Esta técnica más reciente ha demostrado mejorar la simulación del entorno natural de las células, brindando una perspectiva más realista y completa para diversas aplicaciones científicas (Guan & Huang, 2022).

Los cultivos o modelos bidimensionales (2D), son ampliamente utilizados en la investigación del cáncer, especialmente para probar si nuevos fármacos anticancerígenos son efectivos, antes de avanzar a estudios en animales y finalmente en humanos. Sin embargo, la mayoría de los científicos dedicados al estudio del cáncer continúan utilizando exclusivamente modelos 2D en sus experimentos, principalmente debido a que hay poca experiencia con cultivos tridimensionales (3D). De hecho, más del 66% de los investigadores reportaron usar únicamente cultivos 2D en sus laboratorios. Este panorama revela la importancia de crear protocolos estandarizados y métodos más accesibles

económicamente para implementar cultivos 3D y caracterizarlos correctamente, con el fin de reflejar con mayor fidelidad la complejidad del tumor y así avanzar en el estudio del cáncer (Martínez-Pacheco & O'Driscoll, 2021).

### **2.6.2 LIMITADA EVIDENCIA COMPARATIVA EN MODELOS 3D CON MCF-7 Y MDA-MB-231**

Hoy en día, los estudios que comparan directamente líneas celulares específicas, como MCF7 y MDA-MB-231, usando cultivos tumorales en 3D y su respuesta a fármacos como paclitaxel y docetaxel, son todavía escasos. Gran parte de la investigación realizada con células cancerosas en laboratorio ha empleado métodos bidimensionales (2D), los cuales, aunque han aportado mucho conocimiento, no logran replicar con exactitud las condiciones complejas que se presentan en un tumor dentro del organismo. En contraste, los cultivos tridimensionales en forma de esferoides representan mejores las interacciones celulares y la disponibilidad heterogénea de nutrientes que ocurren en los microambientes tumorales reales, lo que facilita un entendimiento más profundo de la biología del cáncer. A pesar de esta clara ventaja, aún no se dispone de suficientes estudios que analicen las diferencias metabólicas entre cultivos 2D y 3D, lo cual representa una brecha importante en la investigación actual (Tidwell et al., 2022).

En cuanto a las pruebas farmacológicas, la mayoría se ha realizado en cultivos 2D, aunque los modelos 3D se plantean como herramientas con mayor fidelidad para la detección inicial de nuevos medicamentos. Esto es gracias a su capacidad para reflejar las interacciones células-células y los gradientes naturales de nutrientes en el microambiente tumoral, especialmente en tumores con escasa o nula vascularización. Por ello, resulta fundamental explorar cómo varían los procesos de crecimiento y metabolismo cuando se comparan cultivos tradicionales en 2D con esferoides tridimensionales más avanzados. Desde que se documentaron por primera vez los esferoides tumorales en 1971, su uso en la investigación ha sido limitado, constituyendo apenas un pequeño porcentaje, cercano al 1,7%, de las publicaciones científicas indexadas que utilizan líneas celulares para el estudio del cáncer. Esto pone de manifiesto que sigue existiendo una necesidad urgente de ampliar el número de estudios comparativos entre cultivos 2D y 3D para mejorar el conocimiento y la eficacia terapéutica (Tidwell et al., 2022).

# **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El presente estudio empleó un diseño experimental comparativo *in vitro* para evaluar la proliferación celular y la respuesta a fármacos en modelos celulares 2D (células adherentes) y 3D (esferas tumorales) derivados de las líneas celulares humanas MDA-MB-231 y MCF-7.

Se comparó la capacidad de formación de esferas, la viabilidad celular bajo tratamiento farmacológico, la tasa de proliferación y los cambios en la expresión génica asociados a mecanismos de apoptosis y respuesta al daño celular.

### **3.2 MATERIALES Y REACTIVOS**

Las líneas celulares empleadas son MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo, fenotipo agresivo) y MCF7 (cáncer de mama, fenotipo menos agresivo). Los medios y reactivos principales incluyen: DMEM high glucose suplementado con suero fetal bovino y antibióticos, medio específico para cultivo de esferas tumorales, TripLE para disgregación, DPBS, azul de tripano, reactivos para MTT y reactivos para extracción de ARN y RT-qPCR (incluyendo enzimas para retrotranscripción y primers/probes para BAX, p21, GAPDH, TUBB3. Como fármacos de prueba se utilizarán PTX y DTX.

### **3.3 LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO**

#### **3.3.1 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS ADHERENTES (2D)**

Para el mantenimiento de los cultivos *in vitro* se emplearon las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 (Donación). Inicialmente, ambas líneas fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (Multicell™), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS; Gibco™), 1 % de penicilina-estreptomycin (Gibco™) y 1 % de anfotericina B (MB Biomedical). Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>, empleando placas de cultivo de 6 y 10 cm de diámetro.

Los subcultivos se realizaron cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80–95 %. Previo a la disociación celular, las monocapas fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfatos (DPBS; Gibco™) para eliminar residuos de suero. Posteriormente, la disociación celular se efectuó mediante la aplicación de TripLE™ 0.5 mM (Gibco™). La acción de la enzima fue detenida mediante la adición de medio DMEM fresco, en una proporción 3:1 (medio DMEM:TripLE). Tras este procedimiento, las suspensiones celulares fueron recolectadas en tubos cónicos de 15 mL hasta su procesamiento correspondiente.

### **3.3.2 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ESFERAS TUMORALES (3D)**

A partir de cultivos celulares bidimensionales (2D) previamente establecidos y mantenidos en condiciones óptimas, las células de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 fueron colectadas y cuantificadas para su posterior transferencia a condiciones de cultivo tridimensional.

Para la formación y el mantenimiento de las esferas tumorales, se utilizó 3D Tumor Sphere Medium XF (PromoCell), un medio específico diseñado para favorecer el crecimiento celular en suspensión y la formación de estructuras tridimensionales.

Las células fueron colectadas en tubos cónicos de 15 mL y centrifugadas a  $100 \times g$  durante 3-5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido suavemente en medio fresco para evitar la disociación celular y preservar la integridad de las esferas tumorales.

Las suspensiones celulares fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™, diseñadas para cultivos en suspensión, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Durante el periodo de cultivo, las esferas tumorales se mantuvieron mediante cambios periódicos de medio, realizados cuidadosamente para evitar la pérdida o disrupción de las estructuras tridimensionales, asegurando así su viabilidad y estabilidad a lo largo del tiempo experimental.

### **3.4 PROLIFERACIÓN CELULAR**

La dinámica proliferativa de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 se determinó mediante la generación de curvas de crecimiento. El crecimiento celular fue monitoreado en diferentes condiciones experimentales, incluyendo la exposición a PTX y DTX.

#### **3.4.1 FORMACIÓN DE ESFERAS TUMORALES**

A partir de un recuento celular inicial de 200,000 células, se calculó el volumen requerido de suspensión celular para la siembra en condiciones de formación de esferas tumorales. Se prepararon suspensiones celulares independientes para las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 en tubos cónicos de 15 mL. Para la línea MDA-MB-231, se mezclaron 13.15 mL de células colectadas en 22.85 mL de medio específico para esferas tumorales, mientras que para la línea MCF-7 se preparó 21.06 mL de células en 14.94 mL del mismo medio especializado. A partir de cada preparación, se sembró 3 mL por pocillo en cuatro placas de 6 pocillos, manteniendo condiciones estériles durante todo el procedimiento. Posteriormente, los cultivos fueron incubados a 37 °C para favorecer la formación y el mantenimiento de esferas tumorales.

A las 24 h posteriores a la siembra (día 1), los cultivos de ambas líneas celulares fueron tratados con PTX y DTX, empleando una concentración de 45 nM para la línea MDA-MB-231 y 70 nM para la línea MCF-7.

Las esferas tumorales fueron colectadas en los días 2, 3, 5, 7, 9 y 11 posteriores a la siembra en tubos cónicos de 15 mL y centrifugadas a  $400 \times g$  durante 5 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las muestras fueron lavadas con 2 mL de DPBS, seguido de una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones. Tras la eliminación del sobrenadante, las muestras celulares fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

#### **3.4.2 CURVA DE CRECIMIENTO**

Para la obtención de las curvas de crecimiento, se estableció una siembra inicial de 20,000 células, asegurando una distribución uniforme. A las 24 h posteriores a la siembra (día 1),

ambas líneas celulares (MDA-MB-231 y MCF-7) fueron tratadas con PTX y DTX, empleando una concentración final de 45 nM para MDA-MB-231 y 70 nM para MCF-7.

El crecimiento celular se evaluó en los días 2, 3, 5, 7, 9 y 11 posteriores a la siembra. En cada punto temporal, las células fueron disociadas enzimáticamente y cuantificadas mediante conteo manual en cámara de Neubauer (hemocitómetro) bajo microscopio óptico invertido (Leica Suite v4) y mediante conteo automatizado utilizando un contador de células Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific), bajo condiciones estériles.

Posterior a los conteos, las células fueron colectadas en tubos cónicos de 15 mL y centrifugadas a  $400 \times g$  durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y las muestras fueron lavadas con DPBS, seguido de una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones. Tras la eliminación del sobrenadante, las muestras celulares fueron almacenadas a  $-20$  °C hasta su posterior análisis.

### **3.5 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR**

Para evaluar el efecto de los tratamientos farmacológicos se emplearon metodologías complementarias orientadas al análisis de la viabilidad y la proliferación celular. La actividad metabólica de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 expuestas a PTX y DTX se midió mediante el ensayo MTT, permitiendo cuantificar cambios en la capacidad metabólica asociados al efecto citotóxico de los taxanos.

#### **3.5.1 ENSAYO MTT**

La evaluación de la viabilidad celular y del efecto citotóxico inducido por los tratamientos farmacológicos se llevó a cabo mediante el ensayo MTT en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

Para este propósito, las células fueron inicialmente mantenidas en cultivos en monocapa y, una vez alcanzada la confluencia adecuada, se procedió a su recuperación mediante lavado con DPBS y posterior disociación enzimática utilizando TripLE.

A continuación, se realizó un recuento celular con el fin de ajustar la densidad de siembra requerida. A partir de la suspensión obtenida, se estableció una concentración que permitió la siembra de 2,000 células por pocillo, dispensándose 200  $\mu$ L por pocillo en

placas de 96 pocillos. Las placas fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>, asegurando una distribución homogénea de las células y condiciones iniciales comparables entre los grupos experimentales.

Tras la siembra, las células se incubaron durante 24 horas con el objetivo de favorecer la adhesión celular y el establecimiento de una condición basal. Posteriormente, el medio de cultivo se retiró y los pocillos se asignaron a los diferentes grupos experimentales, tras lo cual las células se expusieron a los tratamientos farmacológicos correspondientes durante periodos de 48 y 72 horas.

Las células se trataron con concentraciones crecientes de PTX y DTX (10, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 nM). Finalizado cada periodo de tratamiento, el medio se removió y se añadieron 50 µL de solución de MTT previamente preparada, seguida de una incubación de 4 horas, permitiendo la reducción del tetrazolio y la formación de cristales de formazán en las células metabólicamente activas.

Concluida la incubación, la solución de MTT se descartó y los cristales de formazán se solubilizaron mediante la adición de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich™). La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas tipo ELISA.

Este procedimiento fue aplicado de manera paralela en modelos de cultivo bidimensional (2D) y tridimensional (3D), con el objetivo de realizar una comparación directa de la respuesta celular frente a los tratamientos farmacológicos. Los cultivos 2D se llevaron a cabo en placas de fondo plano, mientras que los cultivos 3D se establecieron en placas de fondo en V, favoreciendo la formación de esferoides tumorales.

## **3.6 ANÁLISIS MOLECULAR**

### **3.6.1 EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE QPCR EN TIEMPO REAL**

La extracción de ARN total se realizó utilizando el kit *Column-Pure RNA Miniprep* (ABM, Cat. No. D518), siguiendo un procedimiento basado en la purificación por columna de sílice. Para garantizar la calidad del material inicial, se emplearon pellets celulares obtenidos previamente del procesamiento asociado a la curva de crecimiento,

asegurando una cantidad aproximada de hasta  $1 \times 10^7$  células por preparación, según las especificaciones del fabricante.

Previo a la lisis, se preparó el buffer correspondiente mediante la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) en una proporción de 10  $\mu$ L por cada mililitro de buffer de lisis. Asimismo, se activó el *Wash Buffer 2* incorporando etanol al 95–100 %, según las indicaciones técnicas del kit. Una vez retirado el sobrenadante de los pellets celulares, se adicionaron 300  $\mu$ L del buffer de lisis suplementado con  $\beta$ -ME, mezclando suavemente por pipeteo y posteriormente mediante vortex por 10 segundos para asegurar la completa disrupción celular.

La mezcla resultante se cargó sobre la columna de purificación en volúmenes de hasta 700  $\mu$ L por centrifugación sucesiva (30s), descartando el flujo en cada repetición. Posteriormente, la columna se lavó con 350  $\mu$ L de *Wash Buffer 1*, seguido de una etapa de digestión de ADN genómico. Para ello, se preparó una solución de DNasa I libre de RNasa, compuesta por agua libre de nucleasas,  $10\times$  *DNase I Reaction Buffer* y DNase I, la cual se aplicó directamente sobre la membrana de la columna y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Finalizada la digestión, se realizó un nuevo lavado con *Wash Buffer 1* y dos lavados adicionales con 500  $\mu$ L de *Wash Buffer 2* activado con etanol, garantizando la completa eliminación de impurezas. Las columnas fueron centrifugadas por dos minutos adicionales para remover cualquier residuo de etanol y posteriormente transferidas a tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. La elución del ARN purificado se efectuó mediante la adición de 30–50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas directamente sobre la membrana, seguida de centrifugación por 1 minuto.

Una vez obtenido el ARN purificado, se evaluó su concentración y calidad mediante espectrofotometría (NanoDrop), verificando que las muestras fueran aptas para los siguientes análisis. Posteriormente, el ARN se almacenó inmediatamente bajo condiciones adecuadas para preservar su integridad hasta su utilización en los análisis posteriores de retrotranscripción y qPCR.

Con el material genético en condiciones óptimas, se procedió a la síntesis de ADN complementario (cDNA) mediante un sistema de retrotranscripción enzimática diseñado

para asegurar una conversión eficiente y reproducible. Se realizó utilizando el kit de retrotranscripción M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H<sup>-</sup>) de BioFact, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El cDNA generado se utilizó como plantilla para los ensayos de qPCR, realizados con un sistema de detección basado en SYBR Green. Cada reacción incluyó pares de primers dirigidos a genes asociados a mecanismos de respuesta y adaptación frente a taxanos.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador en tiempo real con monitoreo fluorescente, registrándose los valores de ciclo umbral (Ct) correspondientes a cada tratamiento y línea celular. Para el análisis cuantitativo, se aplicó el método  $\Delta\Delta C_t$ , permitiendo comparar los cambios en la expresión relativa entre MCF-7 y MDA-MB-231 y vincularlos con los patrones funcionales observados en los modelos 2D y 3D.

**Tabla 1. Genes evaluados para el análisis molecular**

<b>Gen</b>	<b>Función biológica asociada</b>
<b>GAPDH</b>	Gen constitutivo (control endógeno)
<b>p21</b>	Regulación de ciclo celular
<b>TUBB3</b>	Asociación con resistencia a taxanos
<b>BAX</b>	Apoptosis

# **CAPÍTULO IV: RESULTADOS**

## **4.1 DINÁMICA PROLIFERATIVA EN MODELO BIDIMENSIONAL (2D)**

Con el objetivo de caracterizar la evolución temporal de la proliferación celular bajo exposición continua a PTX y DTX, se realizó un seguimiento del número de células durante 11 días en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 cultivadas en condiciones bidimensionales. La curva de crecimiento obtenida (Gráfica 1) evidencia respuestas diferenciales dependientes tanto del tipo de taxano como de la línea celular, reflejando dinámicas contrastantes de expansión inicial, pérdida proliferativa y declive poblacional sostenido. Todas las condiciones iniciaron con una densidad celular de 20,000 células, lo que permitió evaluar de manera homogénea el efecto temporal de cada tratamiento.

### **4.1.1 CINÉTICA PROLIFERATIVA DE MDA-MB-231 EN PRESENCIA DE TAXANOS**

En la línea celular MDA-MB-231 se observaron patrones diferenciales de crecimiento dependiendo del taxano administrado (Gráfica 1).

En la condición MDA-MB-231 + PTX (línea verde), la curva mostró un incremento inicial del número celular hasta alcanzar un máximo alrededor del día 2–3. Este ascenso temprano indica que la población mantuvo capacidad proliferativa durante las primeras fases del seguimiento. Tras este punto, se registró un descenso continuo y marcado en el número de células, con una reducción progresiva que se acentuó entre los días 5 y 9. Para el día 11, los valores se mantuvieron cercanos al mínimo registrado, sin evidencias de recuperación proliferativa bajo exposición sostenida al fármaco. Este comportamiento refleja una pérdida gradual de la viabilidad celular a medida que avanzó el tratamiento.

Por su parte, la respuesta de MDA-MB-231 expuestas a DTX (línea roja) presentó un patrón considerablemente diferente. En este caso, la reducción del número celular ocurrió de forma abrupta desde el día 2, alcanzando niveles muy bajos en etapas tempranas. A lo largo del periodo experimental, la curva permaneció prácticamente plana, sin indicios de recuperación o proliferación residual. Este perfil indica que DTX ejerció un efecto más rápido e intenso en esta línea, limitando la expansión celular desde fases tempranas y manteniendo a la población en niveles mínimos hasta el final del seguimiento.

#### **4.1.2 CINÉTICA PROLIFERATIVA DE MCF-7 EN PRESENCIA DE TAXANOS**

En la línea celular MCF-7, la dinámica proliferativa varió según el tratamiento administrado, evidenciando perfiles temporales diferenciados (Gráfica 1).

En la condición MCF-7 + PTX (línea azul), la curva mostró un ascenso pronunciado hasta el día 2–3, alcanzando el valor máximo entre todas las condiciones evaluadas. Esta fase inicial refleja un comportamiento altamente proliferativo previo al efecto citotóxico sostenido del fármaco. Posteriormente, se registró un descenso gradual a partir del día 3, con una caída más marcada entre los días 5 y 7. El número celular continuó disminuyendo hasta el día 11, sin evidencia de recuperación. Aunque el patrón descendente fue similar al observado en MDA-MB-231 + PTX, la reducción ocurrió con menor brusquedad, lo que sugiere una sensibilidad temporal distinta frente al tratamiento.

Por su parte, la curva correspondiente a MCF-7 + DTX (línea morada) mostró un incremento inicial moderado, inferior al observado con PTX, pero consistente con una breve fase de proliferación temprana. Tras alcanzar el máximo inicial, el número celular disminuyó de forma progresiva a lo largo del experimento. La caída, aunque sostenida, no fue tan abrupta como la registrada en MDA-MB-231 + DTX. En los días finales, la población se mantuvo en valores bajos, sin signos de recuperación, indicando una afectación prolongada de la viabilidad celular bajo este tratamiento.

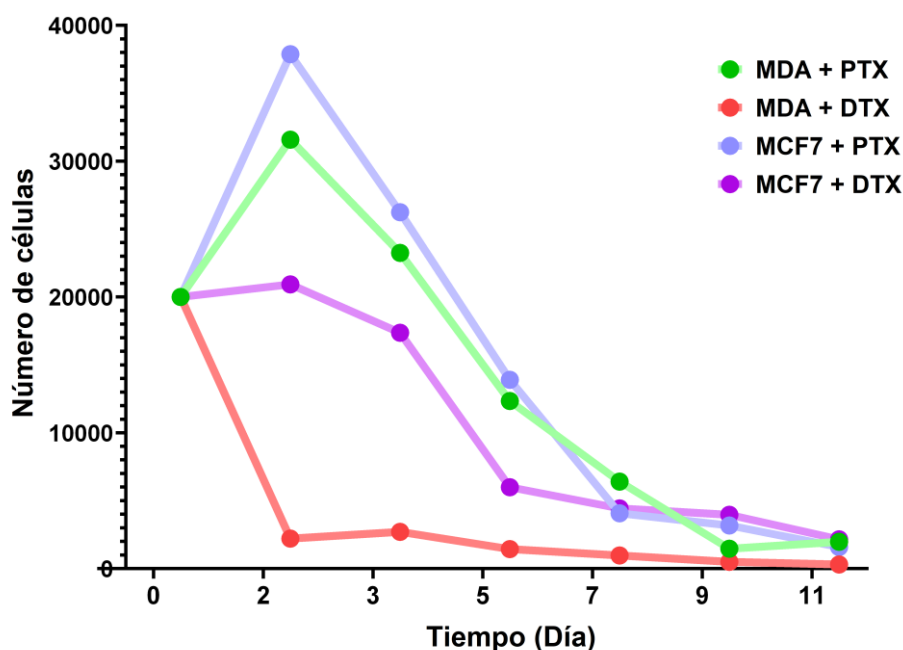
#### **4.1.3 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE PACLITAXEL Y DOCETAXEL SOBRE LA CINÉTICA PROLIFERATIVA EN 2D**

El análisis comparativo entre líneas celulares y tratamientos evidencia diferencias relevantes en la magnitud y temporalidad de la respuesta proliferativa (Gráfica 1). Mientras que MDA-MB-231 mostró una disminución temprana y marcada bajo tratamiento con DTX, MCF-7 presentó una fase inicial de expansión celular más pronunciada antes de evidenciar el declive poblacional.

De forma general, PTX permitió una expansión inicial más evidente en ambas líneas celulares, seguida de una reducción progresiva en el número de células. En contraste, DTX indujo una disminución más temprana, particularmente en MDA-MB-231, donde el efecto inhibitorio se manifestó desde los primeros puntos temporales.

Hacia los días finales del seguimiento, todas las condiciones convergieron en una reducción significativa del número celular, aunque con diferencias claras en la velocidad y el patrón de respuesta. En conjunto, estos resultados demuestran que la dinámica proliferativa en modelo 2D depende tanto del tipo celular como del taxano administrado, evidenciando perfiles de sensibilidad temporal diferenciados bajo exposición continua a estos agentes.

**Gráfica 1. Curva de crecimiento de células MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con Paclitaxel y Docetaxel en modelos 2D.**



**Nota.** Número de células en función del tiempo (días 0–11). Células MDA-MB-231 tratadas con 45 nM de paclitaxel (MDA+PTX, línea verde), células MDA-MB-231 tratadas con 45 nM de docetaxel (MDA+DTX, línea roja), células MCF-7 tratadas con 70 nM de paclitaxel (MCF-7 + PTX, línea azul), células MCF-7 tratadas con 70 nM de docetaxel (MCF-7 + DTX, línea morada).

#### 4.2 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE ENSAYO MTT

Con el objetivo de caracterizar la sensibilidad de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 frente a los taxanos PTX y DTX, tras 48 h y 72 h de exposición. Se evaluaron los parámetros de viabilidad e inducción de citotoxicidad en modelos de cultivo bidimensional (2D) y tridimensional (3D). El análisis se realizó a través de curvas dosis–

respuesta que permitieron determinar la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) para cada línea celular.

#### **4.2.1 VIABILIDAD CELULAR EN MODELO 2D**

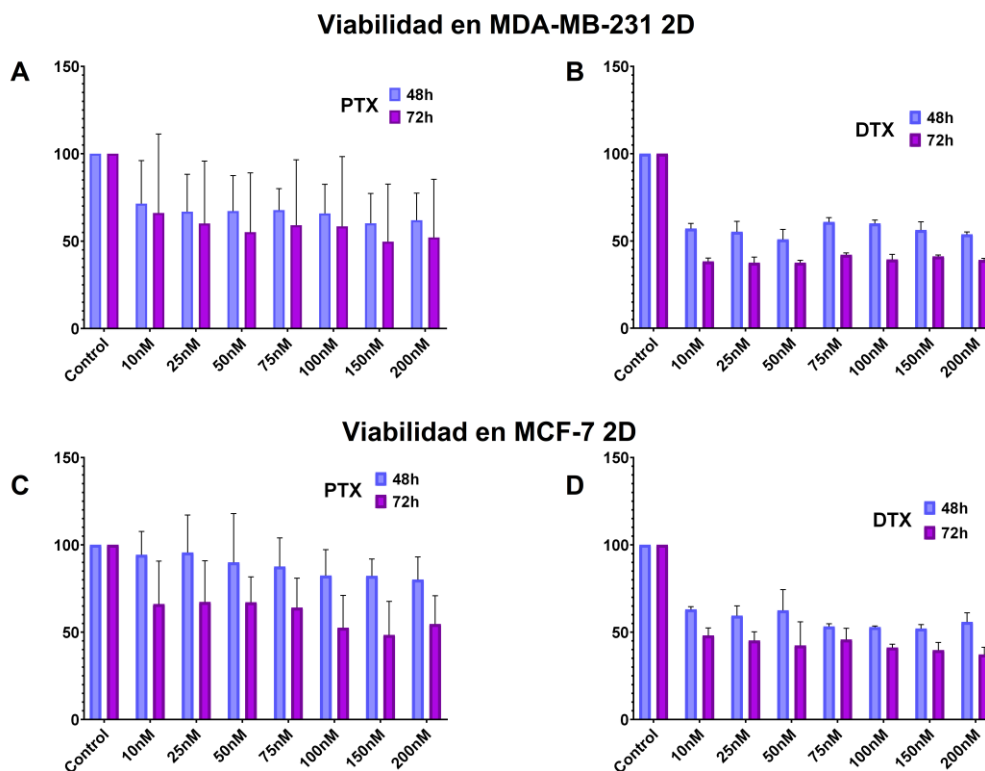
En el modelo bidimensional (2D), ambas líneas celulares mostraron una reducción progresiva de la viabilidad conforme aumentó la concentración de los taxanos PTX y DTX (Gráfica 2 A–D). La tendencia general fue dependiente de dosis y consistente en ambos tiempos de exposición evaluados (48 h y 72 h), observándose una disminución más marcada a las 72 h en comparación con 48 h, lo que evidencia un efecto dependiente tanto de la concentración como del tiempo de tratamiento.

En la línea MDA-MB-231, el tratamiento con PTX indujo una reducción gradual y sostenida del porcentaje de células viables a medida que aumentó la concentración. Esta disminución fue más pronunciada a las 72 h, donde los valores de viabilidad alcanzaron niveles inferiores respecto a las 48 h. De forma similar, DTX generó una reducción marcada y progresiva en todo el rango de concentraciones evaluado. Comparativamente, DTX mostró un efecto inhibitorio más intenso que PTX a concentraciones equivalentes, particularmente a las 72 h, sugiriendo una mayor potencia citotóxica en este modelo 2D.

Por su parte, la línea MCF-7 también presentó una disminución dependiente de la concentración tras el tratamiento con ambos taxanos. La exposición a PTX produjo una reducción progresiva de la viabilidad, manteniéndose la tendencia dosis–dependiente en ambos tiempos de incubación. El tratamiento con DTX generó igualmente una disminución significativa, aunque la magnitud de la respuesta fue ligeramente menor en comparación con MDA-MB-231. Las curvas de respuesta en MCF-7 mostraron un desplazamiento hacia concentraciones mayores, indicando una menor sensibilidad relativa bajo condiciones bidimensionales.

El análisis de las curvas permitió estimar valores de  $IC_{50}$  de 45 nM para MDA-MB-231 y 70 nM para MCF-7 en el modelo 2D, confirmando diferencias cuantificables en la sensibilidad farmacológica entre ambas líneas celulares. En conjunto, los resultados evidencian que la respuesta en 2D está determinada por una interacción entre tipo celular, tipo de taxano, concentración administrada y tiempo de exposición, siendo MDA-MB-231 la línea más sensible en estas condiciones experimentales.

**Gráficas 2. Viabilidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 2D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.**



**Nota.** Viabilidad celular de células MDA-MB-231 y MCF-7 2D tratadas con Docetaxel (DTX) y Paclitaxel (PTX). Tiempos de exposición de 48 h (azul) y 72 h (morado). **A)** Células MDA+PTX; **B)** Células MDA+DTX; **C)** Células MCF-7+PTX; **D)** Células MCF-7+DTX.

#### 4.2.2 VIABILIDAD CELULAR EN MODELO 3D

En el modelo tridimensional (3D), ambas líneas celulares respondieron al tratamiento con los taxanos PTX y DTX (Gráfica 3 A–D); sin embargo, la magnitud de la reducción en la viabilidad fue menor en comparación con el modelo bidimensional (2D), evidenciando una modulación del efecto farmacológico en el contexto tridimensional.

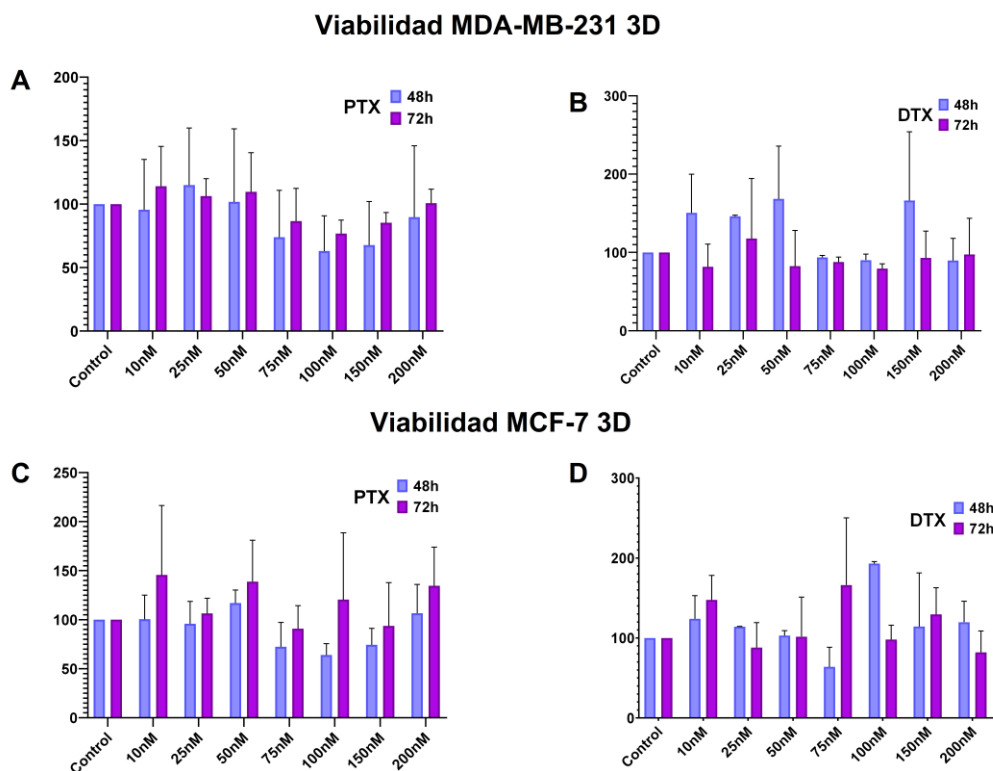
En los esferoides de MDA-MB-231, la viabilidad celular disminuyó progresivamente conforme aumentó la concentración de ambos fármacos, manteniéndose una tendencia dependiente de dosis en los dos tiempos de exposición evaluados (48 h y 72 h). No obstante, el perfil de reducción fue más gradual que en monocapa, particularmente en concentraciones intermedias, donde los porcentajes de viabilidad permanecieron relativamente superiores a los observados en 2D. A las 72 h se evidenció una disminución ligeramente mayor respecto a las 48 h, confirmando un efecto dependiente del tiempo;

aun así, la magnitud global de la respuesta fue inferior a la registrada en el modelo bidimensional.

De manera similar, los esferoides de MCF-7 mostraron una reducción progresiva de la viabilidad tras el tratamiento con PTX y DTX, conservando el patrón dosis-dependiente en ambos tiempos de incubación. Sin embargo, la línea mantuvo su comportamiento de menor sensibilidad relativa frente a MDA-MB-231, requiriendo concentraciones mayores para alcanzar reducciones comparables en la viabilidad. Al igual que en la otra línea, la disminución fue más evidente a las 72 h; no obstante, el efecto citotóxico en 3D fue globalmente menos pronunciado que en 2D.

En conjunto, los resultados indican que, aunque los taxanos conservaron su actividad antiproliferativa en condiciones tridimensionales, la arquitectura 3D moduló la magnitud de la respuesta farmacológica.

### Gráficas 3. Viabilidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 3D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.



**Nota.** Viabilidad celular de células MDA-MB-231 y MCF-7 3D tratadas con Docetaxel (DTX) y Paclitaxel (PTX). Tiempos de exposición de 48 h (azul) y 72 h (morado). **A)** Células MDA+PTX; **B)** Células MDA+DTX; **C)** Células MCF-7+PTX; **D)** Células MCF-7+DTX.

#### 4.3 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DERIVADA DEL ENSAYO MTT

La citotoxicidad fue evaluada como un parámetro complementario a la viabilidad celular, permitiendo cuantificar la pérdida celular inducida por los tratamientos y complementar la interpretación de las curvas de viabilidad.

##### 4.3.1 CITOTOXICIDAD EN MODELO BIDIMENSIONAL (2D)

En el modelo 2D, tanto PTX como DTX indujeron un incremento progresivo de la citotoxicidad conforme aumentó la concentración del fármaco en ambas líneas celulares (Gráfica 4 A–D). El patrón observado fue consistente con la reducción de viabilidad previamente descrita y evidenció un comportamiento claramente dependiente de dosis.

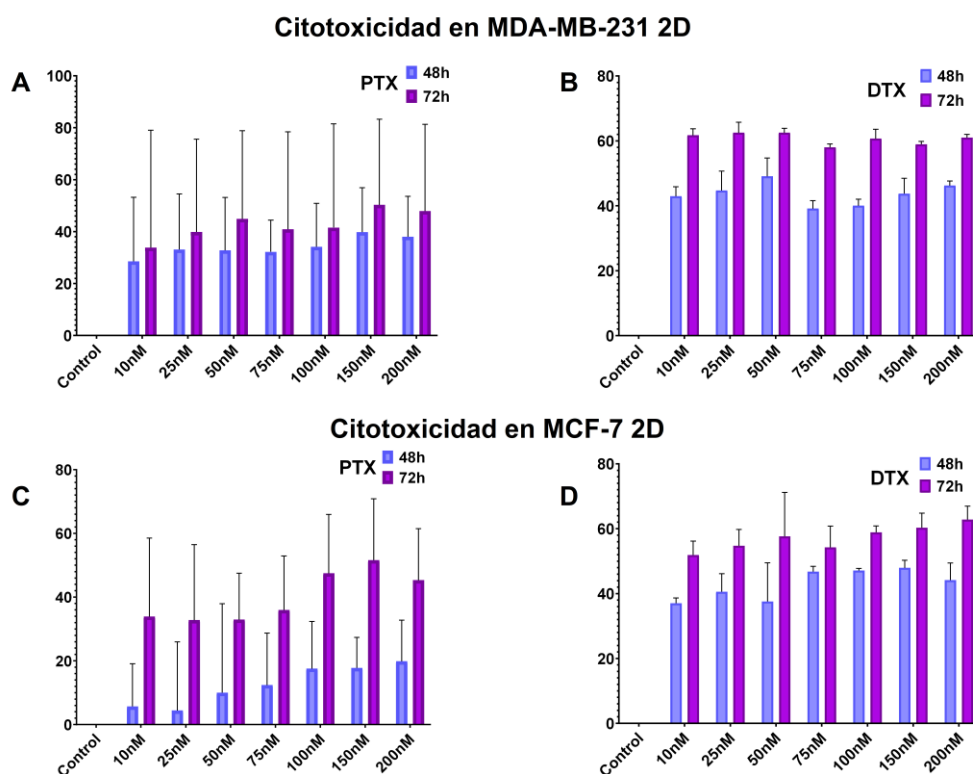
En la línea MDA-MB-231, los valores de citotoxicidad aumentaron de forma sostenida a medida que se incrementó la concentración, alcanzando niveles más elevados en

comparación con MCF-7 a concentraciones equivalentes. Este efecto fue más pronunciado a las 72 h respecto a las 48 h, evidenciando una tendencia a mayor efecto con tiempos prolongados de exposición. Comparativamente, DTX generó porcentajes de citotoxicidad ligeramente superiores a PTX en el mismo rango de concentraciones, en concordancia con la mayor reducción de viabilidad observada en esta línea celular.

Por su parte, la línea MCF-7 presentó un incremento gradual de la citotoxicidad en respuesta a ambos taxanos, manteniendo un patrón dosis-dependiente en los dos tiempos evaluados. No obstante, la magnitud del efecto fue menor en comparación con MDA-MB-231, particularmente en concentraciones intermedias.

En conjunto, los resultados de citotoxicidad en 2D confirman que la disminución de la viabilidad observada tras el tratamiento con taxanos se traduce en una pérdida celular efectiva, con diferencias cuantificables entre líneas celulares, tipo de fármaco y tiempo de exposición.

**Gráficas 4. Citotoxicidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 2D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.**



**Nota.** Citotoxicidad celular de células MDA-MB-231 y MCF-7 2D tratadas con Docetaxel (DTX) y Paclitaxel (PTX). Tiempos de exposición de 48 h (azul) y 72 h (morado). **A)** Células MDA+PTX; **B)** Células MDA+DTX; **C)** Células MCF-7+PTX; **D)** Células MCF-7+DTX.

### 4.3.2 CITOTOXICIDAD EN MODELO TRIDIMENSIONAL (3D)

En el modelo tridimensional (3D), tanto PTX como DTX indujeron un incremento progresivo de la citotoxicidad conforme aumentó la concentración en ambas líneas celulares (Gráfica 5 A–D), manteniéndose un patrón dependiente de dosis similar al observado en el modelo bidimensional.

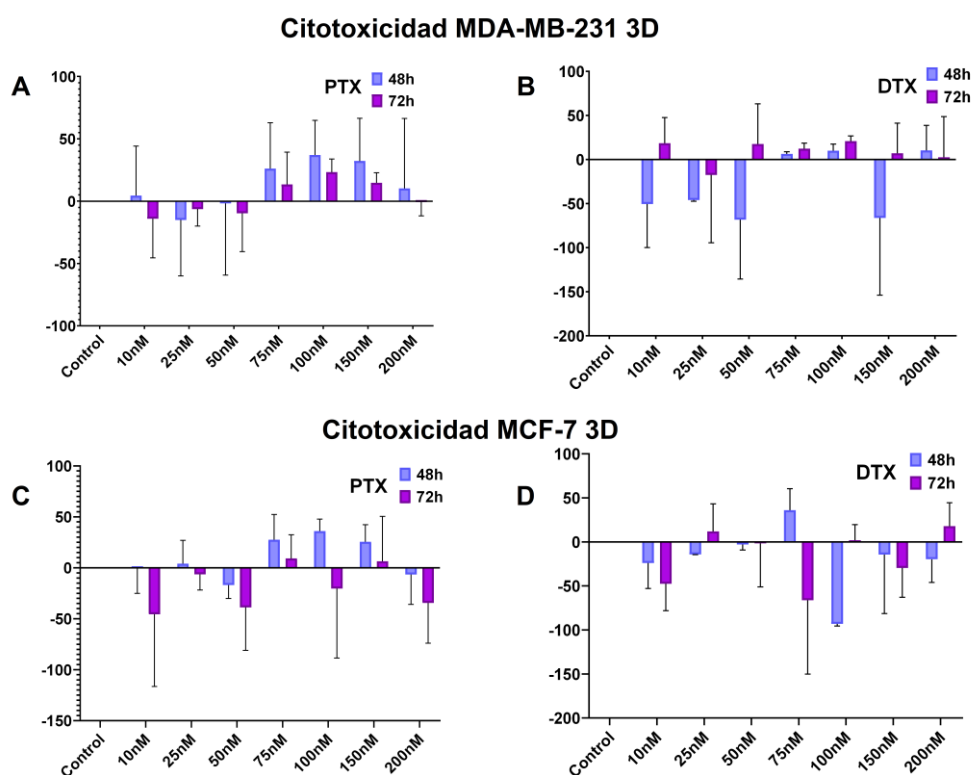
En los esferoides de MDA-MB-231, la citotoxicidad aumentó gradualmente a medida que se incrementó la concentración del fármaco, observándose valores ligeramente mayores a las 72 h en comparación con 48 h. No obstante, la magnitud del efecto fue inferior a la registrada en el modelo 2D en concentraciones equivalentes.

Por su parte, los esferoides de MCF-7 mostraron igualmente un aumento dependiente de la concentración frente a ambos taxanos; sin embargo, los porcentajes de citotoxicidad alcanzados fueron menores en comparación con MDA-MB-231, especialmente en

concentraciones intermedias. De forma similar a lo observado en la otra línea, los valores a las 72 h fueron discretamente superiores a los de 48 h.

En conjunto, los resultados indican que los taxanos conservaron su actividad citotóxica en condiciones tridimensionales, aunque la magnitud de la respuesta fue modulada por la arquitectura 3D, evidenciando una menor susceptibilidad relativa en comparación con el cultivo en monocapa.

**Gráficas 5. Citotoxicidad en células MDA-MB-231 y MCF-7 3D tratadas con Docetaxel y Paclitaxel.**



**Nota.** Citotoxicidad celular de células MDA-MB-231 y MCF-7 3D tratadas con Docetaxel (DTX) y Paclitaxel (PTX). Tiempos de exposición de 48 h (azul) y 72 h (morado). **A)** Células MDA+PTX; **B)** Células MDA+DTX; **C)** Células MCF-7+PTX; **D)** Células MCF-7+DTX.

#### **4.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-QPCR TRAS TRATAMIENTO CON TAXANOS**

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares asociados a la respuesta diferencial observada en los modelos 2D y 3D bajo tratamiento con taxanos, se evaluó la expresión relativa de genes vinculados a la regulación del ciclo celular, apoptosis y dinámica de microtúbulos mediante RT-qPCR.

Los niveles de expresión se normalizaron frente al gen endógeno de referencia GAPDH y se calcularon utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , lo que permitió comparar la expresión relativa entre las condiciones tratadas y sus respectivos controles. Para cada línea celular y arquitectura de cultivo, el grupo control fue establecido como valor 1; en consecuencia, valores superiores a 1 indican sobreexpresión del gen evaluado, mientras que valores inferiores a 1 representan una disminución relativa respecto al control.

Las gráficas 6, 7 y 8 muestran la expresión relativa de los genes analizados tras tratamiento con PTX y DTX en modelos 2D y 3D de las líneas MDA-MB-231 y MCF7, incluyendo la evaluación temporal en los distintos tiempos experimentales.

El análisis incluyó los genes p21 como regulador del ciclo celular, BAX como marcador proapoptótico y TUBB3 como isoforma de  $\beta$ -tubulina asociada a la dinámica de microtúbulos y a mecanismos relacionados con la respuesta a taxanos. Estos marcadores fueron seleccionados en función de su relevancia en la respuesta celular al estrés mitótico inducido por agentes antimitóticos.

##### **4.4.1 EXPRESIÓN DE P21**

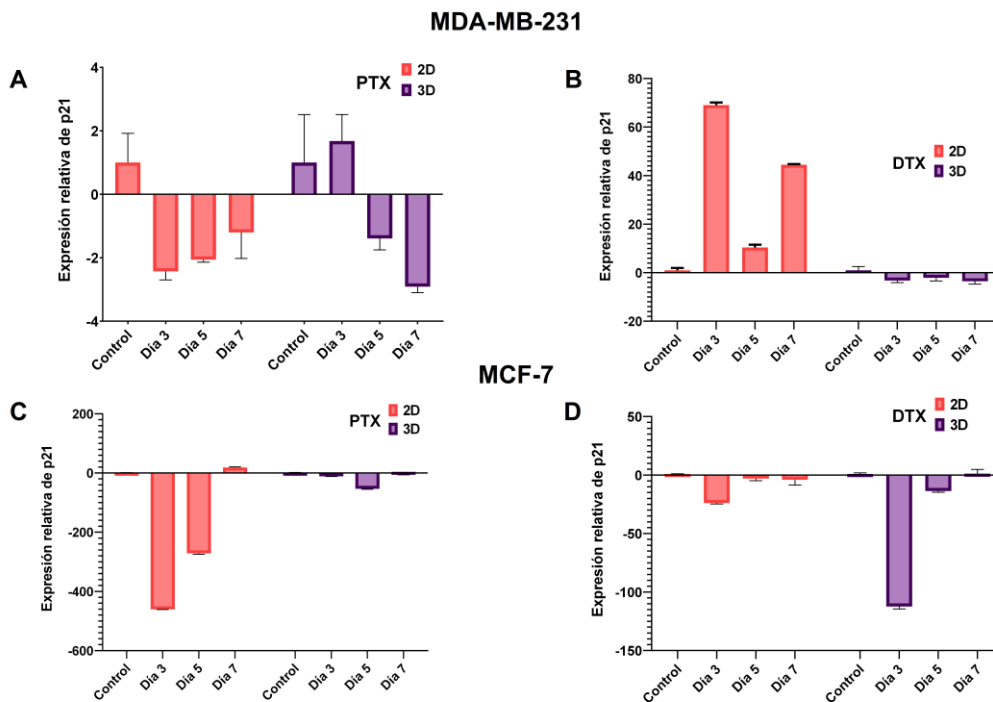
En MDA-MB-231 tratadas con PTX (Gráfica 6A), el modelo 2D mostró una disminución sostenida de la expresión a lo largo de los días evaluados, mientras que el modelo 3D presentó un incremento inicial en el día 3, seguido de una reducción progresiva en los tiempos posteriores, evidenciando un comportamiento diferencial dependiente de la arquitectura celular.

Bajo tratamiento con DTX (Gráfica 6B), MDA-MB-231 en 2D exhibió un aumento marcado de la expresión desde el día 3, manteniéndose elevado hasta el día 7, mientras que el modelo 3D mostró una disminución consistente en todos los tiempos evaluados.

En la línea MCF7, el tratamiento con PTX (Gráfica 6C) produjo en 2D una disminución en los primeros días, seguida de un incremento en el día 7. En 3D, la expresión permaneció disminuida durante todo el periodo evaluado. Con DTX (Gráfica 6D), tanto en 2D como en 3D se observó una reducción inicial, aunque el modelo tridimensional mostró un leve aumento en el día 7.

En conjunto, la expresión de p21 evidenció una regulación dependiente del tipo de taxano, del tiempo de exposición y de la arquitectura del cultivo, con patrones contrastantes entre 2D y 3D, particularmente en MDA-MB-231.

**Gráficas 6. Expresión relativa de p21 tras tratamiento con paclitaxel y docetaxel en modelos 2D y 3D.**



**Nota.** Expresión relativa de p21 determinada por RT-qPCR en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 cultivadas en modelos 2D y 3D tras tratamiento con PTX y DTX. (A) MDA-MB-231 tratadas con PTX; (B) MDA-MB-231 tratadas con DTX; (C) MCF7 tratadas con PTX; (D) MCF7 tratadas con DTX. El modelo 2D se representa en color rosado y el modelo 3D en color morado. Los valores fueron calculados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y normalizados frente al gen de referencia correspondiente.

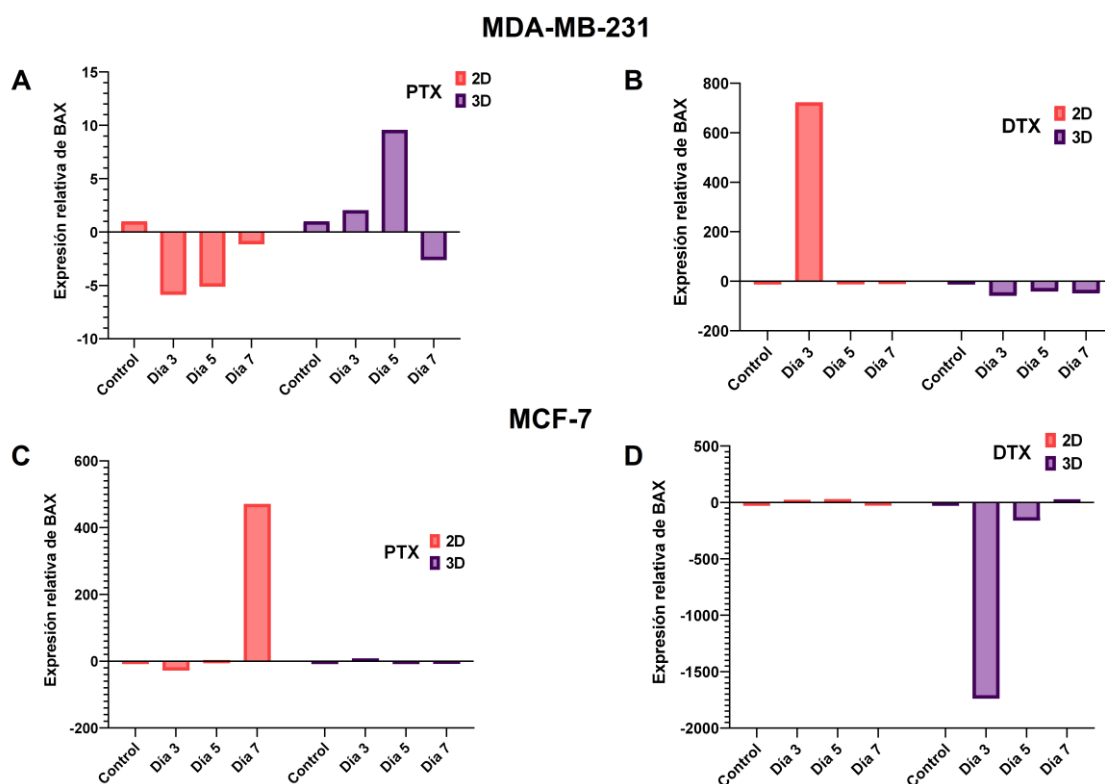
#### **4.4.2 EXPRESIÓN DE BAX**

En MDA-MB-231 tratadas con PTX (Gráfica 7A), el modelo 2D mostró una disminución de la expresión en todos los tiempos evaluados, mientras que el modelo 3D presentó un aumento en los días 3 y 5, seguido de una reducción de la expresión en el día 7. Bajo tratamiento con DTX (Gráfica 7B), el patrón fue opuesto entre arquitecturas: en 2D se evidenció un incremento temprano que se mantuvo en los días posteriores, mientras que en 3D la expresión permaneció disminuida a lo largo del seguimiento.

En MCF7, el tratamiento con PTX (Gráfica 7C) produjo en 2D una reducción inicial seguida de incremento en el día 7, mientras que en 3D la expresión se mantuvo disminuida durante la mayor parte del experimento. Con DTX (Gráfica 7D), el modelo tridimensional mostró una reducción marcada en los primeros días, mientras que en 2D los cambios fueron menos pronunciados y con ligero aumento de expresión en el día 7.

De manera general, la expresión de BAX mostró diferencias marcadas entre 2D y 3D, especialmente bajo tratamiento con DTX, donde los patrones fueron opuestos entre ambas arquitecturas.

Gráficas 7. Expresión relativa de BAX inducida por taxanos en modelos 2D y 3D.



**Nota.** Expresión relativa de BAX evaluada por RT-qPCR en MDA-MB-231 y MCF7 en condiciones de cultivo bidimensional (2D) y tridimensional (3D) tras tratamiento con PTX y DTX. (A) MDA-MB-231 + PTX; (B) MDA-MB-231 + DTX; (C) MCF7 + PTX; (D) MCF7 + DTX. El modelo 2D se representa en color rosado y el modelo 3D en color morado. Los resultados se expresan como cambio relativo respecto al control correspondiente.

#### 4.4.3 EXPRESIÓN DE TUBB3

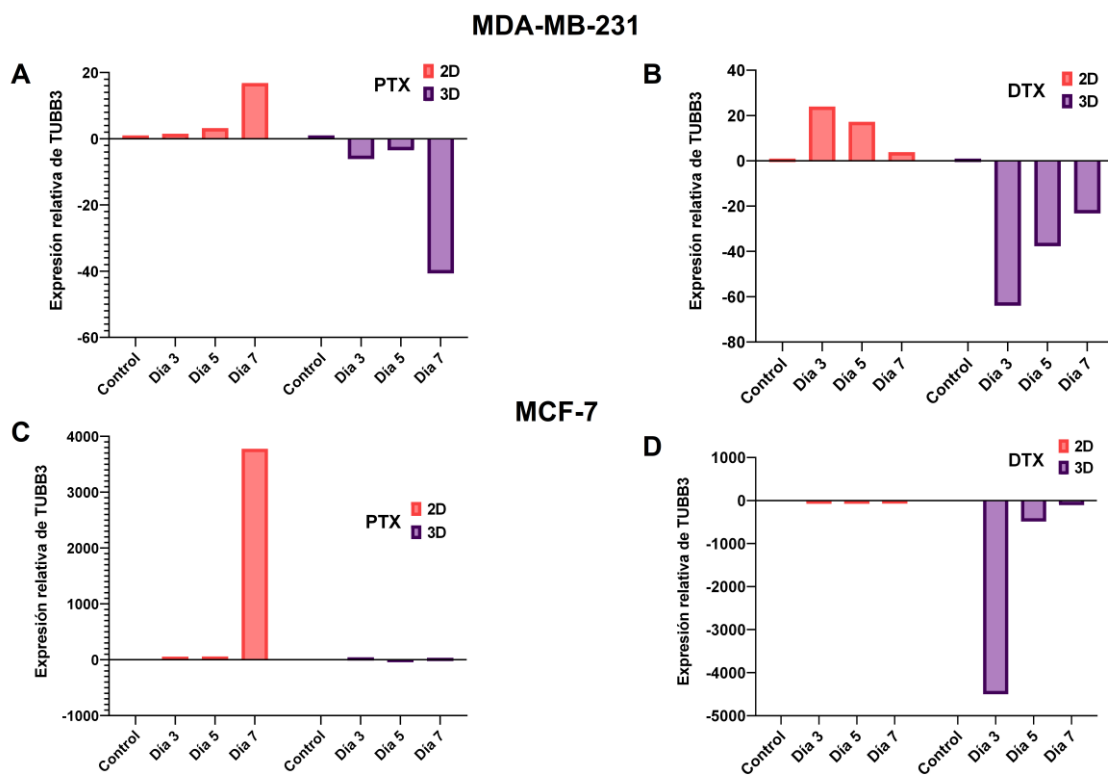
En MDA-MB-231 tratadas con PTX (Gráfica 8A), el modelo 2D presentó un incremento progresivo de la expresión desde el día 3 hasta el día 7, mientras que el modelo 3D mostró una disminución sostenida en todos los tiempos evaluados. Con DTX (Gráfica 8B), el patrón se mantuvo similar, con aumentos consistentes en el modelo 2D y disminuciones en 3D.

En MCF7 tratadas con PTX (Gráfica 8C), la expresión en 2D disminuyó en los primeros tiempos y aumentó en el día 7, mientras que en 3D se observó una reducción sostenida

durante todo el periodo evaluado. Bajo DTX (Gráfica 8D), MCF7 mostró un incremento progresivo en 2D, en contraste con una disminución marcada y persistente en el modelo tridimensional.

En conjunto, TUBB3 presentó un patrón consistente caracterizado por incrementos predominantes en el modelo 2D y reducciones sostenidas en 3D, independientemente del taxano evaluado.

**Gráficas 8. Expresión relativa de TUBB3 en respuesta a taxanos en modelos 2D y 3D.**



**Nota.** Expresión relativa de TUBB3 determinada por RT-qPCR en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 cultivadas en modelos 2D y 3D tras exposición a PTX y DTX. (A) MDA-MB-231 + PTX; (B) MDA-MB-231 + DTX; (C) MCF7 + PTX; (D) MCF7 + DTX. El modelo 2D se representa en color rosado y el modelo 3D en color morado. La cuantificación se realizó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , normalizando frente al gen de referencia y comparando con el control correspondiente.

# CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1 DINÁMICA PROLIFERATIVA BAJO TRATAMIENTO CON TAXANOS EN MODELO 2D**

La curva de crecimiento bajo tratamiento continuo aporta un nivel interpretativo adicional que complementa los ensayos de viabilidad, ya que permite observar la evolución temporal de la población celular más allá de un punto final específico. En MDA-MB-231, la exposición a PTX permitió una breve fase proliferativa inicial antes de generar un colapso progresivo de la población celular, mientras que con DTX la reducción fue temprana y abrupta, sin evidencia de recuperación en ningún punto del seguimiento. Estos resultados sugieren que, aunque ambos taxanos comparten un mecanismo de acción común basado en la estabilización de los microtúbulos, la cinética del efecto citotóxico podría diferir entre ellos.

Los taxanos actúan promoviendo la polimerización y estabilización de los microtúbulos, impidiendo su desensamblaje dinámico, lo que conduce a un bloqueo prolongado en la transición metafase–anafase y eventualmente a apoptosis tras un arresto mitótico sostenido. En este contexto, la fase inicial de mantenimiento proliferativo observada podría explicarse porque las células que ya habían superado el punto de control G2/M al momento de la exposición pueden completar parcialmente el ciclo celular antes de acumular daño mitótico irreversible. Este comportamiento ha sido descrito en modelos celulares donde el efecto máximo del paclitaxel se manifiesta tras varios ciclos celulares, dependiendo del estado proliferativo basal (Weaver, 2014).

La reducción más temprana observada con docetaxel en MDA-MB-231 podría explicarse por diferencias farmacodinámicas entre ambos taxanos. Se ha reportado que docetaxel presenta mayor afinidad por la tubulina y mayor capacidad para inducir estabilización persistente del huso mitótico, lo que podría traducirse en una inducción más rápida de apoptosis en determinados contextos celulares (Crown, 2001). Además, MDA-MB-231 corresponde a un subtipo triple negativo caracterizado por alta tasa proliferativa y mayor dependencia de la dinámica mitótica, lo que podría incrementar su susceptibilidad a agentes antimitóticos (Bianchini et al., 2016). En este sentido, los resultados obtenidos son consistentes con lo descrito para tumores triple negativos, que en ciertos contextos muestran elevada sensibilidad inicial a taxanos.

Por el contrario, en MCF-7 se observó un comportamiento más moderado. El tratamiento con PTX produjo el incremento proliferativo más alto registrado al inicio del experimento, seguido de un descenso sostenido, mientras que DTX generó un aumento inicial menos pronunciado y una reducción gradual del número celular. Este patrón podría explicarse por la biología luminal de MCF-7, línea caracterizada por expresión de receptores hormonales y una regulación del ciclo celular influenciada por señalización estrogénica. Se ha descrito que en células luminales la progresión del ciclo celular puede estar modulada por rutas que favorecen arrestos reversibles y activación de mecanismos de supervivencia, lo que podría atenuar el impacto temprano del daño mitótico (Kavallaris, 2010).

Asimismo, estudios han señalado que la expresión diferencial de  $\beta$ III-tubulina y la activación de vías antiapoptóticas pueden contribuir a una respuesta más gradual frente a taxanos en determinados modelos de cáncer de mama (Kavallaris, 2010). En conjunto, estos resultados sugieren que la cinética proliferativa observada no solo depende del fármaco administrado, sino también del contexto molecular específico de cada línea celular. La divergencia temporal entre MDA-MB-231 y MCF-7 podría reflejar diferencias en la capacidad de activar mecanismos compensatorios frente al estrés mitótico, más que una simple variación en la potencia farmacológica.

## **5.2 SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA EN MODELO 2D: ANÁLISIS DE VIABILIDAD E IC<sub>50</sub>**

La diferencia en los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para MDA-MB-231 (45 nM) y MCF-7 (70 nM) sugiere una variabilidad intrínseca en la sensibilidad a taxanos entre ambos subtipos celulares. Más allá de representar una diferencia cuantitativa, esta divergencia podría estar asociada a características moleculares propias de cada linaje tumoral. Diversos análisis transcriptómicos han demostrado que los tumores triple negativos presentan mayor enriquecimiento en firmas génicas relacionadas con proliferación, control del huso mitótico y actividad del ciclo celular, lo que podría incrementar su vulnerabilidad frente a agentes que interfieren con la dinámica de microtúbulos (Lehmann et al., 2011; Bianchini et al., 2016).

En contraste, las células luminales como MCF-7 suelen exhibir una regulación más compleja del ciclo celular, mediada por señalización hormonal y activación de rutas de supervivencia que podrían modular la respuesta inicial al estrés mitótico. Se ha descrito que la activación de vías como PI3K/AKT y MAPK puede favorecer la supervivencia celular bajo presión farmacológica, disminuyendo la eficacia citotóxica inmediata de los taxanos (Hanker et al., 2013). En este contexto, la mayor concentración requerida para alcanzar el 50 % de inhibición en MCF-7 podría explicarse por la presencia de mecanismos compensatorios que amortiguan el daño inducido por la estabilización de microtúbulos.

Otro elemento que podría contribuir a esta diferencia es la heterogeneidad en la expresión de proteínas asociadas al ensamblaje del huso mitótico y a la regulación de la apoptosis. Se ha documentado que alteraciones en la expresión de proteínas como survivina o miembros de la familia Bcl-2 pueden modular la sensibilidad a fármacos antimitóticos en cáncer de mama, afectando el umbral necesario para desencadenar muerte celular tras arresto mitótico prolongado (Gascoigne & Taylor, 2008). Esto sugiere que la respuesta diferencial observada podría depender no solo del efecto primario sobre microtúbulos, sino también de la capacidad de cada línea para activar programas apoptóticos efectivos.

Adicionalmente, estudios preclínicos han señalado que la sensibilidad a taxanos puede variar según el contexto genético y el estado proliferativo basal, factores que influyen en la probabilidad de que las células entren en arresto mitótico irreversible (Swanton et al., 2009). En este sentido, la mayor sensibilidad relativa de MDA-MB-231 podría estar asociada a su perfil altamente proliferativo y menor dependencia de mecanismos hormonales de regulación, lo que favorecería una respuesta citotóxica más directa frente a la interferencia del huso mitótico.

En conjunto, los valores de  $IC_{50}$  obtenidos en el modelo 2D son coherentes con la literatura que describe diferencias de sensibilidad a taxanos entre subtipos moleculares de cáncer de mama. Estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar el contexto biológico específico de cada línea celular al interpretar parámetros cuantitativos de respuesta farmacológica, evitando extrapolaciones simplificadas basadas únicamente en la potencia aparente del fármaco.

### **5.3 CORRELACIÓN ENTRE VIABILIDAD Y CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR TAXANOS**

Un aspecto particularmente relevante de los resultados obtenidos es la concordancia entre la disminución de viabilidad celular y el incremento en los valores de citotoxicidad derivados del ensayo MTT. Esta correspondencia sugiere que el efecto de PTX y DTX no se limitó a una inhibición transitoria de la proliferación, sino que implicó una pérdida real de células viables. En líneas celulares sensibles, los taxanos inducen un arresto mitótico prolongado que puede culminar en apoptosis mediante activación de la vía intrínseca mitocondrial (Weaver, 2014).

Se ha descrito que la duración del arresto mitótico es determinante para el destino celular. Cuando el bloqueo del ciclo celular se mantiene por tiempo prolongado, las células tienden a activar mecanismos de muerte; en cambio, si el arresto es breve, algunas pueden sobrevivir o adaptarse (Gascoigne & Taylor, 2008). En este contexto, la disminución de viabilidad observada en el presente estudio podría explicarse por un arresto mitótico suficientemente sostenido como para desencadenar muerte celular.

Adicionalmente, los taxanos pueden inducir alteraciones graves en la división celular que conducen a pérdida irreversible de viabilidad, incluso cuando la muerte celular programada no es inmediata. Este fenómeno, descrito como mitotic catastrophe, también contribuye a la reducción del número celular tras exposición a agentes antimitóticos (Vitale et al., 2011). Esto ayuda a explicar por qué la reducción metabólica detectada por MTT estuvo acompañada por un incremento en citotoxicidad.

La consistencia entre ambos parámetros fortalece la interpretación de los valores de  $IC_{50}$  obtenidos y respalda que el efecto observado fue predominantemente citotóxico más que citostático. En conjunto, los resultados concuerdan con la literatura que describe a los taxanos como agentes capaces de inducir muerte celular irreversible en modelos sensibles (Weaver, 2014; Vitale et al., 2011).

### **5.4 INFLUENCIA DE LA ARQUITECTURA TRIDIMENSIONAL EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA**

La comparación entre los modelos 2D y 3D aporta una dimensión adicional a la interpretación de los resultados, ya que la arquitectura celular puede modular de forma

significativa la respuesta a agentes antimetabólicos. En el modelo bidimensional, las células crecen en una monocapa adherente, con exposición homogénea al fármaco y condiciones relativamente uniformes de oxígeno y nutrientes. En contraste, los esferoides tridimensionales reproducen de manera más fiel ciertas características del microambiente tumoral, incluyendo gradientes de difusión, zonas hipóxicas y una organización espacial que favorece interacciones célula–célula y célula–matriz (Edmondson et al., 2014). Estas diferencias estructurales podrían explicar las variaciones observadas en la sensibilidad a taxanos entre ambos modelos experimentales.

En cultivos 3D, la penetración del fármaco puede verse limitada por la compactación celular y por la formación de capas externas proliferativas que protegen regiones internas menos activas metabólicamente. Este fenómeno ha sido descrito como un factor determinante en la tolerancia farmacológica en esferoides tumorales, donde las células centrales pueden encontrarse en estados de bajo ciclo celular o estrés adaptativo (Antoni et al., 2015). Dado que los taxanos ejercen su efecto principalmente sobre células en división activa, la presencia de subpoblaciones menos proliferativas podría contribuir a una aparente disminución de sensibilidad en el modelo tridimensional.

Además, la arquitectura 3D puede activar rutas de supervivencia mediadas por señales de adhesión celular y matriz extracelular, fenómeno conocido como cell adhesion–mediated drug resistance (CAM-DR). Se ha sugerido que la interacción con componentes de la matriz puede modular la señalización intracelular y favorecer respuestas adaptativas frente a estrés farmacológico (Correia & Bissell, 2012). En este contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían interpretarse como una manifestación de dicha adaptación estructural, más que como una pérdida absoluta de actividad del fármaco.

No obstante, el hecho de que los taxanos mantuvieran un efecto citotóxico detectable en el modelo 3D sugiere que su mecanismo de acción conserva eficacia incluso bajo condiciones arquitectónicas más complejas. Esto es consistente con lo descrito en modelos preclínicos donde, aunque los esferoides muestran mayor tolerancia relativa en comparación con cultivos 2D, los agentes estabilizadores de microtúbulos continúan induciendo reducción proliferativa y muerte celular (Edmondson et al., 2014; Antoni et al., 2015). En conjunto, estos hallazgos refuerzan la relevancia del uso complementario de modelos 2D y 3D para una evaluación más integral de la respuesta farmacológica.

## 5.5 IMPLICACIONES BIOLÓGICAS Y RELEVANCIA TRASLACIONAL

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la respuesta a taxanos no depende exclusivamente de la concentración administrada, sino del contexto biológico específico de cada subtipo celular y de la organización estructural del modelo experimental. La mayor sensibilidad observada en MDA-MB-231 podría explicarse por su alta tasa proliferativa y su marcada dependencia de la dinámica mitótica, característica frecuente de los tumores triple negativos. Estudios transcriptómicos han mostrado que este subtipo presenta enriquecimiento en genes asociados a proliferación y ciclo celular, lo que podría incrementar su vulnerabilidad frente a agentes que interfieren con el huso mitótico (Lehmann et al., 2011).

Por el contrario, la menor sensibilidad relativa observada en MCF-7 podría estar asociada a la biología luminal de esta línea, caracterizada por regulación hormonal del crecimiento y activación de rutas de supervivencia que modulan la respuesta al estrés celular. Se ha descrito que las células luminales pueden activar mecanismos adaptativos frente a taxanos, incluyendo regulación diferencial de proteínas asociadas a microtúbulos y activación de señales prosupervivencia, lo que podría contribuir a una respuesta más gradual o parcialmente resistente (O'Shaughnessy, 2005). En este contexto, los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en el presente estudio podrían interpretarse como una manifestación funcional de estas diferencias moleculares subyacentes.

Desde una perspectiva preclínica, la incorporación del modelo tridimensional fortalece la validez biológica de los hallazgos. Los tumores sólidos *in vivo* presentan heterogeneidad estructural, gradientes de oxígeno y subpoblaciones celulares con distintos estados proliferativos, factores que influyen en la eficacia terapéutica (Hirschhaeuser et al., 2010). Por ello, el mantenimiento de actividad citotóxica en el modelo 3D sugiere que los taxanos conservan eficacia incluso bajo condiciones que simulan de manera más cercana el microambiente tumoral.

Estos hallazgos podrían tener implicaciones relevantes para la selección del tratamiento según el subtipo molecular del tumor. Aunque el presente trabajo se desarrolla en un contexto experimental *in vitro*, los resultados son consistentes con algunos estudios de que los tumores triple negativos pueden mostrar mayor sensibilidad inicial a quimioterapia basada en taxanos, mientras que los tumores luminales podrían requerir

estrategias combinadas que superen mecanismos adaptativos (Lehmann et al., 2011; O'Shaughnessy, 2005). En consecuencia, el estudio refuerza la importancia de integrar características moleculares y arquitectónicas en el diseño de modelos preclínicos orientados a optimizar la selección terapéutica.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la sensibilidad diferencial observada entre MDA-MB-231 y MCF-7 podría estar asociada a mecanismos moleculares específicos aún no completamente dilucidados. Asimismo, se reafirma el valor del modelo tridimensional como herramienta complementaria en la evaluación farmacológica, al aportar un contexto más representativo de la complejidad tumoral en el estudio de agentes antimetabólicos.

## **5.6 INTEGRACIÓN MOLECULAR DE LA RESPUESTA A TAXANOS**

Los taxanos, como PTX y DTX, ejercen su actividad antitumoral principalmente mediante la estabilización de los microtúbulos, interfiriendo con su dinámica normal y generando un arresto mitótico prolongado que puede culminar en muerte celular programada o en procesos adaptativos según el contexto celular (Sousa-Pimenta et al., 2023). Sin embargo, la magnitud y naturaleza de esta respuesta dependen tanto del contexto celular intrínseco como del microambiente en el que las células se encuentran organizadas.

Los análisis funcionales evidenciaron diferencias en sensibilidad entre modelos 2D y 3D, así como entre las líneas MDA-MB-231 y MCF7. La evaluación transcripcional mediante RT-qPCR permitió determinar si estas variaciones observadas se acompañaban de cambios coordinados en genes asociados al control del ciclo celular (p21), apoptosis mitocondrial (BAX) y dinámica microtubular (TUBB3), todos ellos descritos como mediadores clave de la respuesta a agentes antimetabólicos.

Además de las diferencias intrínsecas entre subtipos celulares, la arquitectura tridimensional introduce variables como interacciones célula-célula y gradientes fisiológicos que pueden modificar la respuesta transcripcional y farmacológica respecto a cultivos 2D (Marconi et al., 2025). En conjunto, la integración de los resultados

funcionales y moleculares sugiere que la respuesta a PTX y DTX está condicionada por la interacción entre subtipo celular y organización estructural del cultivo.

### **5.6.1 REGULACIÓN DE P21 EN LA RESPUESTA A TAXANOS**

En el contexto de la resistencia farmacológica, la regulación negativa o positiva de genes supresores del ciclo celular, como p21 (CDKN1A), ha sido asociada con respuestas celulares adaptativas frente al estrés inducido por taxanos. p21 actúa como inhibidor de quinasas dependientes de ciclina y participa en el arresto del ciclo celular, particularmente en los puntos de control G1/S y G2/M, modulando la progresión proliferativa tras daño celular o estrés mitótico (Ticli et al., 2022). Algunos estudios sugieren que cambios en la expresión de inhibidores de CDK pueden contribuir a diferencias en sensibilidad entre subtipos celulares y condiciones de cultivo, especialmente en modelos de cáncer de mama expuestos a agentes antimitóticos (Álvarez-Fernández & Malumbres, 2020).

Nuestros resultados muestran que, aunque p21 se reprime en MDA-MB-231 bajo PTX en 2D, en 3D se observa un perfil más dinámico, indicando que la tridimensionalidad de los esferoides modifica la regulación del ciclo celular. Este comportamiento es consistente con reportes donde el microambiente tridimensional altera respuestas proliferativas y mecanismos de detención del ciclo, debido a cambios en señalización célula-célula y gradientes de estrés fisiológico que impactan la regulación transcripcional (Edmondson et al., 2014). En conjunto, estos hallazgos muestran que la arquitectura del cultivo influye en la activación de programas de control del ciclo inducidos por taxanos.

### **5.6.2 REGULACIÓN DE BAX Y ACTIVACIÓN APOPTÓTICA INDUCIDA POR TAXANOS**

En el contexto de la respuesta a taxanos, la regulación de genes proapoptóticos como BAX constituye un componente central en la ejecución de la vía intrínseca de apoptosis. Los taxanos inducen estabilización persistente de microtúbulos y arresto mitótico prolongado, lo que puede desencadenar señalización mitocondrial dependiente de proteínas de la familia BCL-2, incluyendo la activación de BAX. Esta proteína promueve la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de citocromo c, facilitando la activación de caspasas efectoras y la progresión hacia muerte celular programada (Xu et al., 2024). Alteraciones en su expresión han sido asociadas tanto con

sensibilidad como con tolerancia a quimioterapia en cáncer de mama, dependiendo del equilibrio entre señales pro- y antiapoptóticas (Mohammad et al., 2015).

En el presente estudio, la modulación de BAX evidenció diferencias dependientes tanto del subtipo celular como de la arquitectura del cultivo. La inducción más consistente en condiciones 2D, particularmente en MDA-MB-231 bajo tratamiento con taxanos, se alinea con la mayor sensibilidad citotóxica previamente observada en este modelo, sugiriendo una activación más marcada de la vía apoptótica mitocondrial en monocapa (Tudor et al., 2000; Xu et al., 2024). En contraste, la regulación atenuada o transitoria en los esferoides 3D respalda la idea de que el microambiente tridimensional modula la intensidad de la señal apoptótica, posiblemente mediante mecanismos de adaptación celular asociados a interacciones célula-célula y a gradientes fisiológicos que impactan la señalización mitocondrial (Imamura et al., 2015). Este comportamiento ha sido descrito en modelos tridimensionales de cáncer de mama, donde la arquitectura 3D se asocia con menor activación sostenida de genes proapoptóticos y con perfiles de mayor tolerancia farmacológica (Mahmoud et al., 2025). En conjunto, la regulación observada de BAX refuerza la influencia del contexto estructural en la determinación de la susceptibilidad apoptótica frente a taxanos.

### **5.6.3 ALTERACIONES DE TUBB3 Y RESISTENCIA A TAXANOS**

La expresión de  $\beta$ -tubulina clase III (TUBB3) ha sido consistentemente asociada con variaciones en la sensibilidad a taxanos, debido a su papel en la regulación de la dinámica microtubular. Dado que PTX y DTX ejercen su acción estabilizando los microtúbulos e interfiriendo con el ensamblaje del huso mitótico, cambios en la composición de isoformas de tubulina pueden modificar la interacción fármaco-blanco y afectar la eficiencia del bloqueo mitótico (Stengel et al., 2009). En cáncer de mama, la sobreexpresión de TUBB3 ha sido vinculada con fenotipos de menor respuesta terapéutica y con mecanismos de adaptación adquirida tras exposición a agentes antimitóticos (Lebok et al., 2016; Scherbakov et al., 2023).

La regulación diferencial observada entre modelos 2D y 3D sugiere que la arquitectura del cultivo influye en la activación de programas asociados a plasticidad estructural. El incremento predominante de TUBB3 en monocapa, en contraste con su disminución sostenida en esferoides tridimensionales, refleja una modulación dependiente del

microambiente en la expresión de genes vinculados a la dinámica del citoesqueleto y a procesos de adaptación farmacológica (Muguruma et al., 2022). Se ha descrito que los modelos tridimensionales presentan perfiles transcripcionales distintos a los de cultivos 2D, reflejando una organización celular más compleja que impacta la respuesta a quimioterapia (Cognoux et al., 2025). En este contexto, la modulación de TUBB3 observada sugiere que la organización espacial del modelo experimental condiciona la respuesta molecular frente a taxanos, particularmente en relación con mecanismos asociados a resistencia.

En conjunto, la regulación diferencial de p21, BAX y TUBB3 evidencia que la respuesta a taxanos no depende exclusivamente del mecanismo primario de estabilización microtubular, sino de la integración entre control del ciclo celular, activación apoptótica y plasticidad estructural, moduladas tanto por el subtipo tumoral como por la arquitectura del cultivo.

# **CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 6.1 CONCLUSIÓN

El presente estudio permitió evaluar de manera integral la formación de esferoides tridimensionales y la respuesta diferencial a PTX y DTX en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, en comparación con sus respectivos cultivos 2D. En concordancia con los objetivos planteados, se logró caracterizar la morfología y el grado de compactación de los esferoides, y analizar su variación entre los modelos 2D y 3D, así como describir la dinámica proliferativa bajo condiciones

Los resultados evidenciaron que las esferas derivadas de MCF-7 presentaron mayor compactación, mientras que las de MDA-MB-231 mostraron una organización más laxa, confirmando diferencias asociadas a su fenotipo celular. Asimismo, la evaluación farmacológica demostró que los taxanos redujeron de manera significativa la viabilidad celular en ambos modelos, con variaciones notables en magnitud y temporalidad según la línea celular y el fármaco empleado. En particular, DTX produjo una inhibición más temprana y sostenida en MDA-MB-231, mientras que PTX permitió una fase proliferativa inicial antes del descenso progresivo en ambas líneas. Estos patrones se reflejaron tanto en los ensayos de viabilidad como en el análisis transcripcional, donde genes asociados a apoptosis, control del ciclo celular y estabilidad de microtúbulos mostraron perfiles concordantes con las respuestas funcionales observadas.

En relación con la hipótesis planteada, los resultados la respaldan parcialmente. Se confirmó que MDA-MB-231 generó esferoides menos compactos; sin embargo, su respuesta a taxanos no evidenció una mayor resistencia en comparación con MCF-7, particularmente bajo tratamiento con docetaxel, donde incluso mostró una reducción temprana y pronunciada de la viabilidad. Asimismo, el modelo tridimensional presentó valores de  $IC_{50}$  superiores al sistema 2D, en concordancia con una menor susceptibilidad relativa atribuible a una posible menor penetración farmacológica y mayor complejidad microambiental. No obstante, esta tendencia no se manifestó de forma uniforme entre líneas celulares y fármacos, lo que sugiere que la arquitectura tridimensional modula la respuesta, pero interactúa con factores biológicos propios de cada subtipo tumoral.

En conjunto, este trabajo aporta evidencia experimental que refuerza la relevancia de integrar modelos tridimensionales en la evaluación preclínica de agentes antineoplásicos, dado que permiten identificar variaciones en sensibilidad farmacológica y en regulación

molecular que no se manifiestan completamente en sistemas bidimensionales. Asimismo, establecen una base sólida para la exploración de mecanismos asociados a sensibilidad o tolerancia a taxanos, abriendo la posibilidad de diseñar estrategias terapéuticas más acordes con la biología específica de cada subtipo tumoral.

En conclusión, la comparación entre cultivos bidimensionales y esferoides tridimensionales derivados de MDA-MB-231 y MCF-7 demuestra que la proliferación y la respuesta a PTX y DTX no dependen únicamente del fármaco administrado, sino también del subtipo celular y del sistema experimental empleado. La organización tridimensional modula tanto la sensibilidad farmacológica como los patrones moleculares asociados, subrayando la relevancia de incorporar modelos 3D en estudios preclínicos orientados a evaluar la eficacia de taxanos en cáncer de mama.

## 6.2 LIMITACIONES

Aunque los resultados obtenidos aportan información relevante sobre la respuesta de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 frente a PTX y DTX en modelos 2D y 3D, es importante reconocer las limitaciones metodológicas y experimentales que pudieron influir en el alcance e interpretación de los hallazgos. Estas limitaciones no invalidan los resultados, pero sí establecen el marco en el que deben ser analizados y ofrecen puntos de referencia para estudios futuros. A continuación, se listan las limitaciones del estudio en cuanto a:

- **Uso exclusivo de dos líneas celulares:** El estudio se basó únicamente en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, lo que limita la extrapolación de los resultados a otros subtipos de cáncer de mama. Cada línea presenta características moleculares particulares, por lo que la respuesta observada puede no representar la heterogeneidad tumoral real.
- **Variabilidad del modelo tridimensional:** Aunque el sistema 3D ofrece un entorno más representativo del microambiente tumoral, la formación de esferas presenta variabilidad en tamaño, compactación y estabilidad, lo que puede influir en la difusión de los taxanos y en la magnitud de la respuesta observada.

- **Sensibilidad del cultivo prolongado en 3D:** Manipulaciones mínimas, diferencias en densidad celular o variaciones en el recambio de medio pueden afectar la reproducibilidad del modelo, dado que los esferoides son altamente sensibles a las condiciones físicas y técnicas de cultivo.
- **Conteo celular manual:** La evaluación de proliferación mediante conteo manual introduce variabilidad inter-observador y depende de la distribución celular en cada pocillo.
- **Análisis molecular limitado:** La caracterización se centró exclusivamente en expresión génica mediante qPCR dirigida a genes específicos, sin evaluación proteica ni análisis transcriptómico global, lo que restringe la profundidad del estudio de vías de resistencia asociadas a PTX y DTX.
- **Limitaciones inherentes a los modelos *in vitro*:** Las condiciones de cultivo carecen de componentes fundamentales del microambiente tumoral, como señales inmunológicas, interacciones célula-matriz complejas y gradientes fisiológicos, lo que limita la interpretación de los resultados en relación con tejidos reales.

### 6.3 RECOMENDACIONES

1. **Ampliar el número de líneas celulares utilizadas**, incorporando otros subtipos de cáncer de mama para obtener un panorama más representativo de la heterogeneidad tumoral y fortalecer la extrapolación de los hallazgos.
2. **Optimizar la estandarización del modelo tridimensional**, incluyendo mediciones de tamaño, compactación y viabilidad interna de los esferoides, con el fin de reducir variabilidad experimental y mejorar la reproducibilidad de los ensayos.
3. **Incorporar análisis funcionales adicionales**, como ensayos de apoptosis, ciclo celular, migración o actividad de bombas de eflujo, que permitan validar de manera más completa los mecanismos asociados a la respuesta diferencial frente a los taxanos.
4. **Complementar la caracterización molecular con técnicas a nivel proteico**, tales como Western blot o inmunofluorescencia, para confirmar si los cambios

observados en la expresión génica se traducen en efectos funcionales sobre proteínas clave relacionadas con la resistencia.

- 5. Explorar aproximaciones transcriptómicas de mayor alcance**, como RNA-Seq, que permitan identificar de manera global las rutas biológicas implicadas en la adaptación a PTX y DTX en ambos modelos de cultivo.
- 6. Integrar componentes del microambiente tumoral**, incluyendo cocultivos con fibroblastos, matriz extracelular o condiciones de hipoxia controlada, con el objetivo de aproximar aún más el modelo tridimensional a la fisiología tumoral real.
- 7. Evaluar dinámicas espacio-temporales en modelos 3D mediante técnicas de imagen avanzadas**, microscopía confocal, análisis de viabilidad por marcadores fluorescentes y reconstrucción volumétrica permitirían examinar gradientes de proliferación, hipoxia y muerte celular dentro de las esferas.
- 8. Explorar estrategias combinadas de tratamiento en los modelos 2D y 3D**, el uso de inhibidores de vías específicas (PI3K/AKT, MAPK/ERK, JAK/STAT, entre otras) o moléculas moduladoras de citoesqueleto podría revelar sinergias o mecanismos alternativos de sensibilización a taxanos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alalawy, A. I. (2024). *Key genes and molecular mechanisms related to paclitaxel resistance*. *Cancer Cell International*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03415-0>

Altogen Labs. (2018, 10 de diciembre). *PDX xenograft models: Lung, pancreatic, prostate, colorectal, and breast cancer*. <https://altogenlabs.com/xenograft-models/pdx-xenograft-models-lung-pactreatic-prostate-colorectal-and-breast-cancer/>

Álvarez-Fernández, M., & Malumbres, M. (2020). Mechanisms of Sensitivity and Resistance to CDK4/6 Inhibition. *Cancer Cell*, 37(4), 514-529. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.010>

Amaro, A., Angelini, G., Mirisola, V., Esposito, A. I., Reverberi, D., Matis, S., Maffei, M., Giaretti, W., Viale, M., Gangemi, R., Emionite, L., Astigiano, S., Cilli, M., Bachmeier, B. E., Killian, P. H., Albini, A., & Pfeffer, U. (2016). *A highly invasive subpopulation of MDA-MB-231 breast cancer cells shows accelerated growth, differential chemoresistance, features of apocrine tumors and reduced tumorigenicity in vivo*. *Oncotarget*, 7(42), 68803–68820. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11931>

American Cancer Society. (2024). *Breast cancer facts & figures 2024–2025*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org>

Antoni, D., Burckel, H, Josset, E, & Noel, G. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal Of Molecular Sciences*, 16(3), 5517-5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>

Baliu-Piqué, M., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2020). *Breast cancer heterogeneity and response to novel therapeutics*. *Cancers*, 12(11), 3271. <https://doi.org/10.3390/cancers12113271>

Bashi, M., Madanchi, H., & Yousefi, B. (2024). *Investigation of cytotoxic effect and action mechanism of a synthetic peptide derivative of rabbit cathelicidin against MDA-MB-231 breast cancer cell line*. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64400-1>

Bianchini, G., De Angelis, C., Licata, L., & Gianni, L. (2022). Treatment landscape of triple-negative breast cancer—expanded options, evolving needs. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19, 91–113. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00565-2>

Biology Insights. (2025). MCF-7 cell line: A profile in breast cancer research. <https://biologyinsights.com/mcf-7-cell-line-a-profile-in-breast-cancer-research/>

Blaszczak, E., Miziak, P., Odrzywolski, A., Baran, M., Gumbarewicz, E., & Stepulak, A. (2025). *Progresión del cáncer de mama triple negativo y farmacorresistencia en el contexto de la transición epitelial-mesenquimal*. <https://doi.org/10.3390/cancers17020228>

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

Breslin, S., & O’Driscoll, L. (2016). The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*, 7(29), 45745–45756. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9935>

Burgués Gasión, J. P., Pontones Moreno, J. L., Vera Donoso, C. D., Jiménez Cruz, J. F., & Ozonas Moragues, M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*, 29(9), 846–859. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0210-48062005000900007](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062005000900007)

Candanedo-Gonzalez, F., Ramirez-Castellanos, A. L., Salazar-Gomez, U., Valenzuela-Gonzalez, W., Chavira-Macias, C., & Gamboa-Dominguez, A. (2025). *Breast cancer heterogeneity and its implication in precision therapy*. En IntechOpen eBooks. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1007503>

Cha, Y. S., Michaels, A., Wang, J. Z., et al. (2025). Recent advances in 3D cell culture models in cancer drug development. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 55, 557–573. <https://doi.org/10.1007/s40005-025-00740-y>

Comşa, Ş., & Şerban, M. A. (2015). *La historia de la línea celular de cáncer de mama MCF-7: 40 años de experiencia en investigación*. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154. <https://ar.iijournals.org/content/35/6/3147.full-text.pdf>

Correia, A.L., & Bissell, M. J. (2012). The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resistance Updates*, 15(1-2), 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.006>

Cougnoux, A., Mahmoud, L., Johnsson, P. A., Eroglu, A., Gsell, L., Rosenbauer, J., Sandberg, R., & Hausser, J. (2025). Diffusion Smart-seq3 of breast cancer spheroids to explore spatial tumor biology and test evolutionary principles of tumor heterogeneity. *Scientific Reports*, 15(1), 3811. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-83989-x>

Crown, J. (2001). Docetaxel: Overview of an Active Drug for Breast Cancer. *The Oncologist*, 6(S3), 1-4. [https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-suppl\\_3-1](https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-suppl_3-1)

Culture Collections. (2022). MDA-MB-231 (ECACC cell line profile). <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/mda-mb-231/>

Cytion. (2025). MCF-7 cells (human breast cancer cell line). <https://www.cytion.com/es/Celulas-MCF-7/300273>

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>

Farhadi, P., Yarani, R., Valipour, E., Kiani, S., Hoseinkhani, Z., & Mansouri, K. (2021). *Investigación del cáncer de mama dirigida por líneas celulares basada en el estado del metabolismo de la glucosa*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112526. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112526>

Flodrova, D., Toporova, L., Macejova, D., Lastovickova, M., Brtko, J., & Bobalova, J. (2016). *A comparative study of protein patterns of human estrogen receptor positive*

(MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. *General Physiology and Biophysics*, 35(3), 387–392. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2016009](https://doi.org/10.4149/gpb_2016009)

Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. (2008). Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell*, 14(2), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.002>

Godet, I., Doctorman, S., Wu, F., & Gilkes, D. M. (2022). *Detection of hypoxia in cancer models: Significance, challenges, and advances*. *Cells*, 11(4), 686. <https://doi.org/10.3390/cells11040686>

Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Annals of Oncology*, 24(9), 2206–2223. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>

Gomes, A., Guillaume, L., Grimes, D. R., Fehrenbach, J., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2016). *Oxygen partial pressure is a rate-limiting parameter for cell proliferation in 3D spheroids grown in physioxic culture condition*. *PLoS ONE*, 11(8), e0161239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161239>

Guan, X., & Huang, S. (2022). Advances in the application of 3D tumor models in precision oncology and drug screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1021966. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1021966>

Guo, T.-Q., Xiao, Y.-L., & Shao, Z.-M. (2023). Delineating intra-tumoral heterogeneity and tumor evolution in breast cancer. *Frontiers in Genetics*, 14, 1087432. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1087432>

Ham, S. L., Joshi, R., Luker, G. D., & Tavana, H. (2016). *Engineered breast cancer cell spheroids reproduce biologic properties of solid tumors*. *Advanced Healthcare Materials*, 5(21), 2788–2798. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600644>

Hanker, A. B., Kaklamani, V., & Arteaga, C. L. (2013). PI3K pathway inhibition: Resistance mechanisms and combination strategies in cancer therapy. *Cancer Discovery*, 3(4), 388–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0329>

Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., & Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal Of Biotechnology*, 148(1), 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>

Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>

Huang, Z., Yu, P., & Tang, J. (2020). *Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model*. *OncoTargets and Therapy*, 13, 5395–5405. <https://doi.org/10.2147/ott.s249756>

Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., & Nakatsura, T. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*, 33(4), 1837–1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>

International Agency for Research on Cancer. (2025). Breast cancer cases and deaths are projected to rise globally. <https://www.iarc.who.int/news-events/breast-cancer-cases-and-deaths-are-projected-to-rise-globally/>

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2016). *2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures*. *Archives of Medical Science*. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

Katsura, C., Ogunmwonyi, I., Kankam, H. K., & Saha, S. (2022). *Breast cancer: Presentation, investigation and management*. *British Journal of Hospital Medicine*, 83(2), 1–7. <https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0459>

Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 194–204. <https://doi.org/10.1038/nrc2803>

Kleensang, A., Vantangoli, M. M., Odwin-DaCosta, S., Andersen, M. E., Boekelheide, K., Bouhifd, M., Fornace, A. J., Jr., Li, H.-H., Livi, C. B., Madnick, S., Maertens, A., Rosenberg, M., Yager, J. D., Zhao, L., & Hartung, T. (2016). Genetic variability in a frozen batch of MCF-7 cells invisible in routine authentication affecting cell function. *Scientific Reports*, 6, 28994. <https://doi.org/10.1038/srep28994>

Lebok, P., Öztürk, M., Heilenkötter, U., Jaenicke, F., Müller, V., Paluchowski, P., Geist, S., Wilke, C., Burandt, E., Lebeau, A., Wilczak, W., Krech, T., Simon, R., Sauter, G., & Quaas, A. (2016). High levels of class III  $\beta$ -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. *Oncology Letters*, 11(3), 1987-1994. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4206>

Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal Of Clinical Investigation*, 121(7), 2750-2767. <https://doi.org/10.1172/jci45014>

Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2015). Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(5), 951–959. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1950-1>

Lv, M., Li, B., Zhang, Y., & Wang, X. (2024). Cell morphology best predicts tumorigenicity and metastasis in vivo across multiple TNBC cell lines of different metastatic potential. *Breast Cancer Research*, 26, 96. <https://doi.org/10.1186/s13058-024-01796-8>

Mahmoud, K., Youssef, E. M., Sroor, F. M., & Fayad, W. (2025). Assessment of cytotoxicity of some synthetic compounds against breast carcinoma spheroids with subsequent analysis of pro-apoptotic and gene expression. *Scientific Reports*, 15(1), 42543. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-26942-w>

Marconi, G. D., Mazzone, A., Della Rocca, Y., Trubiani, O., Pizzicannella, J., & Diomede, F. (2025). Three-dimensional culture system: A new frontier in cancer research, drug discovery, and stem cell-based therapy. *Biology*, 14(7), 875. <https://doi.org/10.3390/biology14070875>

Martínez-Pacheco, S., & O'Driscoll, L. (2021). *Modelos preclínicos in vitro utilizados en la investigación del cáncer: Resultados de una encuesta mundial*. *Cancers*, 13(7), 1102. <https://doi.org/10.3390/cancers13071102>

Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H., Lin, L., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M., Honoki, K., . . . Azmi, A. S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars In Cancer Biology*, 35, S78-S103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>

Muguruma, M., Asaoka, M., Teraoka, S., Miyahara, K., Kawate, T., & Ishikawa, T. (2022).  $\beta$ -Tubulin Isoforms Related to Docetaxel Sensitivity in 2D and 3D Cultured TNBC Cell Lines. *Anticancer Research*, 42(10), 4735-4742. <https://doi.org/10.21873/anticancer.15978>

National Cancer Institute. (2023). Breast cancer treatment (PDQ®)—Patient version. <https://www.cancer.gov>

Nayak, P., Bentivoglio, V., Varani, M., & Signore, A. (2023). *Three-dimensional in vitro tumor spheroid models for evaluation of anticancer therapy: Recent updates*. *Cancers*, 15(19), 4846. <https://doi.org/10.3390/cancers15194846>

Nikdouz, A., & Orso, F. (2023). *Emerging roles of 3D-culture systems in tackling tumor drug resistance*. *Cancer Drug Resistance*, 6(4), 788–804. <https://doi.org/10.20517/cdr.2023.93>

O'Shaughnessy, J. (2005). Extending Survival with Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist*, 10(S3), 20-29. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.10-90003-20>

Organización Panamericana de la Salud. (2025). Cáncer de mama en las Américas. <https://www.paho.org/en/topics/breast-cancer>

Pedroza, D. A., Gao, Y., Zhang, X. H.-F., & Rosen, J. M. (2024). Leveraging preclinical models of metastatic breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, 1879(5), 189163. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189163>

Scherbakov, A. M., Basharina, A. A., Sorokin, D. V., Mikhaevich, E. I., Mizaeva, I. E., Mikhaylova, A. L., Bogush, T. A., & Krasil'nikov, M. A. (2023). Targeting hormone-resistant breast cancer cells with docetaxel: a look inside the resistance. *Cancer Drug Resistance*, 6(1), 103-115. <https://doi.org/10.20517/cdr.2022.96>

Sharifi-Rad, J., et al. (2021). *Paclitaxel: Application in modern oncology and nanomedicine-based cancer therapy*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3687700>

Sousa-Pimenta, M., et al. (2023). *Chemotherapeutic properties and side-effects associated with paclitaxel, docetaxel, and cabazitaxel*. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1157306>

Stengel, C., Newman, S. P., Leese, M. P., Potter, B. V. L., Reed, M. J., & Purohit, A. (2009). Class III  $\beta$ -tubulin expression and *in vitro* resistance to microtubule targeting agents. *British Journal Of Cancer*, 102(2), 316-324. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605489>

Swanton, C., Nicke, B., Schuett, M., Eklund, A. C., Ng, C., Li, Q., Hardcastle, T., Lee, A., Roy, R., East, P., Kschischo, M., Endesfelder, D., Wylie, P., Kim, S. N., Chen, J., Howell, M., Ried, T., Habermann, J. K., Auer, G., . . . Downward, J. (2009). Chromosomal instability determines taxane response. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 106(21), 8671-8676. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811835106>

Tellez-Gabriel, M., Ory, B., Lamoureux, F., Heymann, M. F., & Heymann, D. (2016). Tumour heterogeneity: The key advantages of single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2142. <https://doi.org/10.3390/ijms17122142>

Theodossiou, T. A., et al. (2019). *Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT–tamoxifen hybrid therapy*. *NPJ Breast Cancer*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0108-8>

Ticli, G., Cazzalini, O., Stivala, L. A., & Prosperi, E. (2022). Revisiting the function of p21 (CDKN1A) in DNA repair: The influence of protein interactions and stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7058. <https://doi.org/10.3390/ijms23137058>

Tidwell, T. R., et al. (2022). *Metabolic flux analysis of 3D spheroids reveals significant differences from 2D cultures*. *Cancer & Metabolism*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40170-022-00285-w>

Tuasha, N., & Petros, B. (2020). *Heterogeneity of tumors in breast cancer*. *Scientifica*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4736091>

Tudor, G., Aguilera, A., Halverson, D. O., Laing, N. D., & Sausville, E. A. (2000). Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. *Cell Death And Differentiation*, 7(6), 574-586. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400688>

Vaidyanathan, A., Sawers, L., Gannon, et al. (2016). ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *British Journal of Cancer*, 115(4), 431–441. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.203>

Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(6), 385-392. <https://doi.org/10.1038/nrm3115>

Wang, B., Hu, S., Teng, Y., et al. (2024). Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9, 200. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01889-y>

Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology Of The Cell*, 25(18), 2677-2681. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>

Weigelt, B., Ghajar, C. M., & Bissell, M. J. (2014). The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69-70, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.01.001>

Wilkinson, L., & Gathani, T. (2021). *Understanding breast cancer as a global health concern*. *British Journal of Radiology*, 95(1130). <https://doi.org/10.1259/bjr.20211033>

World Health Organization. (2025). *Breast cancer*. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/breast-cancer>

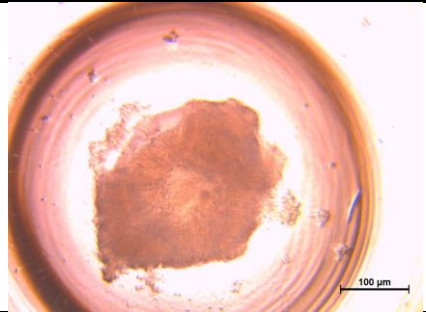

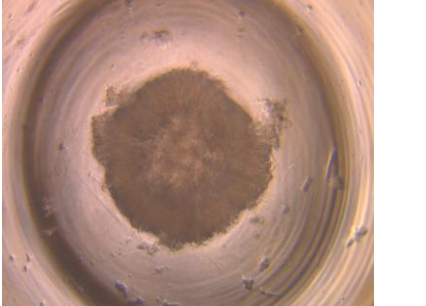

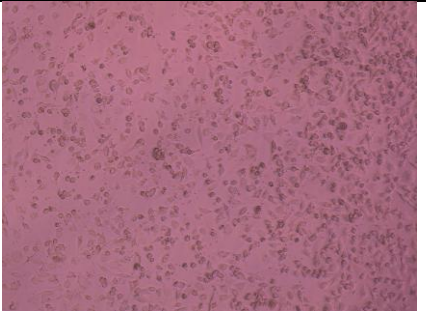
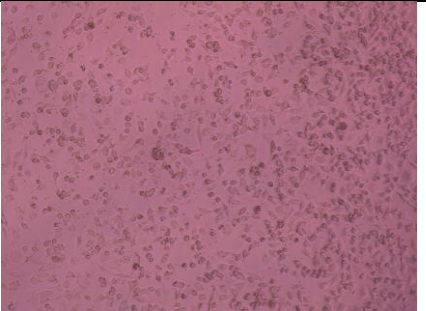
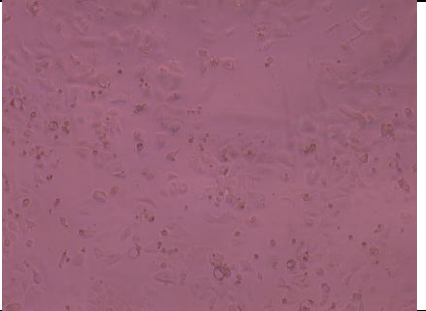
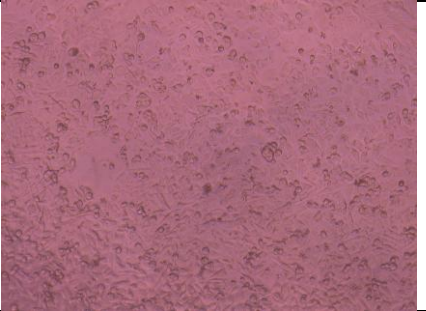
Xu, A. P., Xu, L. B., Smith, E. R., Fleishman, J. S., Chen, Z. C., & Xu, X. X. (2024). Cell death in cancer chemotherapy using taxanes. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1338633. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1338633>

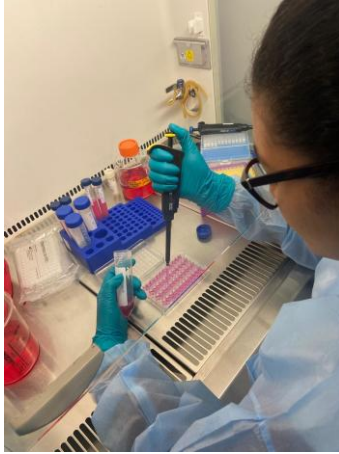
Zhang, A., Miao, K., Sun, H., & Deng, C.-X. (2022). Tumor heterogeneity reshapes the tumor microenvironment to influence drug resistance. *International Journal of Biological Sciences*, 18(7), 3019–3033. <https://doi.org/10.7150/ijbs.72534>

Zhang, X., Cheng, T., Cho, E., et al. (2024). Nutritionally physiological cell culture medium and 3D culture influence breast tumour proteomics and anti-cancer drug effectiveness. *Pharmacological Research*, 210, 107519. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107519>

# **CAPÍTULO VII: ANEXOS**

**Tabla 2. Comparación entre cultivos celulares 3D y 2D**

TIEMPO DE SEMBRADO	3D MCF-7	3D MDA-MB-231
DÍA 2		
DÍA 3		
TIEMPO DE SEMBRADO	2D MCF-7	2D MDA-MB-231
DÍA 2		
DÍA 3		



*Figura 1. Siembra celular para el ensayo MTT*



*Figura 2. Extracción de ARN*



*Figura 3 y 4. Uso del Nanodrop para cuantificación de ARN*