

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



**“Evaluación de estrategias de tratamiento basada en la estructura
de la cumarina para células de cáncer de mama.”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

P R E S E N T A

Alondra Elizabeth Campos Valenzuela

Mexicali, Baja California

Noviembre 24 del 2024

Carta de Dictamen de la Evaluación Escrita del Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA DE DICTAMEN DE LA EVALUACION DE LA FASE ESCRITA DEL TRABAJO TERMINAL

Mexicali, B.C., a 08 de noviembre del 2024.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del trabajo terminal titulado "Evaluación de estrategias de tratamiento basada en la estructura de la cumarina para células de cáncer de mama", que, para obtener el Diploma de **Grado en Maestría en Ciencias en Biomedicina**, presenta la C. Alondra Elizabeth Campos Valenzuela, una vez concluida la evaluación correspondiente, hemos resuelto **aprobado**.

Dr. Victor Guadalupe Garcia González

Presidente

Dr. Ángel Armando Pulido Capiz

Sinodal

Dr. Raúl Díaz Molina

Sinodal

Dr. Ignacio Rivero Espejel

Sinodal

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento, primero y ante todo, a todas esas mujeres pioneras en el campo de la ciencia. Su perseverancia y dedicación han allanado el camino para el reconocimiento de su labor y las oportunidades que hoy disfrutamos las generaciones actuales. Agradezco también a la Universidad Autónoma del Estado de Baja California (UABC), que no solo me permitió completar mi posgrado, sino también mi licenciatura. Gracias por los recursos proporcionados a lo largo de estos años y por brindarme un espacio para expresar mis opiniones.

Quisiera extender mi más sincero reconocimiento al Dr. Raúl Díaz Molina y al Dr. Ignacio Rivero, mis sinodales, por sus valiosos consejos y enseñanzas durante mi maestría. Su dedicación y contribución han sido fundamentales tanto para mi crecimiento académico como personal. Igualmente, agradezco enormemente a mi director de tesis, el Dr. Víctor Guadalupe García González, por su invaluable apoyo y por ser una persona excepcional a lo largo de estos dos años. Un agradecimiento especial al Dr. Ángel Pulido Capiz por brindarme las técnicas necesarias para el desarrollo de mi proyecto. No puedo dejar de mencionar al maravilloso equipo del laboratorio de bioquímica, con quienes he formado una gran amistad. Agradezco el apoyo tanto académico como personal que he recibido de ellos, así como los invaluable aprendizajes y consejos compartidos durante estos dos años.

Mi gratitud también se extiende a mi familia y a Dios, quienes son mis pilares fundamentales. A mi madre y padre, por su constante apoyo y sabios consejos que me han ayudado a convertirme en la persona que soy hoy en día. A mis abuelos, cuyos comentarios siempre inspiradores me motivan a levantarme cada día y seguir construyendo el futuro que deseo. Un agradecimiento especial a mi tío Ernesto Cañez Ruiz, quien, desde otro plano, continúa apoyándome, y cuya presencia fue un gran respaldo en mi educación. Por último, pero no menos importante, agradezco a mi grupo de amigos, quienes han estado a mi lado en todo momento, brindándome su apoyo tanto en lo académico como en lo personal.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento por su inestimable contribución a mi camino académico y personal. Sin su apoyo, nada de esto habría sido posible. Que este reconocimiento sirva como un testimonio de mi profunda gratitud y como un recordatorio de que sus contribuciones nunca serán olvidadas.

Abreviaturas

Aura: Aurapteno.

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50.

Cuma: Cumarina.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

ERE: Elementos de respuesta a estrógenos.

E1: Estrona.

E2: 17- β -estradiol.

E3: Estriol.

Fulv: Fulvestrant.

HER2+: Positivo al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico.

LBD: Dominio de unión a ligando.

MME: Membrana mitocondrial externa.

PBS: Phosphate-Buffered Saline (Solución salina tamponada con fosfato)

PC: Fosfatidil colina.

PE: Fosfatidil etanolamina

RE α : Receptor de estrógeno α .

SERD: Degradador selectivo del receptor de estrógeno.

SFB: Suero Fetal Bovino.

TNBC: Triple negativo de cancer de mama.

WB: Western Blot.

2-H: 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído.

4-M: 4-metilumbeliferona.

Contenido	Página
Agradecimientos	03
Abreviaturas	05
Índice de Tablas	08
Índice de Figuras	08
Resumen	10
1. Introducción	11
2. Marco Teórico	12
2.1. Cáncer de mama	12
2.2. Subtipos de cáncer de mama	15
2.3. Los receptores de estrógeno y el estradiol	17
2.4. Tratamientos del cáncer de mama RE+	19
3. Antecedentes	22
3.1. Epidemiología del cáncer de mama	22
3.2. Generación de variantes celulares resistentes	22
3.3. Cumarinas	23
3.4. Uso de nanoliposomas como estrategia de tratamiento	27
4. Planteamiento del Problema	29
5. Justificación	29
6. Hipótesis y Objetivos	30
6.1. Hipótesis	30
6.2. Hipótesis nula	30
6.3. Hipótesis alterna	30
6.4. Objetivo general	30
6.5. Objetivos específicos	31
7. Materiales y Métodos	31
7.1. Cultivo de células MCF-7 (RE+)	32
7.2. Ensayo de MTT	32
7.3. Microscopia óptica	33
7.4. Ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio	34

7.5 Ensayo de formación de colonias	36
7.6. Western Blot	37
7.7. Docking molecular	37
7.8. Inmunoprecipitación	38
7.9. Preparación de nanoliposomas	40
7.10. Preparación de nanoliposomas con aurapteno	41
7.11. Caracterización de nanoliposomas	41
7.12. Análisis estadísticos	43
7.13. Aspectos éticos y de bioseguridad	43
8. Resultados	44
9. Discusión	65
10. Conclusiones	73
11. Logros alcanzados	74
12. Fuentes de financiamiento	79
13. Bibliografía	79
Anexos	89
Anexo A. Participación en patente.	
Anexo B. Coautora en artículo de investigación de revista arbitrada.	

Índice de Tablas	Página
01. Concentraciones inhibitorias 50 de las moléculas y su estructura química.	44
02. Afinidad e interacciones de las moléculas con el cristal 1A52.	57

Índice de Figuras	Página
01. Marcadores de cáncer.	14
02. Subtipos de cáncer de mama.	16
03. Estructura de los Reα.	18
04. Grafica de dosis de metabolitos derivados del tamoxifeno vs viabilidad celular.	23
05. Estructuras químicas de derivados de la cumarina.	25
06. Estructura de los nanoliposomas.	28
07. Morfología de las células MCF-7.	32
08. Esquema ilustrativo de la función del ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio.	35
09. Esquema ilustrativo de los cuadrantes en el ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio.	36
10. Metodología para la realización de nanoliposomas.	43
11. Efecto del tratamiento de las moléculas sobre la viabilidad celular en células MCF-7.	45
12. Morfología celular mediante los diferentes tratamientos en microscopio.	47
13. Grafica obtenida mediante el ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio.	49
14. Ensayo de formación de colonias.	50
15. Determinación de la expresión de proteínas anti-apoptóticas.	51

16. Determinación de la expresión de proteínas pro- apoptóticas.	53
17. Docking del cristal 1A 52 obtenido de Protein Data Bank vs Moléculas derivadas de la cumarina.	55
18. Determinación de la expresión de proteínas blancos por técnica de Western blot referente a Rex.	60
19. Determinación de la inmunoprecipitación para la detección de Hsp90 en muestras tratadas con aurapteno.	61
20. Determinación del tamaño de los nanoliposomas a concentraciones PC 70% - PE 30% y PC 30% - PE70%.	62
21. Caracterización estructural de los nanoliposomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).	63
22. Efecto de los nanoliposomas cargados en la viabilidad celular.	64
23. Resumen gráfico de los resultados obtenidos con aurapteno.	73

Resumen

El cáncer de mama es el segundo diagnóstico de cáncer más frecuente a nivel mundial y la quinta causa de muerte por patologías neoplásicas. Esta enfermedad se caracteriza por la heterogeneidad en el crecimiento y la supervivencia de las células epiteliales mamarias, clasificándose según la presencia de receptores hormonales, como los receptores de estrógeno α (RE α +), así como en subtipos como luminal A, luminal B, HER2+ y triple negativo (TNBC). Datos recientes han demostrado que diversas cumarinas inhiben la proliferación celular, la migración y la angiogénesis en líneas celulares de cáncer de mama, sugiriendo su potencial como tratamientos complementarios. En nuestra investigación, se evaluó el efecto terapéutico de la cumarina y dos de sus derivados, 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído y 4-metilumbeliferona, así como aurapteno, en un modelo celular de cáncer de mama RE+ (MCF-7). Asimismo, se llevó a cabo un estudio de docking molecular para analizar la interacción entre aurapteno y el receptor de estrógeno. Los resultados del docking indicaron que aurapteno tiene una alta afinidad por el receptor, lo que sugiere que su acción terapéutica puede estar mediada a través de esta interacción. Se emplearon técnicas para evaluar la viabilidad celular y se analizó la expresión de proteínas implicadas en procesos de proliferación y apoptosis mediante Western Blot (WB). Además, se desarrollaron nanoliposomas para encapsular aurapteno, lo que permite una liberación controlada y una mayor biodisponibilidad del fármaco. Los resultados mostraron que aurapteno reduce significativamente la viabilidad celular y modula las proteínas relacionadas con la apoptosis. Estos hallazgos subrayan el potencial de aurapteno en el manejo del cáncer de mama, y sugieren que la formulación en nanoliposomas podría mejorar la eficacia del tratamiento al optimizar la entrega de la molécula. En conclusión, el prenilo en la estructura del aurapteno es crucial para su actividad terapéutica, ya que facilita su interacción con el receptor de estrógeno y potencia sus efectos en la inducción de apoptosis. Preservar esta característica estructural es fundamental para maximizar su eficacia en el tratamiento del cáncer de mama. No obstante, se

necesitan más investigaciones para validar estos hallazgos y determinar la seguridad a largo plazo de esta estrategia terapéutica.

1. Introducción.

El cáncer de mama es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que, a nivel global, uno de cada ocho casos de cáncer en mujeres corresponde a cáncer de mama, lo que lo convierte en el cáncer más común entre las mujeres. En términos de incidencia, en 2020 se registraron aproximadamente 2.3 millones de nuevos casos, y más de 680,000 muertes asociadas a esta enfermedad en todo el mundo (WHO, 2020). En México, el cáncer de mama también representa una de las principales causas de muerte en mujeres, con tasas de incidencia y mortalidad que han ido en aumento en las últimas décadas. Según datos del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), en México, en 2020 se diagnosticaron aproximadamente 28,000 nuevos casos, y alrededor de 7,000 mujeres fallecieron a causa de este cáncer.

El tratamiento del cáncer de mama ha avanzado significativamente en las últimas décadas, principalmente a través de intervenciones como la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y las terapias dirigidas. Sin embargo, a pesar de los avances, persisten diversas limitaciones en el tratamiento. Una de las principales dificultades radica en la heterogeneidad de los tumores, ya que las células tumorales presentan características genéticas, epigenéticas y metabólicas variables, lo que complica la respuesta a los tratamientos convencionales. Además, el fenómeno de la quimioresistencia, donde las células cancerígenas desarrollan mecanismos para evitar el efecto de los fármacos, representa uno de los mayores desafíos en la terapia del cáncer de mama (Zahreddine y Borden, 2013). Las células tumorales están expuestas a condiciones fluctuantes en su microambiente, como metabolitos de señalización, biomoléculas del estroma y agentes quimioterapéuticos, lo que favorece cambios genéticos y fenotípicos que

pueden contribuir a la resistencia (Galindo-Hernández et al., 2014; Galindo-Hernández et al., 2015). Estos mecanismos incluyen una disminución en la activación de profármacos, el aumento en la expresión de bombas de eflujo y la activación de sistemas enzimáticos que degradan los fármacos (Marin et al., 2014). La metástasis de los tumores epiteliales resistentes a la quimioterapia es considerada una de las principales causas de muerte en pacientes con cáncer de mama (Gupta et al., 2019).

Dado el complejo panorama que presenta el tratamiento de esta enfermedad, es crucial avanzar hacia enfoques terapéuticos más innovadores y personalizados que permitan abordar de manera más eficaz la variabilidad genética y los mecanismos de resistencia, con el objetivo de mejorar las tasas de supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

2. Marco teórico.

2.1. Cáncer de mama.

El cáncer es una enfermedad intrínsecamente genética, originada por alteraciones en los genes que regulan el funcionamiento celular, particularmente aquellos involucrados en la formación y proliferación de células. Estas alteraciones genéticas, conocidas como mutaciones, pueden llevar a un crecimiento descontrolado de las células y la formación de tumores malignos.

Las mutaciones que causan cáncer pueden ser provocadas por diversos factores. En primer lugar, los errores durante la replicación celular son una fuente importante de mutaciones. Cada vez que una célula se divide, el ADN debe replicarse. Aunque existen mecanismos de corrección y reparación del ADN, estos pueden fallar, permitiendo que mutaciones se acumulen con el tiempo y promuevan el desarrollo canceroso (Hanahan & Weinberg, 2011).

Además, las mutaciones pueden ser heredadas de los padres. Algunas personas nacen con mutaciones genéticas que predisponen a ciertos tipos de cáncer. Estas

mutaciones están presentes en todas las células del cuerpo desde el nacimiento y aumentan el riesgo de desarrollar cáncer en algún momento de la vida (GLOBOCAN, 2021). A medida que el cáncer progresa, nuevas mutaciones pueden surgir debido a la inestabilidad genómica inherente a las células cancerosas. Esta acumulación de mutaciones adicionales puede facilitar la evolución del tumor, su capacidad para evadir el sistema inmunológico, y la resistencia a tratamientos (Hanahan & Weinberg, 2011).

El artículo de Hanahan y Weinberg, "Hallmarks of Cancer" (2000, revisado en 2011), proporciona un concepto crucial para entender el cáncer. Los autores identificaron varias características fundamentales, o "marcas distintivas," que son compartidas por la mayoría de los tipos de cáncer. Estas incluyen la autonomía en la proliferación celular, la evasión de la muerte celular programada (apoptosis), la capacidad de inducir la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), y la habilidad para invadir tejidos circundantes y metastatizar a otras partes del cuerpo. Además, destacan la inestabilidad genómica y la reprogramación de la bioenergética celular como características distintivas del cáncer (Fig. 1) (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas "marcas distintivas" proporcionan una base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y una comprensión más profunda del funcionamiento celular en el cáncer. La investigación continúa avanzando en estos campos, ofreciendo la posibilidad de tratamientos más específicos y eficaces contra esta enfermedad compleja (Hanahan & Weinberg, 2011; National Cancer Institute, 2022).

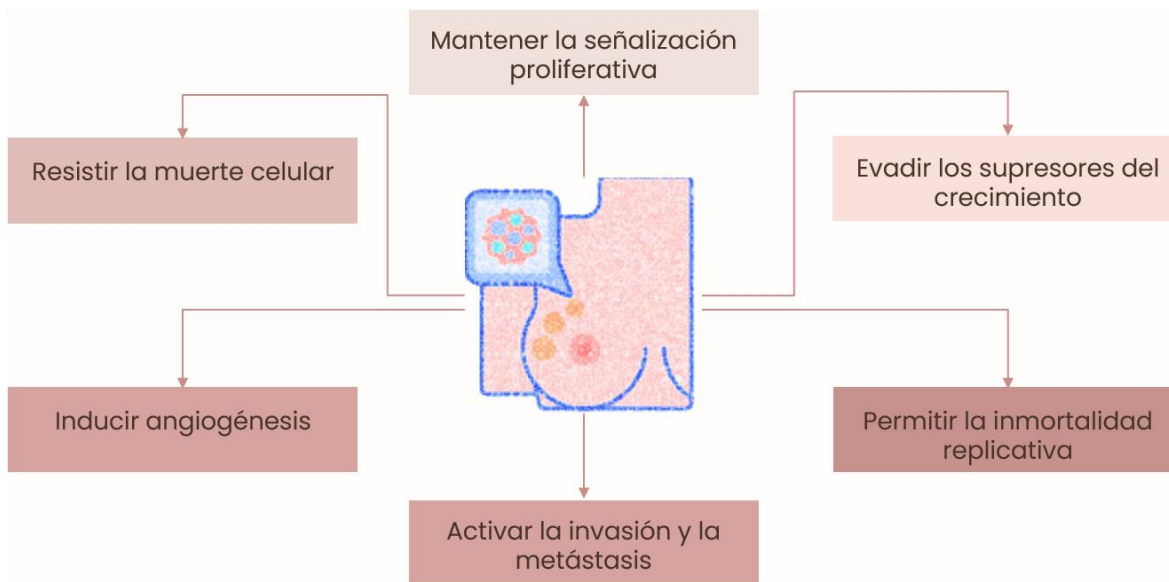


Fig 1. Marcadores de cáncer. Esta imagen representa las características clave del comportamiento de las células cancerosas, incluyendo la autosuficiencia en señales de crecimiento, la resistencia a la apoptosis y la capacidad de inducir angiogénesis. Basada de Hanahan & Weinberg, 2011.

El término cáncer de mama hace referencia al crecimiento rápido y desordenado de células anormales en la glándula mamaria. Así mismo es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres alrededor del mundo (Global Cancer Observatory, 2020). Se han reportado a nivel mundial 20 millones de casos nuevos y aproximadamente 10 millones de defunciones durante el 2022, mientras que a nivel nacional podemos apreciar que se observa el mismo patrón, teniendo un poco más de 200 mil casos nuevos y cerca de 100 mil defunciones en el mismo año. (Cancer Today, s/f). En México, el cáncer de mama constituye una preocupación de salud pública, siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres. Los datos del INEGI en el 2022 señalan un aumento en la incidencia de esta enfermedad. Factores como la edad, antecedentes familiares, factores genéticos, la obesidad y estilo de vida influyen en su desarrollo. A pesar de los avances en la detección y tratamiento, persisten los desafíos en el acceso a la atención médica, especialmente en comunidades marginadas. Actualmente se están implementando programas de detección temprana para mejorar las tasas de supervivencia y reducir la mortalidad.

Los principales desarrolladores de la enfermedad son las hormonas esteroideas como los estrógenos, los factores de crecimiento como lo es el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), ambas vías suelen ser altamente mitógenas y antiapoptóticas. (Casa et al., 2012).

El cáncer de mama presenta varias características distintivas que influyen en su desarrollo y progresión. Una de estas características es la autosuficiencia en las señales de crecimiento. Se ha observado que, en tejidos como el útero y la glándula mamaria, el estrógeno interactúa con el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). En estudios realizados en el útero, se ha demostrado que el tratamiento con estrógeno activa de manera rápida el receptor IGF-IR, y esta activación es dependiente de la presencia de IGF-I (Casa et al., 2012).

Otra característica importante del cáncer de mama es la inducción de la angiogénesis. Este proceso implica la formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos, así como un aumento en la permeabilidad vascular. Estos cambios facilitan el desarrollo del tumor al mejorar su suministro de nutrientes y permitir su migración e invasión a tejidos circundantes (Mercurio et al., 2005).

Además, el cáncer de mama a menudo muestra evasión de la apoptosis, un proceso de muerte celular programada que normalmente elimina células dañadas o no deseadas. La apoptosis puede iniciarse a través de dos vías principales. La vía extrínseca, relacionada con el receptor de muerte (DR, por sus siglas en inglés), que se activa mediante la unión de un ligando al receptor, lo que desencadena una cascada de eventos que incluye la activación de la caspasa-8 y, posteriormente, la caspasa-3. La vía intrínseca, o mitocondrial, activada mediante la liberación del citocromo c desde las mitocondrias, lo que lleva a la fosforilación de Apaf-1 y la formación de un complejo con el citocromo c y ATP, resultando en la activación de la caspasa-9 y, finalmente, la caspasa-3 (Pu et al., 2017).

2.2. Subtipos de cáncer de mama.

Los tumores mamarios se pueden clasificar en función de la expresión de receptores hormonales, utilizando técnicas avanzadas como la inmunohistoquímica y el perfil de expresión génica. Esta clasificación es fundamental para orientar el tratamiento y realizar un pronóstico adecuado de la enfermedad. Los tres subtipos principales del cáncer de mama son: el positivo a receptores de estrógeno (RE+), el positivo al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2+), y el triple negativo (TNBC), que no expresa receptores hormonales. (Fig. 2)

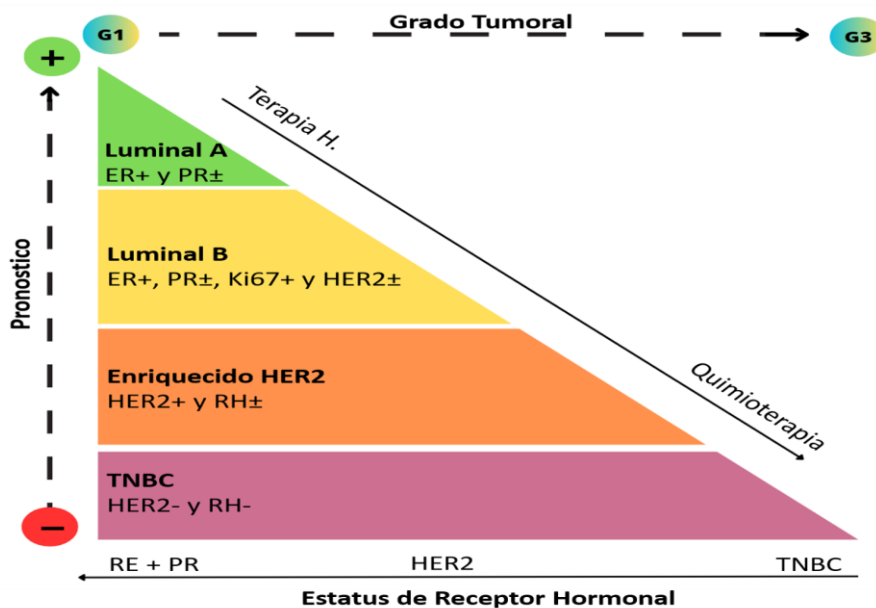


Fig 2. Subtipos de cáncer de mama. La subdivisión del cáncer de mama se presenta de acuerdo con su biología molecular, para así especificar el tratamiento, siendo estos diferentes en la expresión hormonal. Tomado de (Fragomeni, Sciallis, & Jeruss, 2018).

El subtipo positivo al HER2+ se caracteriza por la sobreexpresión del receptor HER2, una tirosina quinasa transmembranal que regula el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia. Esta sobreexpresión está presente en el 15-30% de los cánceres de mama y está asociada con un curso clínico más agresivo. Para tratar estos tumores, se utilizan actualmente anticuerpos monoclonales anti-HER2 (Fragomeni, Sciallis, & Jeruss, 2018).

Los tumores triple negativos (TNBC) representan entre el 15-20% de los cánceres de mama invasivos. Este subtipo se define por la ausencia de expresión de los

receptores de estrógeno, progesterona y HER2, condición que lo convierte en uno de los subtipos más desafiantes en términos de tratamiento debido a la falta de objetivos terapéuticos específicos (Fragomeni, Sciallis, & Jeruss, 2018).

Por último, el subtipo positivo a receptores de estrógeno (RE+) constituye aproximadamente el 80% de los tumores mamarios. A pesar de presentar la tasa más alta de recurrencia, es el subtipo molecular menos agresivo. Los receptores de estrógeno (RE) pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales nucleares, que actúan como factores de transcripción activados por ligandos. Estos receptores juegan un papel crucial en el crecimiento, desarrollo, reproducción y mantenimiento de diversos tejidos (Lipovka & Konhilas, 2016). La mayoría de los tumores RE+ (55-65%) también son positivos para el receptor de progesterona (RP+), el cual participa en la señalización mediada por el RE, aportando una complejidad adicional al perfil hormonal del tumor (Fragomeni, Sciallis, & Jeruss, 2018).

2.3. Los receptores de estrógeno y el estradiol.

Los RE son parte de esta súper familia de receptores hormonales nucleares (NHR) que actúan como factores de transcripción y se caracterizan por tener cinco dominios estructurales característicos: un dominio amino-terminal (dominio A/B), un dominio de unión al ADN (DBD; dominio C), una región bisagra (dominio D), un dominio de unión a ligando (LBD; dominio E) y el dominio carboxilo terminal (dominio F) cuya función aún no se describe en detalle (Fig. 3). Los RE se dividen en dos, los RE α y RE β , los cuales tienen homología en el dominio C. (Hamilton et al., 2017).

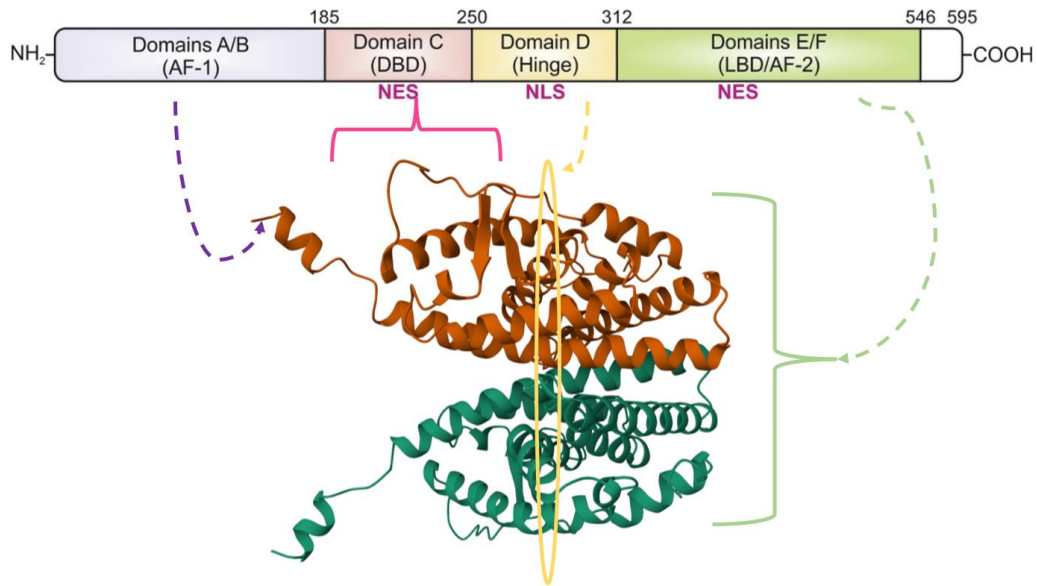


Fig 3. Estructura de los REα. Se muestran los diferentes dominios del receptor de estrógeno. Tomado de (Tecalco-Cruz et al., 2017), (Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. 2018)

En el tejido mamario, principalmente se expresa el RE α que desempeña un papel crucial en el desarrollo y las funciones normales de la glándula mamaria. Además, un aumento en la expresión del RE α se ha relacionado tanto con la iniciación del cáncer de mama como con su progresión. La hormona estradiol (E2) desempeña un papel fundamental en el cáncer de mama al actuar como el ligando del RE α . Esta interacción desencadena una serie de eventos biológicos clave como la proliferación y supervivencia de las células epiteliales mamarias (Pham et al., 2019). La influencia de los estrógenos en el cuerpo es extensa, afectando diversos procesos fisiológicos que van desde el ciclo menstrual hasta la reproducción y el desarrollo de cáncer de mama. Los estrógenos se dividen en cuatro tipos principales: estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3) y estetrol (E4). Cada uno de estos estrógenos tiene funciones específicas y contribuye de manera distinta a los procesos biológicos y patológicos en el organismo. En el contexto del cáncer de mama, el estradiol es particularmente significativo debido a su capacidad para activar el receptor de estrógeno alfa, promoviendo así la proliferación celular y la supervivencia de las células mamarias (Thomas & Potter, 2013).

La síntesis de estrógenos se desarrolla a partir de precursores androgénicos, como lo es la testosterona (T) y androstenediona (A). El ovario es el sitio con mayor concentración y síntesis del E2. Los sitios de metabolización extraovárico tienen gran relevancia en la posmenopausia ya que los niveles bajan en esta etapa, fundamentalmente el tejido adiposo y la piel, por lo que la aromatización de los andrógenos se caracteriza por estar directamente relacionada con la cantidad de tejido adiposo de cada mujer. (Missmer et al., 2004). Considerando estas condiciones, se puede afirmar que la función del RE α en el cáncer de mama no solo sirve como un marcador favorable para un buen pronóstico, sino que también representa un objetivo clave para la terapia. La interacción del estradiol con el RE α en las células mamarias contribuye a la proliferación y supervivencia celular, como también su capacidad para regular la expresión de genes como la catepsina D, lo cual subraya su importancia en la biología del cáncer y en el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a modular estas vías moleculares para mejorar el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad (Kang et al., 2020), (Pham et al., 2019). Por lo tanto, evaluar la función del RE α es crucial tanto para prever el curso de la enfermedad, así como para diseñar estrategias terapéuticas efectivas.

2.4. Tratamiento del cáncer de mama RE+

El tamoxifeno está indicado para el tratamiento en etapas tempranas y avanzadas del cáncer de mama en mujeres de todas las edades, con tumores RE+. Este fármaco actúa como modulador selectivo, compitiendo con el estradiol (E2) para unirse al RE y dependiendo del sitio de acción presenta diferente respuesta, como agonista o antagonista. En las células de la mama su efecto es mayoritariamente anti-estrogénico, impidiendo que el E2 genere señales de supervivencia y proliferación, inhibiendo el crecimiento de tumores (Brunton, Lazo, & Parker, 2007; Johnson, et al., 2004). Cabe señalar que este efecto no es llevado a cabo únicamente por la molécula de tamoxifeno, sino por los metabolitos derivados de éste, los que inducen un mayor efecto inhibitorio.

La generación de metabolitos farmacológicamente activos a partir del tamoxifeno depende de la familia de enzimas del citocromo P450. El N-desmetiltamoxifeno (NMD), generado mediante N-demetilación por la isoenzima CYP3A4, es uno de los metabolitos más abundantes en el plasma de los pacientes y presenta una potencia comparable a la del tamoxifeno, por lo que su contribución al efecto farmacológico no es tan significativa. Sin embargo, el 4-hidroxitamoxifeno (4-OH-Tam), formado mediante 4-hidroxilación por la enzima CYP2D6, es 30-100 veces más potente que el tamoxifeno. Otro metabolito es el 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno), un metabolito secundario formado a partir del NMD mediante la acción de la CYP2D6. El endoxifeno posee la misma potencia que el metabolito 4-OH-Tam, sin embargo, se encuentra en una concentración en plasma 6 veces mayor, por lo que su contribución al efecto farmacológico es mayor (Lim, Desta, Flockhart, & Skaar, 2005).

El fulvestrant es un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama positivo para receptores hormonales, particularmente en casos de resistencia a otras terapias. Este fármaco se clasifica como un degradador selectivo del receptor de estrógeno (SERD). A diferencia de otros tratamientos que simplemente bloquean la acción del estrógeno, el fulvestrant actúa compitiendo con el estrógeno (E2) por la unión al receptor de estrógeno (RE) y, además, induce la degradación del receptor. Como resultado, se logra una completa inhibición de la señalización por estrógeno, lo cual es crucial para controlar el crecimiento de tumores dependientes de estrógenos. Actualmente, el fulvestrant es el único fármaco de su tipo en uso en la práctica clínica para este propósito (Lee, Goodwin, & Wilken, 2017). Generalmente se utiliza para tratar el cáncer de mama en casos en los que la enfermedad ha evolucionado después del uso de tamoxifeno, donde se ha adquirido resistencia (Brunton, Lazo, & Parker, 2007).

Aunque las terapias hormonales han demostrado ser altamente efectivas en el tratamiento del cáncer de mama positivo para receptores hormonales (RE+), un desafío significativo es la aparición de resistencia a estos tratamientos. La

resistencia a la terapia hormonal puede limitar significativamente el éxito del tratamiento y complicar la gestión del cáncer de mama.

La quimioresistencia, en general, se refiere a la incapacidad de las células cancerosas para responder de manera efectiva a la terapia, un fenómeno que puede conducir al fracaso del tratamiento. En el contexto del cáncer de mama, la resistencia a la terapia hormonal se manifiesta en dos formas principales: resistencia de *novo* (primaria) y resistencia adquirida (secundaria) (Fan, Chang & Fu, 2015).

La resistencia de *novo* ocurre cuando los pacientes no responden a la terapia hormonal desde el inicio del tratamiento. Este tipo de resistencia se caracteriza por una falta de respuesta terapéutica incluso cuando se emplean las primeras líneas de tratamiento, como los inhibidores de aromatasa o el tamoxifeno. La resistencia de *novo* puede estar relacionada con alteraciones genéticas o epigenéticas en las células tumorales que impiden la eficacia de la terapia hormonal desde el principio. Por otro lado, la resistencia adquirida se desarrolla en pacientes que inicialmente responden a la terapia hormonal, pero con el tiempo, el cáncer se vuelve resistente. Este fenómeno puede ocurrir después de un período de respuesta positiva al tratamiento. La resistencia adquirida está asociada con cambios en las características del tumor que permiten a las células cancerosas adaptarse y sobrevivir a la terapia, tales como mutaciones en el receptor de estrógeno o alteraciones en las vías de señalización celulares que el tratamiento hormonal bloquea.

Ambos tipos de resistencia complican el tratamiento del cáncer de mama RE+ y requieren estrategias terapéuticas innovadoras. La investigación continúa en busca de nuevas opciones de tratamiento y enfoques para superar la resistencia a la terapia hormonal, con el objetivo de mejorar los resultados para los pacientes que enfrentan este desafío.

3. Antecedentes

3.1. Epidemiología del cáncer de mama.

En México, durante el año 2021, se registraron un total de 90,525 muertes a causa de tumores malignos, lo que representa el 8.1% del total de defunciones en el país. De estas, 7,973 fueron atribuibles al cáncer de mama, de las cuales el 99.4% correspondieron a mujeres y el 0.6% a hombres. La tasa de mortalidad por cáncer de mama para las mujeres de 20 años y más fue de 18 defunciones por cada 100,000 mujeres en este grupo de edad a nivel nacional (INEGI, 2022).

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) destaca que la tasa de mortalidad por cáncer de mama varía significativamente según la edad y la región, la tasa más alta se registró en mujeres de 60 años o más, alcanzando 48.24 defunciones por cada 100,000 mujeres de 20 años y más (INEGI, 2022). Adicionalmente, se han identificado diferencias regionales notables en las tasas de mortalidad por cáncer de mama en México. En particular, el estado de Baja California presenta una tasa de mortalidad que, aunque inferior a la de algunas entidades con mayores tasas, como CDMX, Veracruz y Jalisco, sigue siendo preocupante y resalta la necesidad de abordar de manera efectiva los factores que contribuyen a esta situación. En Baja California, la tasa de mortalidad por cáncer de mama en 2021 fue de 22.5 defunciones por cada 100,000 mujeres de 20 años y más. Esta cifra está por encima de la media nacional de 18 defunciones por cada 100,000 mujeres, indicando una mayor carga de la enfermedad en la región. Las diferencias en las tasas de mortalidad pueden estar relacionadas con factores como el acceso a servicios de salud, la disponibilidad de programas de detección temprana y disparidades socioeconómicas.

3.2. Generación de variantes celulares resistentes.

Como parte del trabajo de un grupo de investigación, se han desarrollado variantes celulares resistentes a metabolitos derivados del tamoxifeno,

específicamente el 4-hidroxitamoxifeno y el endoxifeno. En nuestro grupo, se generó una variante denominada variante E, que fue tratada tanto con estos dos metabolitos del tamoxifeno como con estradiol, con el objetivo de simular condiciones fisiológicas. Es importante destacar que estas variantes se originaron a partir de la línea celular MCF-7, que se caracteriza por ser receptora de estrógeno positiva (RE+). En la variante E, se observó una incidencia de resistencia a concentraciones de 8 y 16 μM de los metabolitos, lo que sugiere una capacidad de adaptación a estos compuestos. Esto se evidencia en que el valor de IC₅₀ de la variante E es mayor que el de la línea celular nativa MCF-7, indicando que se requiere una mayor concentración de los metabolitos para lograr el mismo efecto inhibitorio. (Fig. 4) (Pulido-Capiz et al, 2024).

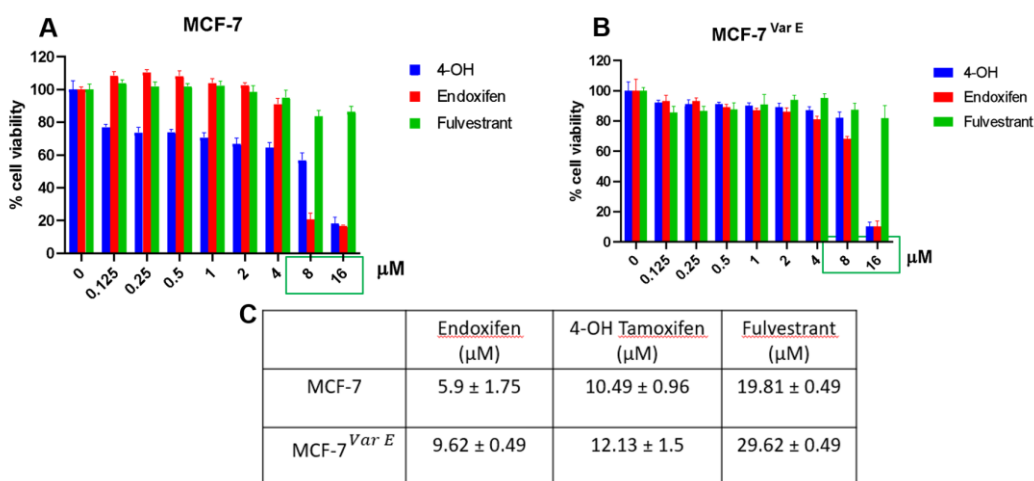


Fig 4. Grafica de dosis de metabolitos derivados del tamoxifeno vs viabilidad celular. Se muestra la comparación de los valores obtenidos con los diferentes fármacos en relación con la viabilidad celular en la variante nativa y clona E, en concentraciones crecientes y un tiempo de tratamiento de 120h (Pulido-Capiz et al. 2024)

3.3. Cumarinas.

Las cumarinas son compuestos naturales que existen en varias familias de plantas, las cuales incluyen a las Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Rutaceae,

Moraceae, Oleaceae, y Thymelaeaceae. Dentro de las más importantes se encuentra la familia de las Apiaceae, con mayor cantidad de compuestos derivados de la cumarina. Cabe mencionar que los efectos de las cumarinas pueden ser muy variados, dentro de los más importantes que se han encontrado son, efectos antioxidantes, antiinflamatorios, ansiolíticos, analgésicos, neuroprotectores, cardioprotectores, antidiabéticos, y anticancerígenos (Majnooni et al., 2019). La estructura base de las cumarinas es el 2H-1-benzopirán-2-ona, un núcleo químico que da origen a una variedad de compuestos con propiedades terapéuticas notables. Las cumarinas, que se encuentran en la naturaleza y también pueden ser sintetizadas mediante diversos métodos químicos, han demostrado tener una capacidad anticancerígena significativa tanto en experimentos *in vitro* como en modelos *in vivo* (Kaur, 2015).

La esculina, que se extrae de la planta *Aesculus hippocastanum*, también ha mostrado una actividad anticancerígena considerable. Este compuesto no solo inhibe la proliferación de células tumorales, sino que también promueve la apoptosis, afectando negativamente la viabilidad celular en varias líneas celulares cancerosas (Baraldi et al., 2016). Además, la hesperidina, que se encuentra en frutas cítricas, es otra cumarina con propiedades anticancerígenas destacadas. Se ha reportado que la hesperidina induce apoptosis en células cancerosas y disminuye la angiogénesis en tumores sólidos, ofreciendo así un potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer (Reddy et al., 2015). Estos ejemplos ilustran la diversidad de cumarinas con potencial anticancerígeno y destacan la importancia de continuar investigando estas moléculas para desarrollar nuevos tratamientos contra el cáncer. La investigación en curso podría llevar al descubrimiento de nuevos compuestos y a la mejora de las terapias basadas en cumarinas, ofreciendo así nuevos desarrollos para la lucha contra el cáncer. Dentro de los mecanismos a través de los cuales pueden actuar las cumarinas y sus derivados (Fig.5), se ha descrito la actividad antioxidante, inducción del arresto del ciclo celular, interacción con varias vías de señalización con actividad

en proliferación y diferenciación, inhibición de las telomerasas y anhidrasas carbónicas, así como la actividad anti-angiogénica (Hernández & González, 2015).

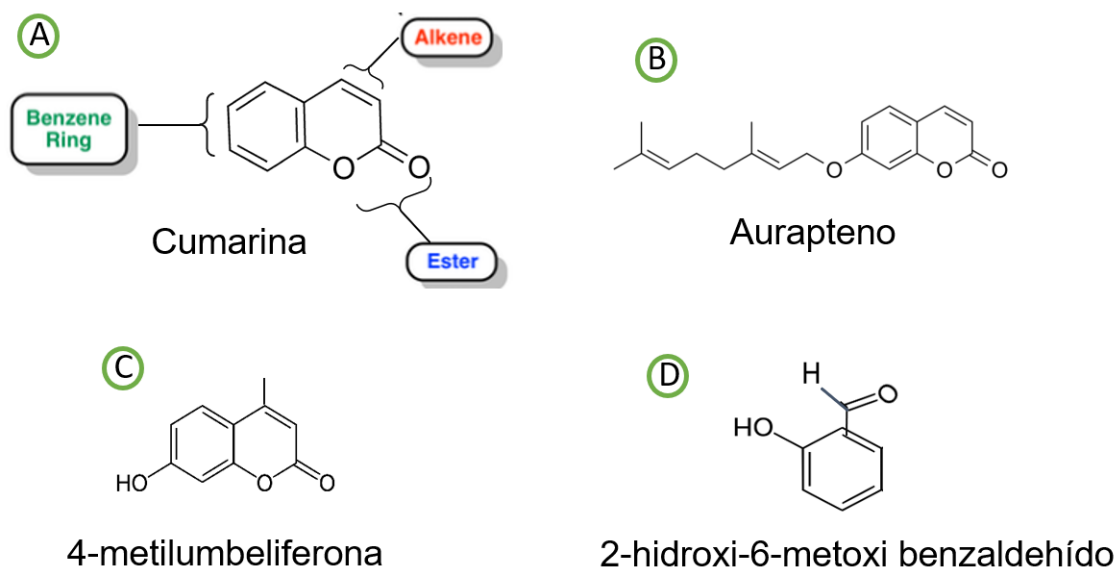


Fig5. Estructuras químicas de derivados de la cumarina. Se muestra las diferentes estructuras de los compuestos candidatos a estudiar A) 2H-1-benzopiran-2-ona(cumarina), B) Aurapteno, C) 4-metilumbeliferona D) 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído (Autoría propia).

Dentro de la familia de las cumarinas, el aurapteno se destaca como un compuesto natural de particular interés. Este derivado de los cítricos, conocido como geranilooxi-cumarina, se encuentra en plantas y frutos provenientes de Asia, como el *Paliurus ramosissimus*. El aurapteno ha sido objeto de investigación debido a su capacidad para participar en diversos mecanismos quimiopreventivos. Específicamente, el aurapteno no solo induce la actividad de enzimas desintoxicantes que neutralizan carcinógenos, sino que también promueve la apoptosis en células cancerosas. Estas propiedades amplían las opciones para el desarrollo de nuevas estrategias en la prevención y el tratamiento del cáncer (Krishnan et al., 2009).

Hay un interés en el aurapteno y la importancia de explorar la amplia gama de cumarinas disponibles y sus posibles aplicaciones en la terapia anticancerígena. Este enfoque resalta cómo los derivados naturales pueden ofrecer alternativas

efectivas para la prevención y tratamiento del cáncer. En particular, el efecto del aurapteno se manifiesta de manera significativa cuando se combina con moléculas derivadas del tamoxifeno, como el endoxifeno y el 4-hidroxi tamoxifeno, en concentraciones crecientes. Este estudio demuestra una sinergia entre el aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno, evidenciando una reducción en la viabilidad celular. Además, los tratamientos combinados resultaron ser más efectivos en líneas celulares que expresan el receptor de estrógenos, sugiriendo que el aurapteno, en combinación con estos metabolitos, tiene una eficacia específica para este tipo de células cancerosas (Pulido-Capiz et al. 2024). Dentro de los posibles mecanismos por los cuales esté llevando a cabo su efecto el aurapteno es a través de la reducción de la expresión de la ciclina D1, así como la inhibición de la vía de IGF-1 (Krishnan and Kleiner-Hancock 2012), siendo de manera importante las vías de MAPK y PI3K (Vincent AM, 2002), además de un aumento de las caspasas 3 y 8 (Charmforoshan et al. 2019), como también un posible blanco del aurapteno sería GPR30 miembro de la familia de receptores de estrógenos acoplados a la proteína G transmembrana. Para mejorar las alternativas terapéuticas y potenciar el potencial farmacológico de compuestos basados en cumarina, es esencial explorar y comprender el mecanismo de acción de varias moléculas clave, como la 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, el aurapteno, la cumarina y la 4-metilumbelliferona (Fig. 5).

La 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, un derivado de la cumarina, se destaca por sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas, que incluyen su capacidad para inducir la muerte celular programada y frenar la proliferación de células cancerosas. Por otro lado, el aurapteno, un compuesto derivado de los cítricos y presente en plantas como *Paliurus ramosissimus*, ha mostrado eficacia en la inducción de la apoptosis y en la activación de enzimas desintoxicantes que juegan un papel crucial en la prevención del cáncer (Epifano et al., 2013). La cumarina, que sirve como núcleo estructural de esta familia de compuestos, es conocida por sus diversas propiedades terapéuticas, que abarcan desde la actividad anticoagulante hasta la inhibición del crecimiento tumoral. Además, la 4-

metilumbelliferona también posee propiedades anticancerígenas, al inducir la apoptosis y ralentizar el crecimiento de células tumorales. Para maximizar la eficacia de estos compuestos, se está investigando el uso de nanoliposomas. Estas vesículas lipídicas diseñadas para encapsular los fármacos pueden mejorar su solubilidad, estabilidad y entrega selectiva a las células objetivo. El uso de nanoliposomas representa una prometedora estrategia para aumentar la eficacia de los tratamientos anticancerígenos y reducir los efectos secundarios, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias más efectivas (Gabrielson, 2018).

3.4. Uso de nanoliposomas como estrategia de tratamiento

El nanoliposoma, o vesícula lipídica de bicapa submicrométrica, es una tecnología emergente en la administración de fármacos y vacunas. Estas estructuras esféricas, con tamaños en el rango de 50-200 nanómetros, consisten en una bicapa lipídica que encapsula una fase acuosa interna. Esta permite la incorporación y protección de una amplia gama de bioactivos, incluyendo fármacos y antígenos para vacunas. Su similitud con las membranas celulares facilita la penetración eficiente a través de barreras biológicas, como la mucosa intestinal, protegiendo a los bioactivos durante su tránsito y favoreciendo su liberación en el torrente sanguíneo (Malam et al., 2009; Allen & Cullis, 2013) (Fig. 6).

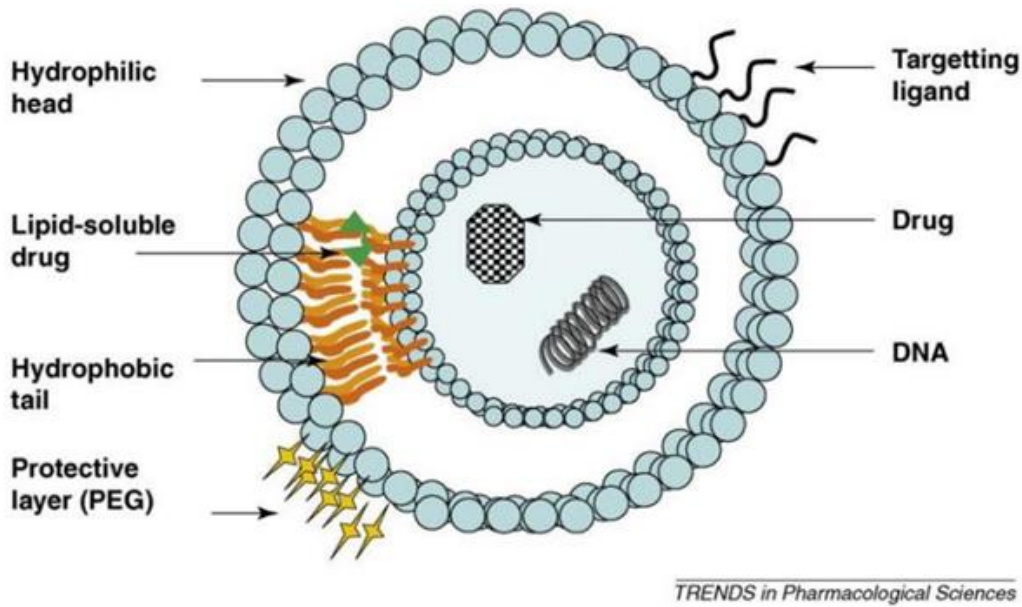


Fig 6. Estructura de los nanoliposomas. Se muestra el diseño de los nanoliposomas y su estructura principal (Malam et al., 2009)

En el campo de las vacunas, los nanoliposomas han demostrado ser una alternativa altamente eficaz para la entrega de antígenos. Su capacidad para encapsular antígenos y adyuvantes no solo mejora la estabilidad y biodisponibilidad de las vacunas, sino que también permite su liberación controlada. Esto contribuye a una respuesta inmune más robusta y duradera. Por ejemplo, las vacunas basadas en nanoliposomas han sido utilizadas con éxito en la inmunización contra diversas enfermedades infecciosas, como la tuberculosis y la gripe (Miller et al., 2019). Además, se están llevando a cabo investigaciones para aplicar esta tecnología en el desarrollo de vacunas contra el cáncer, donde los nanoliposomas pueden facilitar la presentación de antígenos tumorales y mejorar la respuesta inmune contra células cancerosas (Kaddoumi et al., 2020). La encapsulación de antígenos en nanoliposomas permite una presentación óptima del antígeno a las células del sistema inmune, lo que puede incrementar la eficacia de la vacuna y reducir la necesidad de dosis repetidas (Reddy et al., 2001; Kwon et al., 2006).

En este contexto, los nanoliposomas pueden ser diseñados para incluir antígenos específicos del tumor y adyuvantes que potencien la respuesta inmune

antitumoral. Este enfoque ha sido investigado en ensayos clínicos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, con resultados prometedores en la inducción de respuestas inmunitarias específicas contra células tumorales (Farokhzad et al., 2006). De manera que también pueden usarse para la incorporación de moléculas como las cumarinas.

4. Planteamiento del problema.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y representa un problema de salud que va en aumento. La incidencia de este padecimiento ha aumentado considerablemente en el país en la última década, del año 2010 al año 2019 se observó un incremento aproximado del 53 % (INEGI, 2021). Aproximadamente el 80 % de los casos de cáncer de mama son RE+ (González Espinoza, et al., 2015) y cuentan con un alto porcentaje de recurrencia. En México, en 2019 se reportaron 15,119 nuevos casos en la población femenina de 20 años o más (35.24 por cada 100 mil mujeres). De manera que es necesario el desarrollo de estrategias novedosas para su tratamiento, dentro de las cuales, moléculas basadas en la estructura de la cumarina podrían representar una estrategia adecuada con base en antecedentes de nuestro grupo de trabajo.

5. Justificación.

La investigación sobre el microambiente tumoral es esencial para entender el cáncer de mama, una enfermedad importante y frecuente en la población femenina. Las células tumorales están inmersas en un entorno complejo que incluye fluctuaciones metabólicas y biomoléculas del estroma, lo que puede inducir cambios fenotípicos que afectan su crecimiento y resistencia a tratamientos. Estas adaptaciones, como alteraciones genéticas y cambios transcripcionales, modifican las rutas metabólicas y pueden impactar la eficacia de la terapia farmacológica. Comprender cómo el microambiente influye en las células cancerosas es crucial para desarrollar tratamientos más efectivos y personalizados, mejorando así los

resultados clínicos en el cáncer de mama. Por lo tanto, una alternativa es el uso de moléculas derivadas de las cumarinas, como lo son 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, aurapteno, cumarina y 4-metil umbelifeorna, particularmente en el caso del aurapteno se han obtenido resultados favorables al sensibilizar a células resistentes a 4-hidroxitamoxifeno y endoxifeno, por lo tanto, el tratamiento con estas moléculas puede marcar un buen precedente, particularmente cuando también se hace el uso de nanoliposomas.

6. Hipótesis y objetivos

6.1. Hipótesis

El tratamiento con moléculas basadas en la estructura de la cumarina será efectivo para reducir la viabilidad celular en células de cáncer de mama que expresan el receptor de estrógenos positivo (RE+), específicamente en la línea celular MCF-7.

6.2. Hipótesis Nula.

No hay diferencia en la viabilidad celular entre las células tratadas con 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, aurapteno, cumarina y 4-metil umbelifeorna y las células del grupo de control

6.3. Hipótesis alterna.

El tratamiento con 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, aurapteno, cumarina y 4-metil umbelifeorn reduce significativamente la viabilidad celular en las células de cáncer de mama ER+ en comparación con el grupo de control.

6.4. Objetivo general.

Caracterizar el efecto terapéutico de tratamientos con base en la estructura de la cumarina mediante las moléculas cumarina, 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, 4-metilumbeliferona y aurapteno sobre un modelo de línea celular MCF-7 de cáncer de mama RE+

6.5. Objetivos específicos.

6.5.1. Determinar la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de las moléculas cumarina, 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, 4-metilumbeliferona y aurapteno sobre un modelo celular de cáncer de mama RE+ (MCF-7).

6.5.2. Evaluar mediante un ensayo para caracterizar la apoptosis (AV-FITC y PI) el efecto de las cumarinas, usando concentraciones representativas obtenidas de la curva de CI_{50}

6.5.3. Definir el papel de las moléculas basadas en la cumarina mediante la evaluación de la expresión de las proteínas diana implicadas en la proliferación celular, como el receptor de estrógenos (RE), así como en la apoptosis, incluyendo Bax, Bcl-2, caspasa 8 y XIAP. Además, se evaluará la expresión de otras proteínas relevantes, como HSP90, catepsina D y c-Jun, que pueden influir en la supervivencia y el crecimiento celular.

6.5.4. Llevar a cabo la síntesis de nanoliposomas con la molécula de mejor potencial para reducir la viabilidad celular y evaluar su efecto en un modelo de células MCF-7 de cáncer de mama RE+.

7. Materiales y Métodos.

Se llevó a cabo un estudio experimental *in vitro* de tipo analítico, en el que se obtuvieron resultados cuantitativos y semi-cuantitativos.

7.1. Cultivo de células MCF-7 (RE+).

Se evaluó la línea celular MCF-7 mediante diferentes técnicas, la cual era RE+ y sensible a anti-estrógenos, y se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, EE. UU (Fig. 7). La línea MCF7 se proliferó en medio Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM). Los medios se suplementaron con 10 % de suero fetal bovino, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e insulina.

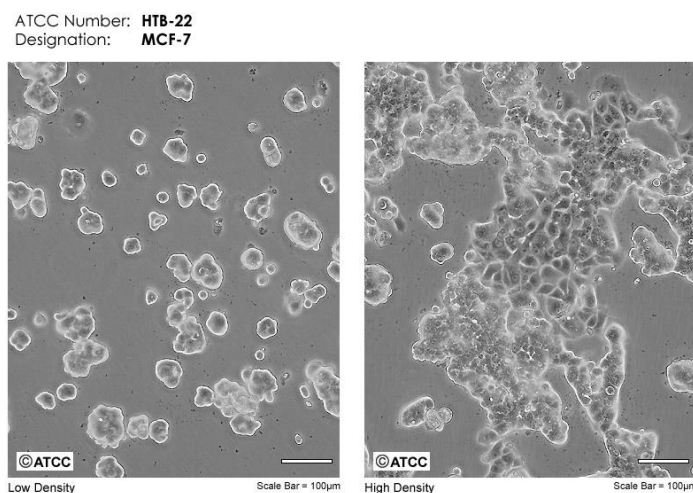


Fig 7. Morfología de las células MCF-7. Visualización de la morfología de células obtenidas en ATCC la cuales presentan características de ser de cáncer de mama positivas a receptor de estrógeno (<https://www.atcc.org/products/htb-22>).

7.2. Ensayo de MTT.

Ensayos de viabilidad celular. Para evaluar la quimioresistencia y los diferentes estímulos de citotoxicidad, se utilizó el ensayo de reducción de MTT. Para determinar la viabilidad de las células al someterse a distintas concentraciones de las moléculas aurapteno, cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, se realizó el ensayo de reducción del compuesto Sigma-Aldrich. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La reducción del MTT, llevada a cabo por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales, permitió que la cantidad de MTT reducido sirviera como un indicador indirecto de

la actividad mitocondrial y, por ende, de la viabilidad celular. El ensayo de viabilidad por reducción del MTT se llevó a cabo en una placa de 96 pozos con 20,000 células por mL, alcanzando un volumen final de 100 μ L en cada pozo con medio de cultivo completo. Las células se incubaron durante un periodo no definido a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂, hasta que alcanzaron una confluencia del 90 %. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se decantó el medio completo y, a cada 8 pozos, se les agregó un ayuno de 2 horas con Optimem. Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de las moléculas: 1, 5, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μ M, así como controles negativos con solo medio completo y con DMSO a 25 y 100 μ M, en un volumen final de 100 μ L por pozo. La placa con las células en tratamiento se incubó por 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Al finalizar este tiempo, se tomaron fotografías con el microscopio invertido para facilitar la comparación de la morfología de las células MCF-7 (Fig. 7).

Posteriormente, se agregó 30 μ L del compuesto de MTT (3 mg/mL) y 70 μ L de medio de cultivo completo a cada pozo. Se dejó incubar la placa durante 4 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Terminada la incubación, se adicionó 100 μ L de buffer de lisis, y la placa se incubó nuevamente durante toda la noche a 37°C y 5 % de CO₂. Después, se midió la absorbancia del color violeta insoluble de los compuestos de formazanos a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO). Tras la lectura, se realizaron los análisis estadísticos en GraphPad Prism para determinar el CI₅₀ de cada una de las moléculas, siguiendo el procesamiento basado en trabajos previos (García-González V, 2014).

7.3. Microscopia óptica.

Se utilizó la microscopía óptica para observar los cultivos celulares. Para las muestras, se conservaron en las cajas Petri donde se encontraban después de realizar el tratamiento. Se utilizó el VWR International. microscopio óptico invertido

vistavisión y se ajustaron los objetivos, la iluminación y el contraste del microscopio. Durante la adquisición de imágenes, se enfocó la muestra y se tomaron múltiples imágenes desde diferentes campos de visión, ajustando los parámetros de contraste y brillo para obtener imágenes claras y detalladas. Posteriormente, se procesaron las imágenes utilizando el software Image Lab (Bio-Rad Laboratories), versión 5.1, donde se realizó un análisis visual para identificar y evaluar las características observadas. Finalmente, se prepararon las imágenes con leyendas descriptivas, destacando los aspectos observados y los hallazgos relevantes, lo que permitió la visualización directa de las muestras con cada tratamiento.

7.4. Ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio.

El método para poder diferenciar las células apoptóticas, necróticas y viables es a través de la tinción conjunta con yoduro de propidio (PI, propidium iodide) y anexina V acoplada a FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Durante la apoptosis, la asimetría en la que se distribuye la fosfatidilserina se altera y queda expuesta hacia la monocapa exterior de la membrana plasmática, permitiendo la unión de la anexina V a la fosfatidilserina (Fig. 8). El cultivo celular para esta medición se realizó con 20,000 células, en los que las condiciones utilizaron el $C I_{50}$ obtenido del aurapteno en los ensayos de viabilidad celular. Así, al finalizar las 24 h de incubación, se procedió a decantar el medio y se realizó un lavado con 200 μ L de PBS 1X. Posteriormente, se separaron las células de la caja de cultivo mediante buffer de lisis, agregando 100 μ L de buffer por pozo, y se procedió a scrapear para luego transferir el contenido a tubos de 1.5 mL, donde, con una jeringa de 30 G, se inició la lisis mecánica. Después, las muestras se centrifugaron a 1200 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Inmediatamente, se resuspendieron las células en 250 μ L de una solución de buffer de unión 1X de 4 mL que contenía 40 μ L de FITC-Anexina V y 16 μ L de una solución de trabajo, y 1 μ L de PI con una concentración de 1 μ L en 100 μ L de buffer de unión a anexina 1X. Luego, se incubaron las células en los tubos durante 30 min a 37°C y 5 % de CO₂. A

continuación, se procedió a medir la fluorescencia de la unión de la anexina V-FITC y la de PI, usando el láser azul a 488 nm en el citómetro de flujo, adquiriendo al menos 20,000 eventos por muestra. El análisis de los resultados se realizó en el software FlowJo; la estrategia de análisis se basó en el control sin tinción y el control de muerte inducida, siendo la misma estrategia para todas las muestras.

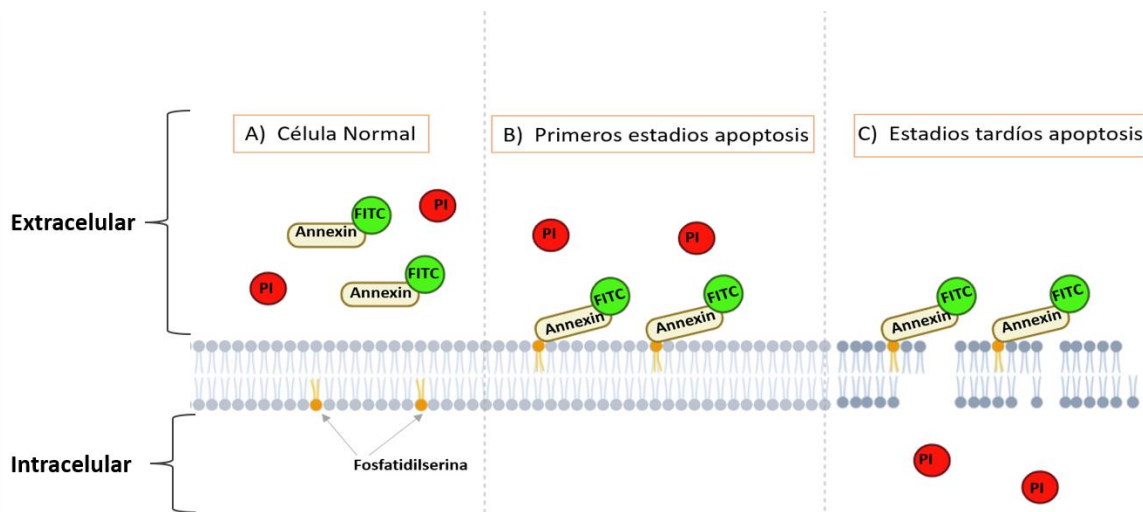


Fig 8. Esquema ilustrativo de la función del ensayo de anexinaV-FITC y yoduro de propidio. Se representa mediante una ilustración la funcionalidad de cada uno de los fluorescentes. Basado de Gortaire, J. A. D. 2017.

Para identificar las diferentes poblaciones celulares, estas se clasificaron en 4 cuadrantes, donde se clasificaron como positivas (+) o negativas (-) a la fluorescencia de PI y FITC. En el cuadrante inferior izquierdo (Q4) se localizaron las células que fueron negativas a la fluorescencia para PI y FITC; estas fueron consideradas como el porcentaje de células vivas y/o células con otro tipo de muerte distinto a apoptosis/necrosis. En el cuadrante inferior derecho (Q1), las células fueron positivas a FITC y negativas a PI, lo que indicó la muerte por apoptosis temprana. Las células positivas a PI y positivas a FITC indicaron apoptosis tardía (Q2) y, por último, el porcentaje celular localizado en positivas a PI y negativas a FITC se utilizó para identificar a las células necróticas (Q3). Finalmente, en el cuadrante superior izquierdo (Q3), se localizaron las células viables, que eran negativas tanto para FITC como para PI, confirmando su integridad celular. Mediante esta identificación, se obtuvieron porcentajes para

cada grupo de población celular, que incluyeron células vivas, necrosis, apoptosis temprana y tardía (Fig. 9).

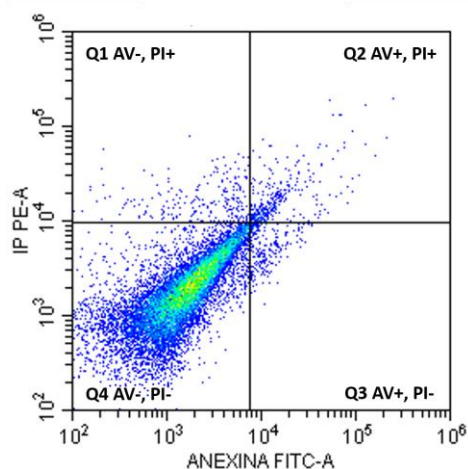


Fig 9. Esquema ilustrativo de los cuadrantes en el ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio. Se representa mediante una ilustración la relevancia de la ubicación de nuestra población celular en cada uno de los cuadrantes, (Q1), se observan células positivas a FITC y negativas a PI, indicando muerte por apoptosis temprana, (Q2), las células positivas a PI y FITC indican apoptosis tardía, (Q3) muestra células positivas a PI y negativas a FITC, que representan necrosis. Finalmente, (Q4), se encuentran las células viables, que son negativas tanto para FITC como para PI.. (Autoría propia).

7.5. Ensayo de formación de colonias.

Se realizó un ensayo de supervivencia celular *in vitro* en el que se determinó la capacidad de una sola célula para convertirse en una colonia. Se estableció una concentración de 10,000 células por pozo, lo que se llevó a cabo en una placa de 12 pozos. Primero, se determinó la concentración de las células para luego realizar el pase celular a dos placas de 12 pozos. Las placas se incubaron con medio completo a 37°C y 5 % de CO₂ durante 48 h.

Posteriormente, se inició el tratamiento, utilizando las siguientes condiciones por cuatriplicado: control negativo con solo medio completo, aurapteno, cumarina, 4-metil umbelliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído a 50 µM, así como un control positivo con el medicamento fulvestrant, también a 50 µM. Los tratamientos se colocaron cada tercer día hasta concluirlo al undécimo día con la fijación. La fijación se realizó una vez terminados los tratamientos. Primero, se retiró el medio completo de cada placa y se lavó con 1 mL de PBS 1X filtrado, el cual se retiró.

Luego, se agregó por goteo 1 mL de paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos en agitación. Se procedió a retirar el paraformaldehído al 4 % para luego lavar con 1 mL de PBS 1X filtrado durante 3 minutos, y se retiró nuevamente. Posteriormente, se añadió 1 mL de azul de Coomassie y se dejó en agitación a 4°C durante 30 minutos. Después, se retiró el azul de Coomassie y se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS 1X filtrado, decantando al final. Finalmente, se llevó a cabo el conteo de colonias mediante el fotodocumentador Quantity One, y el programa Image J, y se realizó el análisis estadístico con el software GraphPad Prism.

7.6. Western-blot.

Para esta técnica, los cultivos celulares se mantuvieron en proliferación hasta alcanzar el 90 % de confluencia y posteriormente se sometieron a los diferentes tratamientos para evaluar la resistencia. Las células se lavaron con PBS y se lisaron para obtener el extracto proteico, seguido de la cuantificación con ácido bicinconínico. Las muestras (10 µg/carril) de la fracción proteica se analizaron mediante SDS-PAGE sobre geles al 10 % y 12 % dependiendo de la proteína blanco, y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon durante 1 h a 37 °C en una solución de TBS, 0.1 % de Tween-20 y 5 % de leche sin grasa. Para la detección, se utilizaron los anticuerpos primarios respectivos, el receptor de estrógeno alfa (RE α) (SC-543), caspasa 8 (SC-56093), BAX (SC-493), ciclooxigenasa (COX) (SC-1747), Bcl-2 (SC-7382), XIAP (SC-7938), GPR30 (SC-1039), catepsina D (SC-6486), HSP90 (SC-13119) y c-Jun (SC-1694). GAPDH se usó como control de carga. Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano y la detección se realizó con el kit Immobilon Western (Millipore).

7.7. Docking molecular.

Con el fin de tener un conocimiento del nivel de afinidad de cada molécula derivada de la cumarina trabajada en este proyecto con el RE α , se recolectó la estructura de las moléculas, cumarina, aurapteno, 4-metilumbeliferona, 2-hidroxí-6-metoxi benzaldehído, umbeliprenina y fulvestrant en la página PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el RE α del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) con el número de acceso 1A52. Por otro lado, los softwares utilizados para realizar el docking molecular fueron Molecular Operating Environment (MOE 2008.10) y Chimera 1.16. El método seguido para llevar a cabo el docking fue el siguiente: se obtuvieron las proteínas de la base de datos Protein Data Bank y de las moléculas en la base de datos PubChem, se preparó la proteína para el docking realizado en el software Molecular Operating Environment (MOE), eliminando de la estructura cristalizada todos los componentes que no forman parte de la proteína, como el ligando y las moléculas de H₂O. Se preparó el ligando mediante el diseño y optimización de su estructura química, incluyendo la asignación de cargas parciales. Se seleccionó la estructura tridimensional de la proteína desde el PDB. Luego, se realizó el docking molecular con un software especializado, configurando parámetros como el sitio de unión y el tipo de algoritmo. Esto generó un archivo en formato MDB que contenía información sobre las poses del ligando en el sitio activo de la proteína y sus energías de unión, y se realizó el docking obteniendo 4 conformaciones diferentes para cada ligando, de esta forma se obtuvieron las diferentes energías de unión en función de la conformación. Se recopilaron los resultados de energía de unión entre el ligando y el receptor, se generó un archivo PDB (Program Database) solo con la primera conformación para poder exportarlo al software Chimera y se aplicaron colores a la proteína y a sus ligandos, colocando los residuos de estos en Chimera para obtener una imagen representativa de ellos.

7.8. Inmunoprecipitación.

La interacción entre las proteínas Hsp90 y el receptor de estrógenos (RE) es crucial, ya que Hsp90 actúa como chaperona molecular, facilitando el correcto

plegamiento y estabilidad del RE, lo que influye en su función en la señalización celular y en la regulación del crecimiento celular. Se prepararon muestras que contenían 200 µg de proteína, junto con un control negativo utilizando PBS, colocando ambos en un tubo de 0.6 mL. A cada muestra se añadieron 2 µL del anticuerpo específico contra el RE α (SC-543). Las muestras fueron incubadas durante 3 horas a 4 °C en un Vari-Mix para permitir la unión del anticuerpo con la proteína objetivo HSP90 (SC-13119). Después de la incubación, se añadieron 10 µL de proteína G-agarosa (SC-2003) por condición, asegurándose de que la suspensión de proteína G estuviera completamente homogénea, cambiando de punta para cada muestra para evitar la contaminación cruzada. Las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C en el Vari-Mix para asegurar una unión eficiente (anticuerpo-RE α).

Posteriormente, se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos para separar el pellet del sobrenadante. Se retiró el sobrenadante con cuidado para no llevarse el pellet y se añadió 250 µL de buffer STE 1x se compone de tres componentes clave: Sal (sodium), Tris (tris(hidroximetil)aminometano) y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), mezclando suavemente con un vórtex. Este paso se repitió con otra centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Se retiró nuevamente el sobrenadante y se repitió el lavado con 250 µL de buffer STE 1x, mezclando suavemente y centrifugando a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Tras la última centrifugación, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 40 µL de buffer Laemmli 1x. Las muestras se vortexearon suavemente para asegurar la disolución completa del pellet y se calentaron a 90 °C durante 2 minutos para la desnaturalización de las proteínas. Finalmente, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 3 minutos para eliminar cualquier posible residuo sólido de proteína G-agarosa. El sobrenadante se recuperó y se cargaron 25 µL de la muestra en un gel de electroforesis para su análisis. El resto de la muestra se conservó para su uso en un gel adicional, asegurando la disponibilidad de material para análisis futuros.

7.9. Preparación de nanoliposomas.

Para el desarrollo de nanoliposomas, se utilizó fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), disueltos en cloroformo, en un tubo de 2 mL con una relación porcentual de PC del 70 % y PE del 30 %, y otro tubo con las relaciones PC del 30% y PE del 70%, con el fin de determinar el porcentaje más estable. Una vez agregado ese porcentaje de cada condición, se llevó a cabo el secado por medio de gas nitrógeno, el cual tuvo un tiempo medio de 130 minutos. Al obtenerse los fosfolípidos precipitados en las paredes, se colocó el tubo en la vacufuga, cubriendo la tapa con un poco de parafilm y haciendo pequeños agujeros en esta, durante 1 hora a 30 °C, con el objetivo de eliminar todo posible resto de cloroformo. Cuando se observó en el tubo una pequeña película transparente, se procedió a agregar 1.7 mL de PBS 1X. Posteriormente se realizaron 3 ciclos de congelación y descongelación rápida, se hizo mediante nitrógeno líquido, cubriendo los tubos completamente con parafilm para evitar fugas. Una vez los tubos estuvieron bien cubiertos, se agregaron al nitrógeno líquido y, al observarse en estado de congelación, se pasaron a un baño maría, donde se esperó a que regresaran a su estado líquido; este paso fue de suma importancia, ya que aquí dependió que los fosfolípidos, al someterse a choques térmicos, se agruparan y facilitara su formación, al terminar cada ciclo se realizó un vortex por 1 minuto para provocar una oscilación constante y así agrupar los fosfolípidos. Estos pasos se repitieron 3 veces como se mencionó anteriormente.

Se colocaron los tubos en el sonicador, que había sido preparado con las condiciones de limpieza necesarias. Se iniciaron los ciclos de sonicación hasta que ambos tubos mostraran un líquido claro y sin perturbaciones. Esta etapa se llevó a cabo en un área fría, ya que el sonicador puede calentar la solución, lo que podría afectar negativamente la agrupación de los fosfolípidos, los ciclos consistieron en intervalos de 15 segundos de sonicación por 30 segundos de reposo, y esto se realizó durante 10 minutos, dos veces. Una vez completados los ciclos, se dejó la solución en reposo durante 1 hora a 25 °C, cubiertos con papel

aluminio. Pasada la hora, se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm. Al finalizar la centrifugación, se pasó a una campana de flujo laminar, ya que los pasos siguientes debieron realizarse en condiciones estériles. Cuando se obtuvo el centrifugado, se observó un pequeño pellet al fondo del tubo, del cual se tomó la muestra con una jeringa de 2 mL, la cual debía contener un filtro de 0.25 μm , y se traspasó a otro tubo (Fig. 10).

7.10. Preparación de nanoliposomas cargados con aurapteno.

Se realizaron nanoliposomas cargados con 50 μM de aurapteno utilizando la solución de fosfolípidos más acorde a los parámetros permitidos. Luego, se llevó a cabo la misma metodología, pero ahora con los nanoliposomas cargados con aurapteno a 50 μM .

7.11. Caracterización de nanoliposomas.

Para la lectura del tamaño de la población de nanoliposomas, que debía estar entre 60 nm y 100 nm, se colocó en el equipo NANOTRAC Wave II / Zeta, tras ser lavado con etanol y colocar un blanco que consistió en PBS 1X. Cuando el láser (780 nm) incidió sobre la solución de nanoliposomas, se produjo una dispersión que dependía de la medida de los nanoliposomas. Con la técnica de análisis del espectro de frecuencias, se comparó la luz dispersada respecto al haz incidente con el propio haz dispersado. La luz dispersada sufrió un desplazamiento de la frecuencia original (efecto Doppler), que dependió de la velocidad de las partículas. La diferencia de frecuencia fue detectada mediante el cambio producido sobre el haz original al interactuar con la luz dispersada. Del tratamiento matemático de los datos intensidad-tiempo, se obtuvo la intensidad-frecuencia. La representación de este par de datos dio como resultado una curva de carácter similar cuando todas las moléculas fueron del mismo tamaño. Cuando hubo una suma de poblaciones de diferentes medidas, se obtuvo una curva compleja. El equipo realizó estos parámetros y comparaciones para arrojar una curva final que

mostró los porcentajes de medidas de los nanoliposomas. Para la caracterización de los nanoliposomas, se empleó la dispersión de luz dinámica (DLS) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). En el análisis por DLS, se prepararon soluciones diluidas de los nanoliposomas en PBS 1X. Se midió su tamaño y distribución de tamaño de partículas utilizando un equipo NANOTRAC Wave II / Zeta, tras lavar el equipo con etanol y colocar un blanco de PBS 1X. Cuando el láser (780 nm) incidió sobre la solución, la dispersión de la luz permitió determinar el tamaño de los nanoliposomas. La técnica analizó el espectro de frecuencias para comparar la luz dispersada con el haz incidente, detectando el efecto Doppler y la velocidad de las partículas para generar una curva que representó la distribución de tamaños de las partículas. En cuanto a TEM, se utilizaron rejillas Ultrathin C film on holey carbon support film, 400 mesh, Cu, que proporcionan un soporte óptimo para la visualización de muestras biológicas. Estas rejillas están diseñadas con un recubrimiento de carbono delgado que permite una excelente transmisión de electrones, lo que facilita la observación de detalles finos en la morfología y distribución de los nanoliposomas. Se depositaron gotas de la solución de nanoliposomas sobre estas rejillas para examinar su morfología con alta resolución utilizando un microscopio electrónico JEOL. Este microscopio es un equipo de alta precisión que utiliza un haz de electrones para obtener imágenes de muestras con resolución nanométrica. Gracias a su fuente de electrones y lentes electromagnéticas, puede alcanzar resoluciones superiores a 1 nm, permitiendo el estudio detallado de la morfología y distribución de partículas a nivel subcelular. Equipado con cámaras para modos de transmisión (TEM) y barrido (SEM), este microscopio es esencial en investigaciones de biología y nanotecnología, ofreciendo análisis de imágenes avanzados y mediciones precisas de las características morfológicas de las muestras.

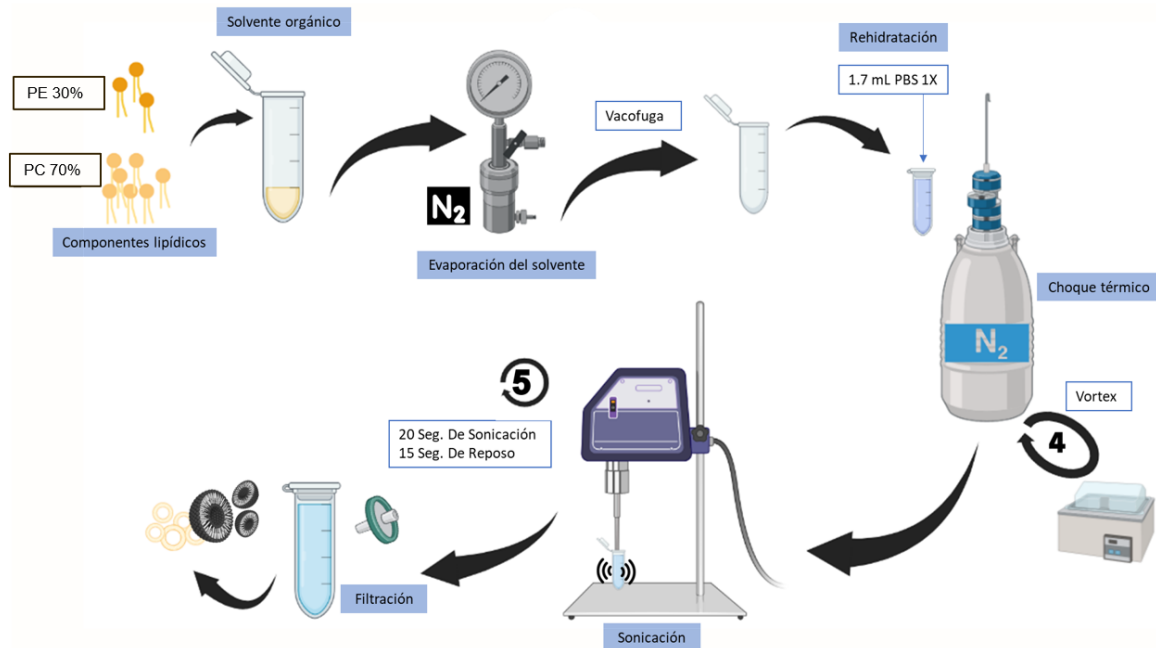


Fig 10. Metodología para la realización de nanoliposomas. Se presenta la metodología en diagrama para la realización de nanoliposomas con concentraciones de fosfatidilcolina 70% y fosfatidil etanolamina 30% (Autoría propia creada en biorender.com).

7.12. Análisis estadístico.

En los experimentos, se utilizará la prueba ANOVA para evaluar la significancia estadística de los resultados. Se considerará significativo un valor p de 0.05. El análisis de la expresión de proteínas bajo los diferentes tratamientos se realizará de manera semicuantitativa, evaluando la intensidad de las bandas y utilizando GAPDH como control de carga. Todos los datos se procesarán mediante el software GraphPad Prism 8, lo que permitirá realizar comparaciones entre los grupos de forma efectiva.

7. 13. Aspectos éticos y de bioseguridad.

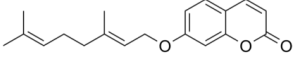
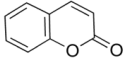
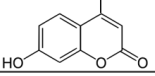
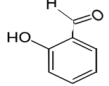
El manejo y disposición de residuos peligrosos biológico-infecciosos será de acuerdo Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

8. Resultados.

8.1. Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de las moléculas 2-hidroxi-6-metoxi benzaldeído, aurapteno, cumarina y 4-metilumbeliferona.

En la primera etapa se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de las diferentes moléculas en la línea celular MCF-7, la cual es un modelo celular ampliamente utilizado en cáncer de mama RE+. Para esta metodología, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular utilizando la técnica de MTT, las concentraciones a las cuales se reduce la viabilidad celular a un 50 % (CI₅₀) fueron calculadas utilizando GraphPad Prism 8. El CI₅₀ obtenido para aurapteno fue de $50.79 \pm 9.3 \mu\text{M}$, para la cumarina $91.86 \pm 29.8 \mu\text{M}$, 4-metilumbeliferona $73.21 \pm 8.2 \mu\text{M}$ y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldeído $64.02 \pm 4 \mu\text{M}$. (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias 50 de las moléculas y su estructura química.

<i>Moléculas</i>	<i>CI₅₀ (μM) ± D. E. (n =3, ensayos biológicos)</i>	<i>Estructura química</i>
➤ Aurapteno	50.79 ± 9.3	
● Cumarina	91.86 ± 29.8	
■ 4-metilumbeliferona	73.21 ± 8.2	
➤ 2-hidroxi-6-metoxi benzaldeído	64.02 ± 4.12	

Al observar el gráfico dosis-respuesta (Fig. 11), se obtuvo una disminución significativa de la viabilidad celular bajo el tratamiento con aurapteno, donde se percibió la reducción de la viabilidad a partir de la dosis de $5 \mu\text{M}$, efecto que no se observó en las otras moléculas. Esto indica que el aurapteno ejerce un efecto notablemente más potente sobre la línea celular REα en comparación con la

cumarina, lo que podría atribuirse a su radical prenilado. Este radical, conocido por su capacidad para mejorar la lipofilicidad y facilitar la interacción con membranas celulares, también ha mostrado propiedades que pueden alterar la dinámica celular (Akasaka et al. 2023). La presencia del radical prenilado permite que el aurapteno actúe de manera más eficaz en la modulación de la viabilidad celular, induciendo una reducción significativa a dosis tan bajas como 5 μM . Este efecto no se observa con la cumarina, sugiriendo que el aurapteno es más eficaz en contextos relacionados con el cáncer.

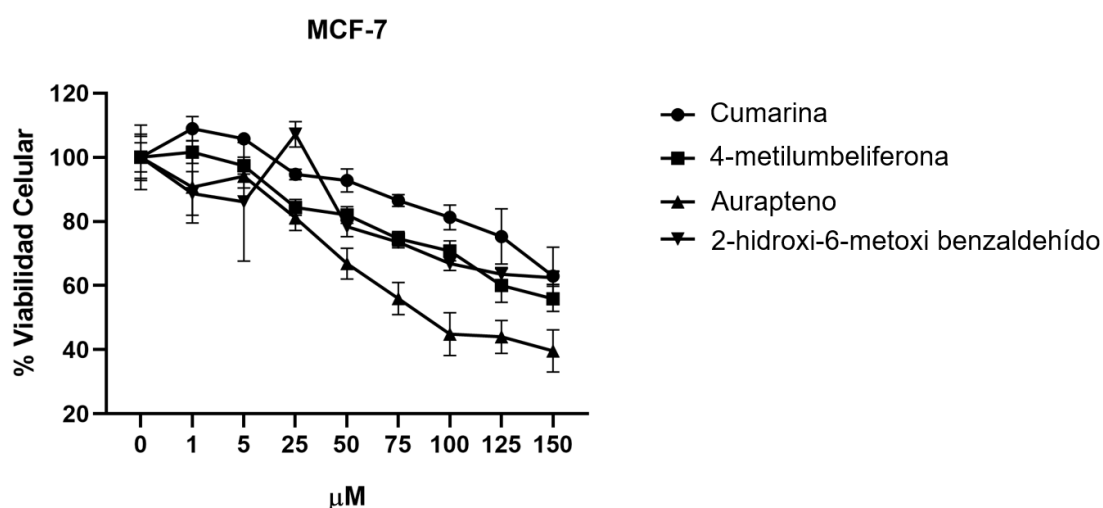


Fig 11. Efecto del tratamiento de las moléculas sobre la viabilidad celular en células MCF-7. Se muestra la gráfica donde se determina el CI_{50} de cada molécula, cumarina, 4 metil umbeliferona, aurapteno y 2 hidroxi 6-metoxi benzaldeido, las cuales se utilizaron en una concentración creciente de 0-150 μM y en un tiempo de 24 horas.

8.2. El tratamiento con aurapteno induce cambios en la morfología celular del modelo de estudio, (células MCF-7).

Como parte de la caracterización, se llevó a cabo el seguimiento del efecto de las moléculas a través de microscopía óptica (microscopio óptico invertido Vistavisión). Bajo las condiciones experimentales de 50 μM , se realizó este procedimiento experimental mencionado en el apartado de metodología, seleccionando esta concentración ya que era cercana a la CI_{50} del aurapteno.

La morfología de las células MCF-7 (RE α) comenzó a modificarse bajo el tratamiento con aurapteno; se observó que las células eran más pequeñas y habían perdido su morfología típica, adoptando un cambio más redondeado. En comparación con el control, la densidad de la confluencia celular fue menor a partir del tratamiento con 50 μ M de aurapteno después de 24 horas (Fig. 12 A). En general, el tamaño de las células disminuyó y mostraron una morfología redondeada, además de aglomerarse en forma de racimos opacos en comparación con las células del control. Las células tratadas con cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído presentaron una morfología muy similar a la del control (Fig. 12 C, D, E), aunque con algunos cambios en ciertas áreas, mostrando células redondeadas.

De forma complementaria, se utilizó el fármaco fulvestrant como control positivo (Fig. 12 F). Cabe mencionar que el fulvestrant actúa uniéndose a los receptores de estrógeno, bloqueándolos y promoviendo su degradación. Este mecanismo resulta en un bloqueo completo de la señalización de estrógeno a través de dichos receptores en el organismo, por lo tanto, el fulvestrant actúa como un antagonista completo del RE (Nathan & Schmid, 2017). Se observó que la morfología cambiaba a células redondeadas (Fig. 12 F) y se notó una menor población de estas, muy similar al tratamiento con aurapteno.

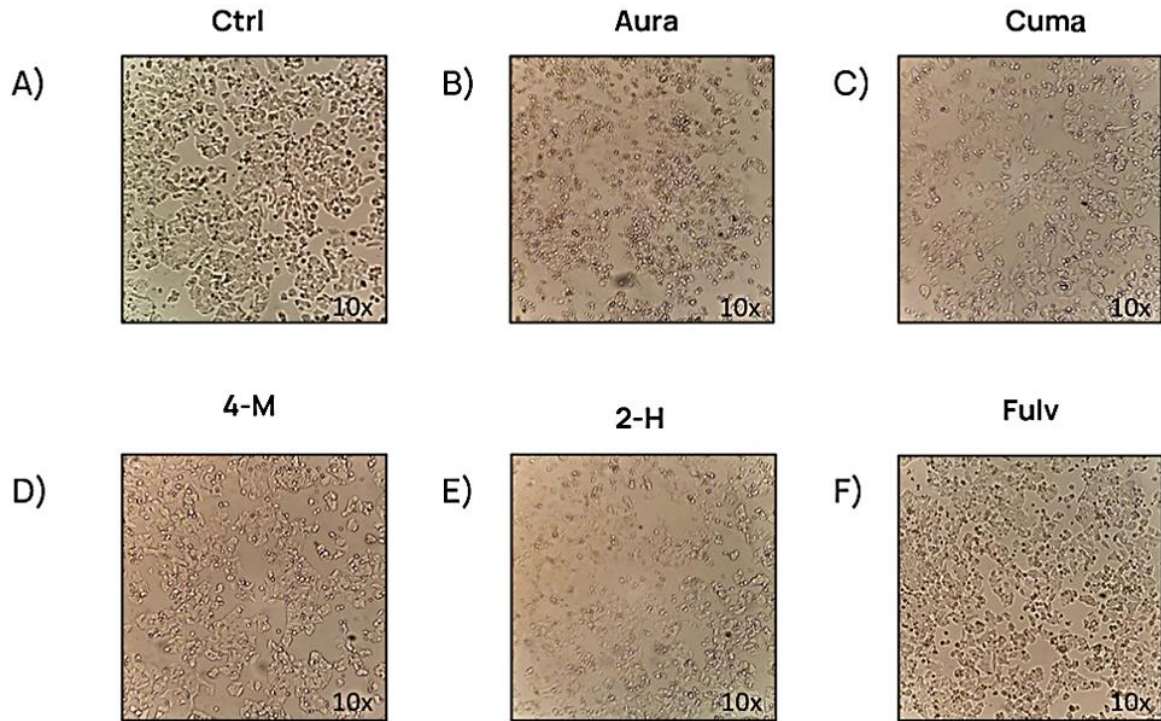


Fig 12. Morfología celular mediante los diferentes tratamientos en microscopio. Se observa como la morfología cambia en condiciones como lo es en A) control (Ctrl), y en los tratamientos de B) aurapteno (Aura), C) Cumarina (Cuma), D) 4 metil umbeliferona(4-M), E) 2-hidroxi 6-metoxi benzaldehido(2H) y F) fulvestrant (Fulv), mediante las condiciones de una concentración de 50 μM y en un tiempo de 12 horas.

8.3. El tratamiento con aurapteno es un inductor de apoptosis en las células MCF-7.

La apoptosis en células es un proceso por el cual las células detiene sus funciones, y ésta se puede dar por múltiples factores donde la integridad estructural de las células se ve afectada. La apoptosis en células tumorales es el principal mecanismo de acción de los fármacos. La proteína BAX, de la familia BCL-2, se transloca a las mitocondrias, abriendo poros en su superficie y colapsando el potencial transmembrana. Esto permite que solutos citosólicos ingresen a las mitocondrias, aumentando su volumen y provocando la ruptura de la membrana externa, lo que libera el citocromo C al citoplasma y desencadena la muerte celular (Liu et al., 2024).

De manera que es importante conocer los factores y el por qué se da la muerte celular, como también en qué tipo de muerte celular se encuentra la célula tumoral, esto se puede determinar mediante el ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio. Mediante los tratamientos evaluados, se observó el daño celular que genera el aurapteno a 50 μ M durante 24 horas en la línea celular MCF-7, un modelo para el cáncer de mama RE+. Se utilizó PBS como control para comparar la viabilidad celular entre las células tratadas y las no tratadas. Los resultados indicaron que el aurapteno induce un efecto citotóxico significativo, sugiriendo su potencial como agente terapéutico al interferir en procesos celulares esenciales y contribuir a la muerte celular programada.

Como se explica en la metodología cada uno de los cuadrantes representa un tipo de muerte celular (Q1, Q2 y Q3) o también las células que se encuentran viables (Q4). Se puede observar que las células tratadas con aurapteno presentan una tendencia a mayor muerte celular por apoptosis tardía (Q2) con un porcentaje de 38.97% como también apoptosis (Q3) con un porcentaje de 29.31% (Fig 13 B), en ese sentido, la cantidad de células viables (Q4) al colocar aurapteno es menor con un porcentaje de 29.76%, por lo que existe un claro efecto de muerte celular por apoptosis temprana. En los otros tratamientos que son cumarina con un porcentaje de células viables de (Q4) 80.11%, 4-metilumbeliferona con un porcentaje de células viables de (Q4) 76.83% y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído con un porcentaje de células viables de (Q4) 79.62%, no se observa un cambio significativo en cuadrantes que intervengan con apoptosis y el cuadrante de células viables no cambia del todo (Fig 13 C,D,E). La gráfica de barras presenta de manera clara y concisa los resultados de los diferentes tratamientos, mostrando el porcentaje de apoptosis tardía y apoptosis. Cada barra representa la proporción de células en estos cuadrantes, facilitando la comparación visual entre los efectos del aurapteno y las otras moléculas evaluadas. Se observa que las células tratadas con aurapteno muestran un aumento notable en ambos tipos de apoptosis, lo que indica un efecto citotóxico significativo. Esta representación

gráfica resalta el impacto del aurapteno en la inducción de muerte celular, subrayando su potencial en estudios posteriores (Fig. 13F).

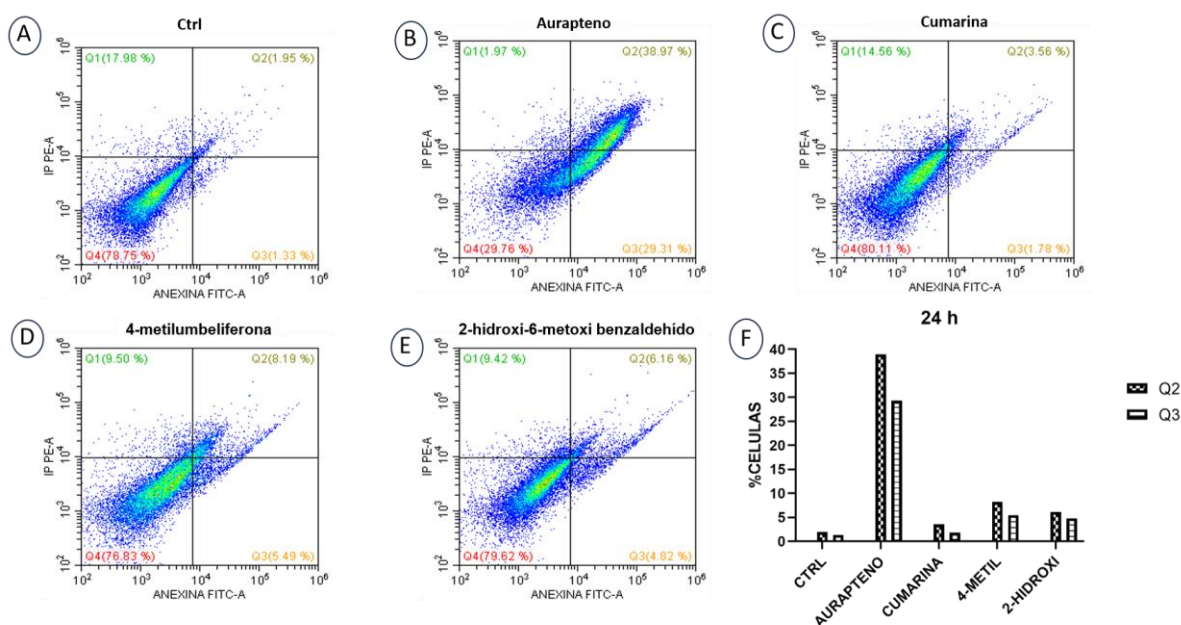


Fig 13. Gráfica obtenida mediante el ensayo de AnexinaV-FITC y yoduro de propidio. A) Se probó un control con PBS, y las diferentes moléculas B) Aurapteno, C) Cumarina, D) 4-metil umbeliferon y E) 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehido, mediante el ensayo para caracterizar apoptosis. F) Se graficaron los cuadrantes 2 y 3, las condiciones fueron una concentración de 50 μ M y en un tiempo de 24 horas.

8.4. Ensayo de formación de colonias.

Para fortalecer lo observado en los ensayos previos, se optó por realizar el ensayo de formación de colonias, que evalúa la capacidad de las células para sufrir divisiones "ilimitadas" y formar colonias. En nuestros resultados, se evidenció una notable reducción en la formación de colonias en los tratamientos con aurapteno. Este efecto fue consistente con lo que se observó en los tratamientos de control positivo con fulvestrant, un conocido inhibidor del receptor de estrógeno.

El ensayo se llevó a cabo durante 11 días, administrando dosis de 50 μ M de cada una de las condiciones cada tres días. Como se ilustra en la figura 14, la formación de colonias fue limitada, lo que se refleja también en la gráfica, donde se observa una disminución significativa en la cantidad de colonias formadas (Fig. 14). Estos resultados corroboran los hallazgos de los ensayos de MTT y Anexina

V-FITC, que indican que el tratamiento con aurapteno no solo afecta la viabilidad celular, sino que también interfiere con la capacidad de las células para entrar en apoptosis.

Además del aurapteno, se probaron otras moléculas, como cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído. A diferencia del aurapteno, ninguno de estos tratamientos mostró una reducción significativa en la formación de colonias, lo que sugiere que el mecanismo de acción del aurapteno podría estar relacionado con la inhibición de vías específicas de señalización celular cruciales para la proliferación. Aunque fulvestrant mostró una actividad muy similar a la del aurapteno, su efecto no fue tan pronunciado. Las otras moléculas, como la cumarina y la 4-metilumbeliferona, han demostrado propiedades biológicas interesantes, pero en este ensayo no resultaron eficaces para limitar la formación de colonias. Por su parte, el 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, aunque es conocido por su potencial biológico, tampoco mostró un impacto significativo en la capacidad proliferativa de las células (Fig. 14).

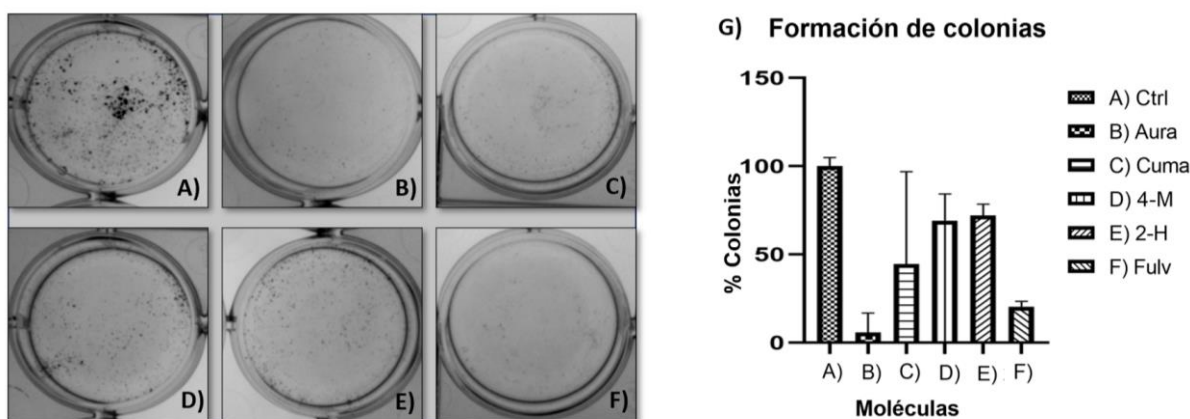


Fig 14. Ensayo de formación de colonias. En un ensayo con un A) control inicial y una concentración creciente de 0-150 μM en un tiempo de 24 horas, se observan las colonias formadas por células tratadas con diferentes moléculas: B) aurapteno, C) cumarina, D) 4-metilumbeliferona, E) 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído y F) fulvestrant. G) La gráfica representa el porcentaje de formación de colonias en comparación con el control, mostrando una notable reducción en los tratamientos con aurapteno y fulvestrant, mientras que las otras moléculas no presentan un impacto significativo en la formación de colonias.

8.5. Expresión de proteínas blancas que se regulan por la cumarina y sus derivados en el fenómeno de apoptosis.

Se desarrolló la técnica de Western blot para determinar la expresión de proteínas involucradas en la apoptosis (Bax, caspasa 8 y COX) y en su inhibición (Bcl-2 y XIAP), utilizando GAPDH como control de carga. Uno de los principales objetivos de las terapias contra el cáncer es la regulación de la apoptosis, ya que la disfunción en este proceso es una de las causas clave de la ineficacia de las terapias actuales. Se ha reportado que proteínas como Bcl-2 y XIAP, que son inhibidores de la apoptosis, juegan un papel importante en este contexto. La expresión de Bcl-2 y XIAP se redujo en células tratadas con aurapteno, al igual que en las tratadas con cumarina (Fig. 15 A, C), aunque esta reducción no fue significativa en ninguno de los dos casos. A pesar de ello, la disminución de las proteínas antiapoptóticas en respuesta al tratamiento con aurapteno sugiere que este compuesto podría estar promoviendo la apoptosis en células de cáncer de mama RE+, lo cual se alinea con los datos de viabilidad celular obtenidos en el ensayo de MTT (Tabla 1). Al reducir la expresión de Bcl-2 y XIAP, el aurapteno parece desestabilizar el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular, favoreciendo así la eliminación de las células RE+. Dado que la reducción en la expresión de Bcl-2 y XIAP no fue significativa en los tratamientos con aurapteno ni con cumarina, se sugiere reconsiderar su potencial terapéutico en este contexto.

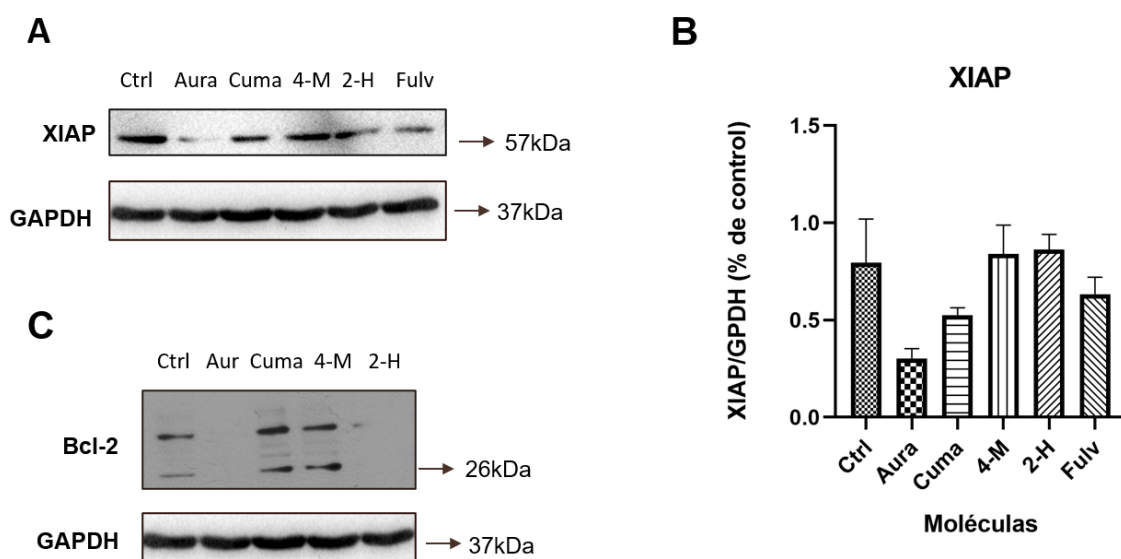


Fig 15. Determinación de la expresión de proteínas anti-apoptóticas. A) Determinación de la expresión de la proteína antiapoptótica XIAP y su control de carga GAPDH bajo la influencia de diferentes tratamientos, con las diferentes moléculas a evaluar B) Gráfica normalizada de XIAP con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$. Gráfica generada con GraphPad Prism 8. C) Determinación de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y su control de carga GAPDH bajo la influencia de diferentes tratamientos, con las diferentes moléculas a evaluar.

Además, los resultados indican que el efecto del aurapteno en la regulación de estas proteínas podría ser parte de un mecanismo de acción más amplio que involucra la modulación de vías de señalización asociadas a la proliferación y la apoptosis.

El estrés citotóxico en la célula puede inducir la apoptosis, un proceso que depende de la proteína Bax. La activación de Bax facilita la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME), lo que, a su vez, desencadena la cascada de caspasas. Tras el tratamiento con aurapteno, se observó un aumento en la expresión de Bax (Fig. 16 A), lo que, aunque no fue significativo, sugiere que el aurapteno podría estar activando una vía apoptótica dependiente de esta proteína.

Por otro lado, las proteínas COX y caspasa 8 no mostraron cambios significativos en su expresión entre los diferentes tratamientos (Fig. 16 C). COX, involucrada en la producción de prostaglandinas y en procesos de inflamación y crecimiento tumoral, no mostró variaciones que sugirieran modulación por parte del aurapteno. De manera similar, la caspasa 8, clave en la vía de apoptosis mediada por receptores, mantuvo niveles estables, lo que indica que el aurapteno no activa directamente esta vía. Estos resultados resaltan la especificidad del efecto del aurapteno sobre la vía dependiente de Bax, en contraste con las vías asociadas a COX y caspasa 8.

En conclusión, el tratamiento con aurapteno sugiere que reduce los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y XIAP, lo que podría promover la apoptosis al desestabilizar el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular. Además, se observó un aumento en la expresión de Bax, lo que indica que el mecanismo de acción del aurapteno está relacionado con vías apoptóticas dependientes de esta proteína. Sin embargo, las proteínas COX y caspasa 8 no mostraron cambios en su expresión, lo que sugiere que el aurapteno actúa de manera específica sin involucrar estas vías. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el aurapteno induce apoptosis en células RE+, destacando la importancia de explorar su interacción con el receptor de estrógeno α (RE α) mediante técnicas de docking

molecular. Esta aproximación permitirá comprender mejor cómo el aurapteno podría modular las vías de señalización asociadas al RE α , abriendo nuevas líneas de investigación sobre mecanismos alternativos relevantes para la terapia del cáncer.

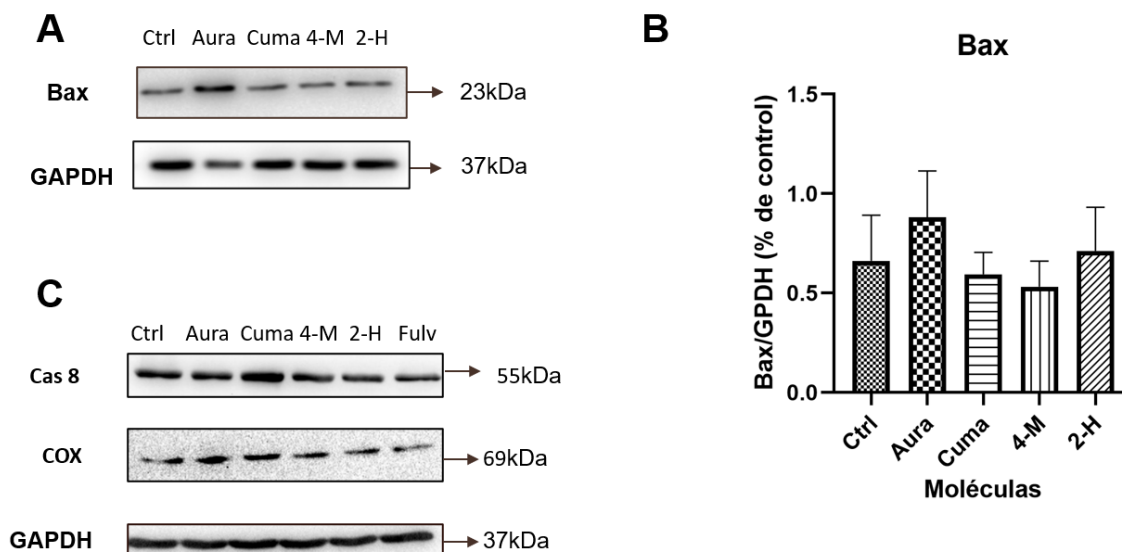
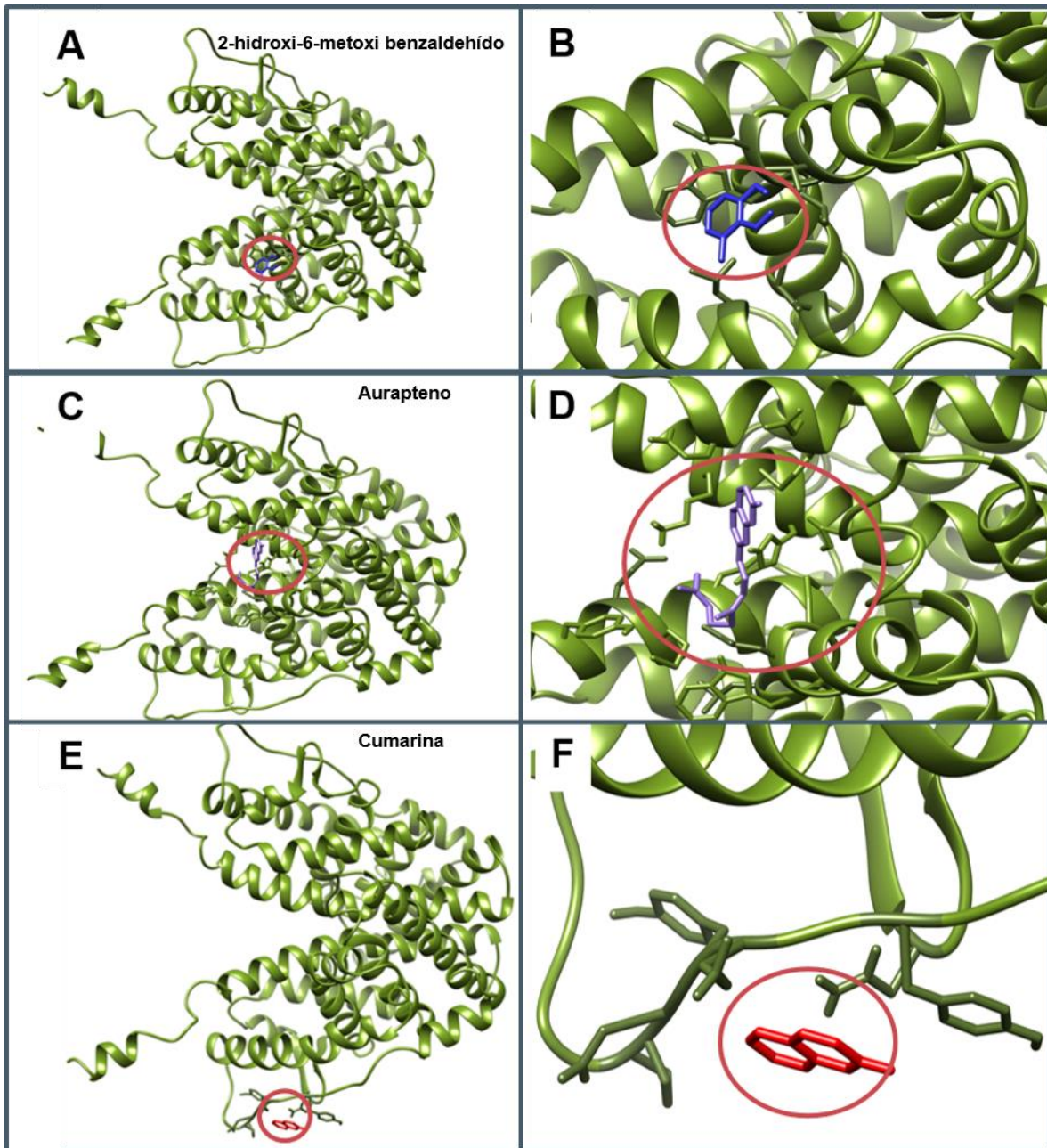


Fig 16. Determinación de la expresión de proteínas pro- apoptóticas. A) Determinación de la expresión de la proteína proapoptótica Bax y su control de carga GAPDH bajo la influencia de diferentes tratamientos, con las diferentes moléculas a evaluar B) Gráfica normalizada de Bax con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$. Gráfica generada con GraphPad Prism C) Determinación de la expresión proteínas involucradas en la cascada de señalización de la vía apoptótica, como lo son cox y caspasa 8 (cas 8) con su control de carga correspondiente GAPDH bajo la influencia de diferentes tratamientos, con las diferentes moléculas a evaluar.

8.6. Interacción de moléculas 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, aurapteno, cumarina y 4-metilumbelifeorna sobre el RE α .

Para predecir y obtener la afinidad de unión y el modo interactivo entre el ligando y el receptor se caracterizaron a través de herramientas *in silico* las interacciones de las diferentes moléculas 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, aurapteno, Cumarina y 4-metilumbelifeorna con el receptor RE α . En este caso se utilizó una estructura cristalográfica obtenido del Protein Data Bank (PDB), la cual contienen el código 1A52. Mediante el uso del software MOE se realizó el ensayo de docking molecular. Como primer paso y ya antes mencionado en la metodología, se evaluó al RE α con las diferentes moléculas (Fig. 17) y se obtuvieron sus valores de

afinidad (Tabla 2). Los resultados indican que el aurapteno presenta una afinidad notable hacia el receptor de estrógeno ($RE\alpha$), con un valor de E-score de -9.1200, lo que lo posiciona por encima de otras moléculas analizadas. En comparación, el estradiol, que es el sustrato principal de este receptor, muestra un E-score de -7.2290. Esta diferencia en los valores de score resalta la capacidad del aurapteno para interactuar de manera más efectiva con el $RE\alpha$. El E-score en docking molecular es un valor cuantitativo que mide la afinidad de unión entre un ligando y un receptor, considerando interacciones como las electrostáticas, los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas. Un E-score más negativo sugiere una mayor afinidad, lo que implica que el aurapteno tiene un potencial significativo para unirse al receptor. Específicamente, se identificaron un total de 14 interacciones entre el aurapteno y el receptor, de las cuales dos se producen en los residuos GLU423 y LYS520, compartiendo estas posiciones con el fármaco fulvestrant (tabla 2). Todas estas interacciones se localizan en el dominio LBD (ligand-binding domain), que es el área específica donde se une el ligando natural. Utilizamos umbeliprenina (Fig. 17 I, J) en nuestro estudio de docking molecular debido a su estructura química, que es similar a la del aurapteno, aunque presenta un radical más grande. Esta diferencia nos permitió investigar si el tamaño del radical afecta la funcionalidad y la afinidad de unión al receptor de estrógeno alfa ($RE\alpha$). El análisis reveló un valor de E-score de -8.1289 y un total de ocho interacciones. Al comparar estas interacciones con las de otras moléculas, como el aurapteno, observamos que la umbeliprenina resultó en un E-score menor y menos interacciones. Estos hallazgos sugieren que el radical del aurapteno es crucial para su actividad, ya que la umbeliprenina no mostró resultados equivalentes. Esto indica que la estructura del aurapteno es clave en el estudio de la modulación del $RE\alpha$, lo que podría tener implicaciones significativas en terapias dirigidas.



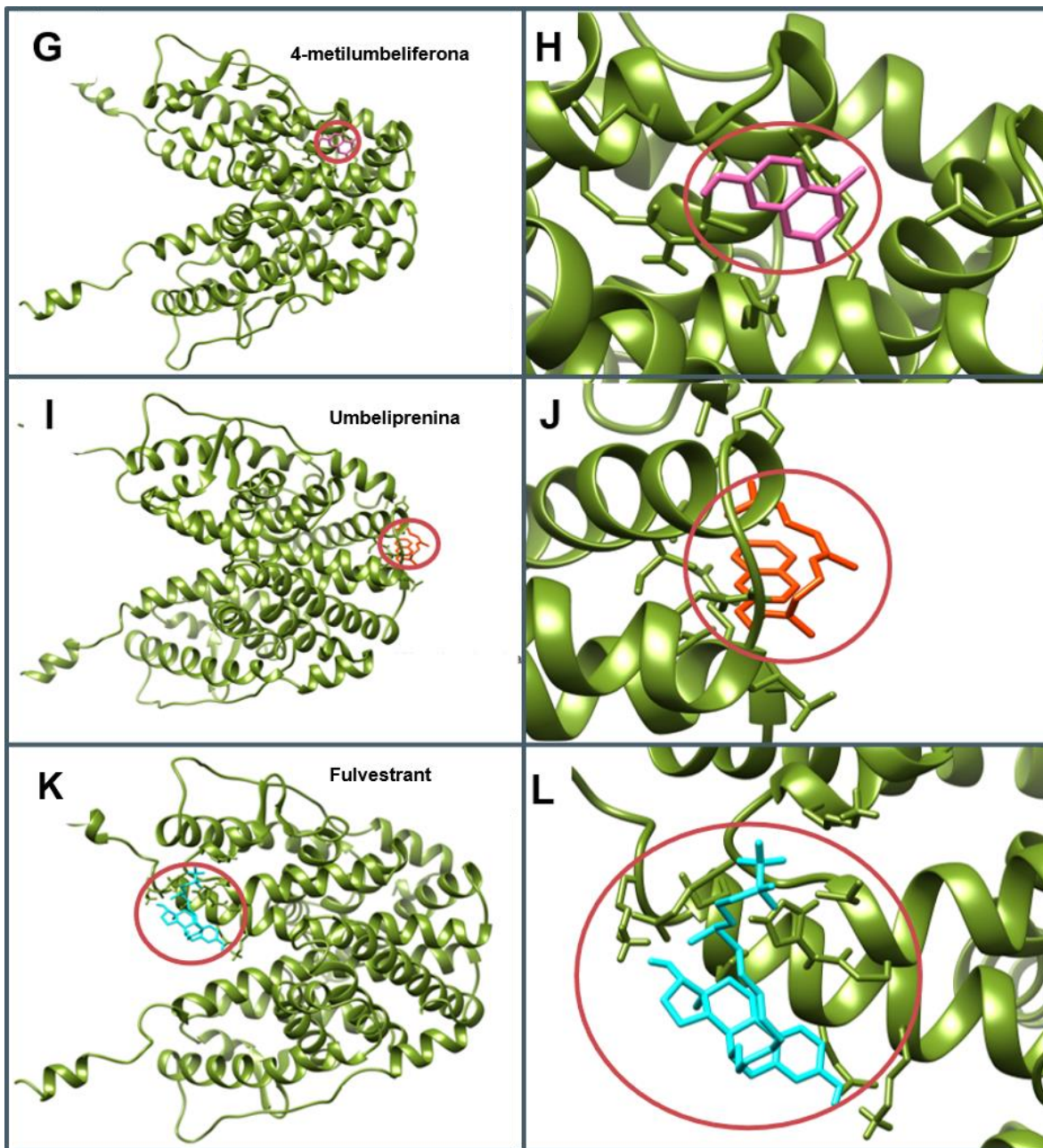


Fig 17. Docking del cristal 1A 52 obtenido de Protein Data Bank vs Moléculas derivadas de la cumarina. Se muestra el acoplamiento molecular de las diferentes moléculas a tratar A) Se observa la localización de la molécula 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído. B) Se observa un acercamiento de la molécula 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído con sus residuos. C) Se observa la localización de la aurapteno. D) Se observa un acercamiento de la molécula aurapteno con sus residuos. E) Se observa la localización de la cumarina. F) Se observa un acercamiento de la molécula cumarina con sus residuos. G) Se observa la localización de la 4-metilumbelifeorna. H) Se observa un acercamiento de la molécula 4-metilumbelifeorno con sus residuos. I) Se observa la localización de la umbeliprenina. J) Se observa un acercamiento de la molécula umbeliprenina con sus residuos. K) Se observa la localización de la fulvestrant. L) Se observa un acercamiento de la molécula fulvestrant con sus residuos.

Tabla 2. Afinidad e interacciones de las moléculas con el cristal 1A 52

Moléculas	Valor de afinidad con el cristal 1A52	Interacciones con los residuos de RE α
Aurapteno	-9.1200	ASP426; GLU423 ; MET427; LYS520 ; HIS516; THR460; ASN519; GLU523; CYS381; TYR526; MET522; GLU380; LEU384; TRP383;
Umbeliprenina	-8.1289	ALA312; ASP484; HIS488; ALA491; LEU497; GLN498; GLN500; HIS501
Fulvestrant	-8.0655	LYS520 ; VAL422; GLU423 ; HIS524; SER527; MET528; LYS531
4- metilumbeliferona	-7.4478	MET437; MET438; ARG503; LEU495; ARG434; GLN506;
Estradiol	-7.2290	G434; MET437; MET438; ASP473 LEU495; GLN499; GLU502; ARG503; GLN506
2-hidroxi-6 metoxi benzaldeido	-6.1863	LEU354; GLU380; LEU379; VAL376; TRP383; ILE358
Cumarina	-6.3782	TYR331; GLU330; ASN407; ASP332; PRO333; TYR328;

8.7. Expresión de proteínas blancos referente a la actividad y regulación del RE α tratadas con cumarina y sus derivados.

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína nuclear que regula las respuestas celulares a los estrógenos, siendo RE α y RE β las principales isoformas. Funciona como factor de transcripción al unirse al ADN en elementos de respuesta a estrógenos (ERE), lo que influye en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Su disfunción está asociada con enfermedades como el cáncer de mama, lo que resalta su importancia como objetivo terapéutico y biomarcador en la investigación clínica. En el gel de Western blot se observó una banda de aproximadamente 55 kDa, correspondiente al peso molecular esperado del

receptor de estrógeno. La intensidad de esta banda fue menor en el grupo tratado con aurapteno en comparación con el grupo de control, al igual que con las moléculas cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído; sin embargo, aurapteno mostró una reducción más pronunciada (Fig. 18B). Como control positivo se decidió utilizar fulvestrant, ya que este tiene la capacidad de degradar el receptor. La reducción significativa en la banda con aurapteno indica una posible reducción de la activación de la vía de señalización mediada por estrógenos. Este hallazgo es consistente con estudios previos que han demostrado el papel del receptor de estrógeno en la proliferación y supervivencia celular en el cáncer de mama.

En algunos contextos, c-Jun ejerce su influencia como un cofactor del receptor de estrógenos, amplificando su capacidad transcripcional en genes específicos. Este fenómeno se ilustra mediante la formación de un complejo entre c-Jun y el receptor de estrógenos, que se une a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN, regulando así la expresión de genes asociados con la proliferación celular. Al examinar la expresión en el gel, se puede apreciar un aumento en la presencia de c-Jun en comparación con moléculas como cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído (Fig. 18C). Aunque estas moléculas muestran patrones de expresión similares entre sí, la expresión de c-Jun parece disminuir notablemente en el control del gel. Este patrón sugiere que, bajo ciertas condiciones, la sobreexpresión de c-Jun podría estar asociada con una respuesta celular que apunta hacia la apoptosis.

Además, se observa que el receptor de estrógenos se encuentra a la baja, lo que puede explicar por qué c-Jun actúa solo en la inducción de la apoptosis y no en conjunto para la proliferación con el receptor de estrógenos. Cuando la expresión del receptor es reducida, c-Jun puede dejar de funcionar como cofactor y, en su lugar, activar programas celulares que favorecen la muerte celular. Esta interacción específica entre c-Jun y el receptor de estrógenos (Qi et al, 2004), puede variar según las condiciones experimentales, sugiriendo un papel dual de c-

Jun que, dependiendo del contexto, puede favorecer tanto la supervivencia como la muerte celular.

Un hallazgo importante fue el aumento en la expresión de GPR30 (Fig. 18E), que, aunque no alcanzó significancia estadística, fue notablemente más alto en comparación con el grupo de control y el tratamiento con fulvestrant. Este incremento sugiere que el tratamiento con aurapteno podría influir en la expresión del receptor de estrógenos (RE), así como en la activación de vías de señalización esenciales para la regulación del crecimiento celular y la apoptosis.

Por otro lado, la HSP90 (Heat Shock Protein 90), que es fundamental para la estabilidad y funcionalidad del receptor de estrógeno, también muestra una reducción significativa en su expresión tras el tratamiento con aurapteno (Fig. 18F). La HSP90 ayuda en el correcto plegamiento y la maduración del RE, facilitando su interacción con los estrógenos y su posterior activación como factor de transcripción. Adicionalmente, la catepsina D, una proteasa lisosomal, se observa a la baja con el tratamiento de aurapteno (Fig 18G), lo que sugiere que la disminución en su expresión podría estar relacionada con la reducción de la actividad del receptor de estrógeno. La inhibición de HSP90, al igual que la disminución de catepsina D, puede afectar la estabilidad y actividad del RE, lo que resalta la complejidad de la regulación del receptor de estrógeno y sus implicaciones en la terapia del cáncer de mama.

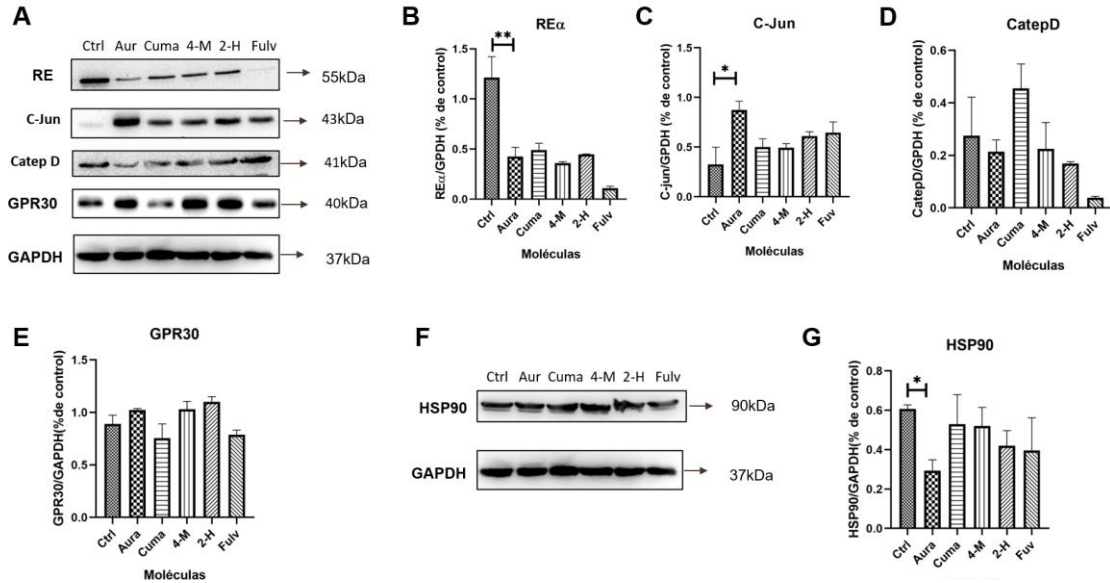


Fig 18. Determinación de la expresión de proteínas blancas por técnica de Western blot referente a REα. A) Determinación de la expresión de las proteínas receptor de estrógeno (RE), C-jun, Catep D y GPR30 con su control de carga GAPDH bajo la influencia de diferentes tratamientos, con las diferentes moléculas a evaluar. B) Gráfica normalizada de REα con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$. Gráfica generada con GraphPad Prism C) Gráfica normalizada de C-Jun con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$. Gráfica generada con GraphPad Prism D) Gráfica normalizada de Catep D con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$. Gráfica generada con GraphPad Prism. E) Gráfica normalizada de GPR30 con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$. F) Determinación de la expresión de la proteína con su control de carga GAPDH bajo la influencia de diferentes tratamientos, con las diferentes moléculas a evaluar. G) Gráfica normalizada de HSP90 con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$.

8.8. Efecto de aurapteno en la relación de HSP90 y REα.

En el contexto del estudio sobre la influencia del aurapteno en el cáncer de mama, se observó una notable reducción en la expresión de la proteína Hsp90, un chaperón molecular clave en la estabilización y función del receptor de estrógeno (RE). Esta observación se realizó mediante la técnica de inmunoprecipitación, en la que se utilizó un anticuerpo específico contra el receptor de estrógeno (RE) como anticuerpo primario. Posteriormente, se añadió un anticuerpo contra Hsp90 para detectar la interacción entre estos dos componentes en las muestras tratadas con aurapteno. Se empleó PBS como control negativo para asegurar la especificidad de la unión del anticuerpo. Los resultados mostraron que la intensidad de la banda correspondiente a Hsp90 fue significativamente menor en el grupo tratado con aurapteno en comparación con el control negativo (Fig. 19). La disminución en la intensidad de la banda de Hsp90 en presencia de aurapteno sugiere una posible disminución en la activación de la vía de señalización mediada

por estrógenos. Este resultado concuerda con investigaciones previas que han establecido el papel crucial del receptor de estrógeno en la proliferación y supervivencia celular en el cáncer de mama. La capacidad del aurapteno para reducir la expresión de Hsp90 y, potencialmente, la actividad del receptor de estrógeno subraya su potencial como agente terapéutico en el tratamiento de este tipo de cáncer. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la modulación de la vía de señalización estrógeno-dependiente puede ser una estrategia efectiva en la lucha contra el cáncer de mama, destacando el aurapteno como un compuesto prometedor para investigaciones futuras y aplicaciones clínicas.

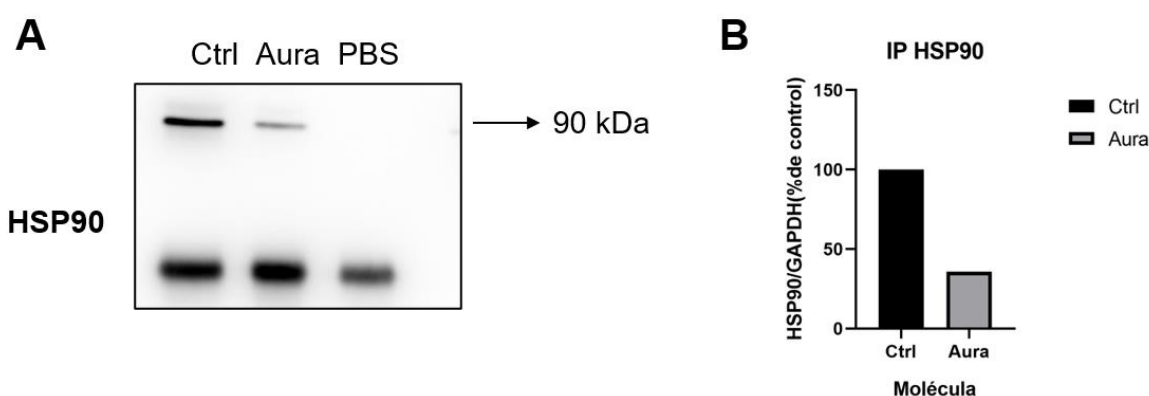


Fig 19. Determinación de la inmunoprecipitación para la detección de Hsp90 en muestras tratadas con aurapteno. A) Se observa una reducción significativa en la intensidad de la banda correspondiente a Hsp90 en el grupo tratado con aurapteno en comparación con el control negativo (PBS). B) Grafica normalizada de la inmunoprecipitación de HSP90 con la expresión de GAPDH, *** $p < 0.001$.

8.9. Fabricación y determinación de tamaño de nanoliposomas.

Se realizó un estudio comparativo para medir el tamaño y la distribución de dos tipos de nanoliposomas preparados con diferentes proporciones de fosfatidil etanolamina y fosfatidil colina, utilizando el analizador de tamaño de partículas Nanotracs. Los nanoliposomas fueron preparados de acuerdo con los métodos descritos en la sección de metodología. Los resultados revelaron que los nanoliposomas preparados con una composición de fosfatidil etanolamina al 30% y fosfatidil colina al 70% presentaron un tamaño promedio de aproximadamente

75.80 nm, con un 95% de las partículas en este rango. Por otro lado, los nanoliposomas preparados con una composición de fosfatidil colina al 30% y fosfatidil etanolamina al 70% mostraron un tamaño promedio de alrededor de 257.90 nm, excediendo significativamente el tamaño deseado para ser considerados nanoliposomas.

La distribución de tamaño de las partículas para ambos tipos de nanoliposomas mostró una distribución estrecha y homogénea, con la mayoría de las partículas ubicadas en un rango estrecho alrededor de los valores promedio respectivos. Sin embargo, en el caso de la composición con fosfatidil colina al 30% y fosfatidil etanolamina al 70%, el tamaño excedió el rango deseado para nanoliposomas, lo que sugiere una necesidad de ajustar la proporción de los componentes lipídicos. Además, el análisis del potencial zeta mostró que los nanoliposomas con una composición de fosfatidil etanolamina al 30% y fosfatidil colina al 70% tenían un potencial zeta de 200 mV, lo que sugiere una repulsión entre las partículas y una mejor distribución (Fig. 20 A).

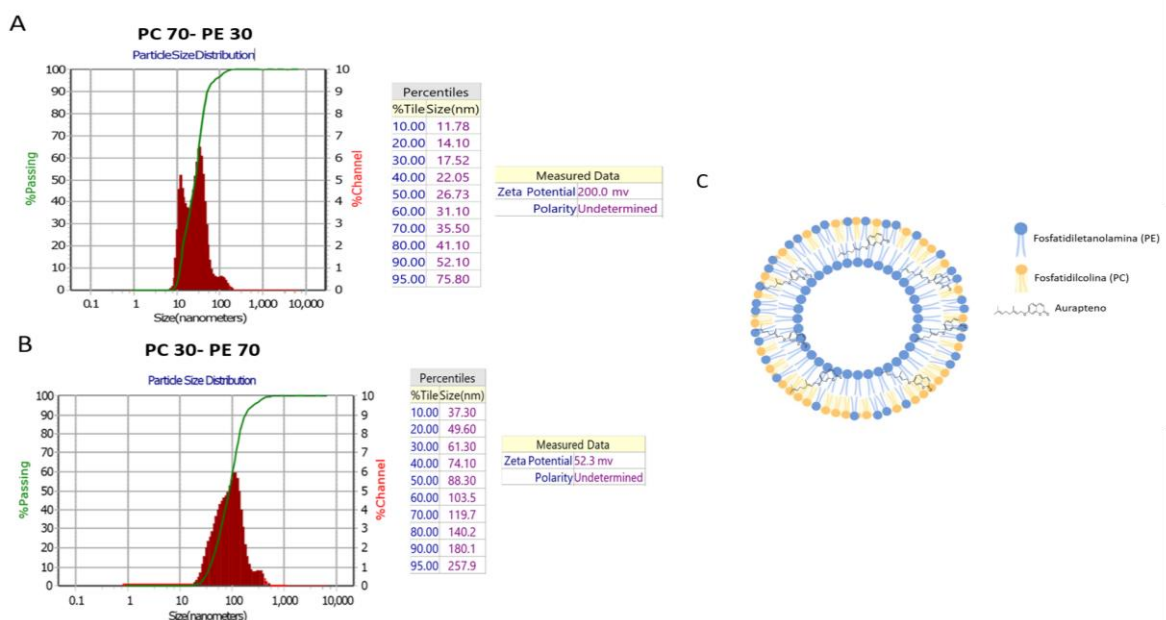


Fig 20. Determinación del tamaño de los nanoliposomas a concentraciones PC 70% - PE 30% y PC 30% - PE70%. A) Se observa la gráfica que arroja el equipo NANOTRAC Wave II / Zeta donde podemos ver los percentiles de cada tamaño que tiene nuestra población en condiciones de PC70% y PE30%. B) Se observa la gráfica que arroja el equipo NANOTRAC Wave II / Zeta donde podemos ver los percentiles de cada tamaño que tiene nuestra población en condiciones de PC30% y PE70%. C) Esquema representativo de nanoliposomas cargados con aurapteno, con condiciones del panel A.

Estos resultados resaltan las diferencias en el tamaño y la eficiencia de encapsulación entre los nanoliposomas preparados con diferentes proporciones de fosfatidil etanolamina y fosfatidil colina.

La caracterización de los nanoliposomas se realizó utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM), lo que permitió observar su morfología y estructura a nivel nanométrico. Las imágenes obtenidas revelan que los nanoliposomas presentan una forma esférica uniforme, lo cual es un indicativo de la correcta formación de la bicapa lipídica.

El análisis mostró un tamaño promedio de aproximadamente 100 nm (Fig. 21), lo que es óptimo para aplicaciones de entrega de fármacos. La distribución homogénea de los nanoliposomas en las imágenes sugiere que el proceso de fabricación fue exitoso y que se logró una formulación consistente, lo cual es esencial para garantizar una entrega eficaz y controlada del contenido en tratamientos terapéuticos.

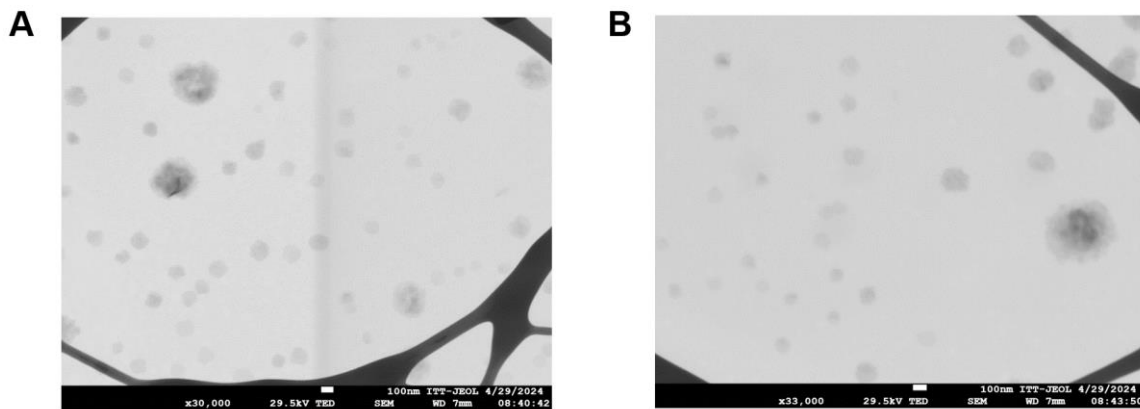


Fig 21. Caracterización estructural de los nanoliposomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). A) Muestra la morfología esférica y la disposición de la bicapa lipídica, con un tamaño promedio de aproximadamente 100 nm. B) Muestra una morfología similar en un área diferente, evidenciando características consistentes en la estructura de la bicapa lipídica.

Además, se realizó un ensayo cargando los nanoliposomas con la molécula de aurapteno y se llevó a cabo un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular. En este experimento, se observó una reducción de la viabilidad celular con una concentración del 25% de nanoliposomas cargados. El valor del CI_{50} sin nanoliposomas se estableció en $50 \mu\text{M}$, lo que indica que a esta concentración se produce una reducción del 50% en la viabilidad celular. Para estimar la carga de aurapteno en los nanoliposomas, se realizó un análisis comparativo utilizando las gráficas de viabilidad celular. Al aplicar el 25% de nanoliposomas cargados, se observó que la reducción en la viabilidad celular equivalía a la que se lograría con aproximadamente $12.5 \mu\text{M}$ de aurapteno, lo que representa la mitad del CI_{50} . Este cálculo se fundamenta en la relación entre la concentración total de aurapteno en los nanoliposomas y el efecto observado sobre la viabilidad celular. Este enfoque demostró que, aunque la concentración de aurapteno en los nanoliposomas es inferior a la del CI_{50} (Fig. 22), su formulación en nanoliposomas permite un efecto citotóxico significativo. Los resultados sugieren que los nanoliposomas tienen un gran potencial como vehículos para mejorar la entrega de aurapteno.

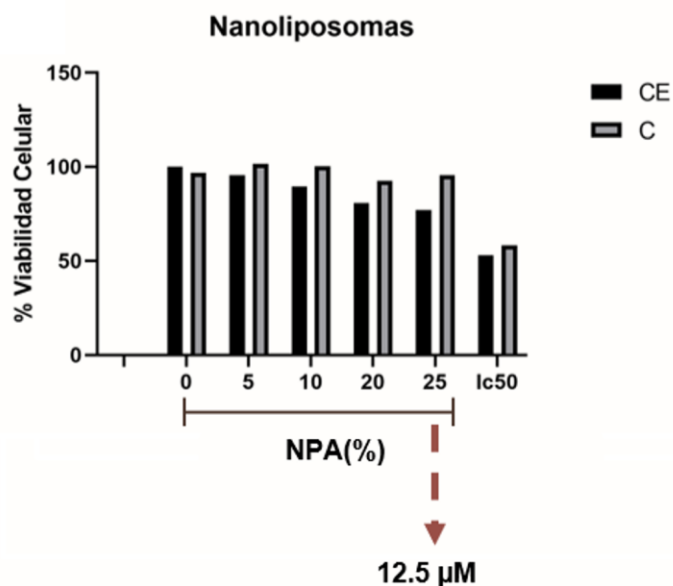


Figura 22. Efecto de los nanoliposomas cargados en la viabilidad celular. Se observó una reducción significativa en la viabilidad celular al aplicar un 25% de nanoliposomas, equivalente a aproximadamente $12.5 \mu\text{M}$ de aurapteno, la mitad del CI_{50} ($50 \mu\text{M}$). Estos resultados sugieren que los nanoliposomas son efectivos como vehículos para mejorar la entrega de aurapteno, generando un efecto citotóxico significativo.

9. Discusión de resultados.

La evaluación de la viabilidad celular es un parámetro crucial en la investigación, ya que permite determinar el efecto de diversas moléculas y calcular el valor de CI_{50} . En este estudio, se analizaron los efectos de varias moléculas, incluyendo cumarina, 4-metilumbeliferona, aurapteno y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído, sobre la viabilidad celular en la línea celular MCF-7. Los resultados indican que a medida que aumenta la concentración de estas moléculas, se observa una disminución en el porcentaje de células viables. Este efecto es especialmente notable en el caso del aurapteno, que muestra un decremento más pronunciado en la viabilidad celular en comparación con las otras moléculas analizadas. Estos hallazgos subrayan la eficacia del aurapteno como agente citotóxico en la línea celular MCF-7. Los resultados de MTT nos arrojan un CI_{50} en aurapteno de 50.79 μM ; esta cantidad es la más baja entre las moléculas y causa un efecto citotóxico más potente, comparado con cumarina 91.86 μM , 4 metil umbeliferona 73.21 μM y 2 hidroxil 6-metoxi benzaldehído 64.02 μM . Este efecto está relacionado con los cambios en la morfología de las células MCF-7, las cuales en observación microscópica las células tratadas con 50 μM de aurapteno revelan cambios significativos en su morfología en comparación con el control y los tratamientos con las otras moléculas. Las células tratadas con aurapteno mostraron una disminución en su tamaño y una morfología más redondeada, además de una menor densidad de confluencia celular, lo que sugiere un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Este cambio en la morfología es consistente con la inducción de apoptosis, ya que las células tumorales suelen exhibir alteraciones morfológicas características durante este proceso, como la pérdida de adherencia celular y la formación de racimos opacos (Saraste & Pulkki, 2000). En contraste, las células tratadas con cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído mostraron una morfología similar al control, con algunos cambios mínimos en áreas específicas, como células redondeadas. Este hallazgo sugiere que estos compuestos podrían tener efectos menos evidentes en la morfología

celular en comparación con el aurapteno. El uso del fulvestrant como control positivo proporciona una comparación relevante, ya que este fármaco actúa bloqueando los receptores de estrógeno, lo que inhibe la señalización de estrógeno y puede inducir cambios en la morfología celular similares a los observados con el aurapteno. La observación de una menor población de células y una morfología redondeada en las células tratadas con fulvestrant respalda la hipótesis de que el aurapteno puede tener un efecto similar en la inducción de apoptosis en células MCF-7 (Fig. 12 A y F). En conjunto, estos resultados microscópicos apoyan los hallazgos anteriores sobre la capacidad del aurapteno para inhibir el crecimiento celular y sugieren su potencial como agente terapéutico para el cáncer de mama. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y validar estos hallazgos antes de considerar su aplicación clínica.

El ensayo de formación de colonias es un indicador importante de la capacidad proliferativa de las células y su sensibilidad a los tratamientos farmacológicos. Los resultados obtenidos en este estudio muestran una reducción significativa en la formación de colonias en las células tratadas con aurapteno, lo cual es consistente con los hallazgos de los ensayos de viabilidad celular y apoptosis (Fig. 11, Fig. 13). Este efecto inhibitorio en la formación de colonias también se observó en el grupo de control positivo tratado con fulvestrant, lo que respalda aún más la eficacia del aurapteno en la inhibición del crecimiento celular. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que han demostrado el efecto inhibitorio del aurapteno en diferentes tipos de células cancerosas, incluidas las células de cáncer de mama, por ejemplo, un estudio de Yu et al. (2017) encontró que el aurapteno reduce la proliferación celular y promueve la apoptosis en células de cáncer de mama *in vitro*. Además, un estudio de Wang et al. (2019) mostró que el aurapteno inhibe la formación de colonias y la migración de células de cáncer de mama mediante la regulación de vías de señalización clave. Estos resultados respaldan la hipótesis de que el aurapteno ejerce efectos antitumorales significativos en las células de cáncer de mama, tanto en términos de viabilidad

celular como de capacidad para formar colonias. Sin embargo, es importante destacar que se necesitan estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y la selectividad del aurapteno hacia las células cancerosas. Además, los ensayos in vivo son necesarios para validar estos hallazgos en un entorno más relevante para el cáncer. En resumen, estos resultados sugieren que el aurapteno tiene un potencial terapéutico como agente contra el cáncer de mama y justifican futuras investigaciones en este campo.

Los resultados obtenidos indican que el aurapteno induce significativamente la apoptosis en células tumorales en comparación con otros compuestos como cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxi benzaldehído. La apoptosis es un mecanismo crucial para eliminar células anormales o dañadas en el cuerpo, y su inducción selectiva es un objetivo importante en el tratamiento del cáncer. El proceso de apoptosis inducido por aurapteno se caracteriza por una mayor proporción de células en las fases de apoptosis temprana y tardía, lo que sugiere una activación efectiva de la vía apoptótica. La translocación de la proteína BAX a las mitocondrias y la liberación del citocromo C al citoplasma son eventos clave en la cascada de señalización apoptótica, y los resultados obtenidos en este estudio indican que el aurapteno probablemente actúe sobre estas vías para inducir la apoptosis en las células tumorales (Cosentino et al., 2022). Además, el ensayo de anexinaV-FITC y yoduro de propidio proporciona una evaluación precisa de la apoptosis, permitiendo distinguir entre apoptosis temprana y tardía, lo que proporciona una comprensión más detallada de los efectos del aurapteno en las células tumorales. Estos hallazgos son prometedores y sugieren que el aurapteno podría ser un candidato potencial para el desarrollo de terapias contra el cáncer de mama. No obstante, se requieren estudios adicionales para confirmar estos resultados y profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en la inducción de la apoptosis por parte del aurapteno. Es importante destacar que, en un estudio previo (Pulido-Capiz et al. 2024), se evaluó el efecto del aurapteno en células de cáncer de mama triple negativo (TNBC) y no se observaron resultados similares, lo que indica una selectividad del aurapteno hacia

células receptoras de estrógeno positivas. Esto resalta la necesidad de investigar más a fondo la selectividad y toxicidad del aurapteno hacia las células tumorales en comparación con las células normales, antes de considerar su aplicación clínica como tratamiento contra el cáncer de mama.

El análisis mediante Western blot para evaluar la expresión de proteínas clave en la apoptosis y proliferación celular ofrece información crucial sobre los efectos del tratamiento con aurapteno en las vías de señalización celular. Se observó una disminución en la expresión de las proteínas antiapoptóticas BCL-2 y XIAP (Fig. 15) en las células tratadas con aurapteno y Cuma, aunque esta reducción no fue significativa. Este resultado es consistente con los datos de viabilidad celular obtenidos en los ensayos de MTT (Fig. 11). Estos hallazgos coinciden con estudios previos que indican que el aurapteno induce apoptosis en células cancerosas mediante la inhibición de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y XIAP (Li et al., 2019; Yao et al., 2020).

Además, se observó una sobreexpresión de la proteína proapoptótica BAX en las células tratadas con aurapteno, aunque sin alcanzar significancia estadística. Esto sugiere que el aurapteno podría estar promoviendo la apoptosis a través de una vía dependiente de BAX. Este hallazgo destaca el papel crucial de BAX en los mecanismos de muerte celular inducidos por aurapteno, lo que sugiere que el compuesto podría activar una cascada de señalización apoptótica que favorezca la eliminación celular. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas que demuestran que el aurapteno induce apoptosis a través de diversas vías, incluidas las dependientes de BAX (Li et al., 2019; Yao et al., 2020).

En conjunto, estos resultados respaldan la eficacia del aurapteno como agente antitumoral, al influir en múltiples vías de señalización celular que regulan tanto la apoptosis como la proliferación celular. La validación de estos hallazgos en modelos in vivo será esencial para evaluar el potencial terapéutico del aurapteno en el tratamiento del cáncer de mama. En resumen, estos resultados proporcionan una base sólida para futuras investigaciones sobre el aurapteno como posible agente terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama.

Las herramientas in silico son cruciales en la investigación biomédica, permitiendo predecir y comprender interacciones moleculares sin necesidad de experimentos costosos y laboriosos. Estudios previos, como el de (Gong et al., 2012), han demostrado su eficacia en el diseño de fármacos y la comprensión de procesos biológicos complejos. Estas herramientas, como el software MOE utilizado en este estudio, ofrecen una perspectiva detallada de las interacciones entre moléculas y receptores, acelerando el desarrollo de tratamientos y proporcionando información vital para la investigación biomédica. En este estudio, se utilizó el software MOE para realizar ensayos de docking molecular entre el receptor RE α y diferentes moléculas, incluyendo 2-Hidroxi-6-metoxibenzaldedo, Aurapteno, Cumarina y 4-Metil umbelifeorna. Los resultados muestran que el aurapteno presenta una mayor afinidad con el receptor RE α en comparación con las otras moléculas evaluadas, e incluso supera la afinidad del estradiol, que es el sustrato principal del receptor de estrógeno. Esta observación es especialmente relevante ya que el estradiol es una molécula clave en la regulación de procesos biológicos importantes, como el crecimiento y la diferenciación celular. La mayor afinidad del aurapteno sugiere su potencial como un posible modulador del receptor de estrógeno. Además, se destaca la importancia de considerar la ubicación y el número de interacciones entre el ligando y el receptor. En este caso, se observa que las interacciones del aurapteno con el receptor RE α se encuentran principalmente en el dominio LBD (dominio de unión al ligando), que es el sitio de interacción con el ligando natural. Esta coincidencia en la ubicación de las interacciones refuerza la hipótesis de que el aurapteno podría actuar como un agonista o antagonista del receptor de estrógeno, dependiendo de su mecanismo de acción específico. En resumen, estos resultados sugieren que el aurapteno es un candidato prometedor para futuros estudios como posible modulador del receptor de estrógeno, lo que podría tener implicaciones significativas en el tratamiento y la prevención de enfermedades relacionadas con el sistema endocrino, como el cáncer de mama. Los resultados obtenidos en el estudio revelan importantes hallazgos sobre la regulación del receptor de estrógeno (RE) y su interacción con c-Jun, así como el efecto de diferentes compuestos en esta dinámica. El tratamiento con aurapteno,

cumarina, 4-metilumbeliferona y 2-hidroxi-6-metoxibenzaldeído condujo a una disminución en la intensidad de la banda correspondiente al RE en comparación con el grupo de control. Específicamente, se observó que aurapteno indujo una reducción más pronunciada en la intensidad de la banda del RE en comparación con las otras moléculas evaluadas. Este efecto podría indicar un posible mecanismo de acción de aurapteno sobre la actividad del RE, lo que podría tener implicaciones importantes en la regulación de la vía de señalización mediada por estrógenos. La inclusión de fulvestrant como control positivo, debido a su capacidad conocida para degradar el RE, refuerza la interpretación de los resultados obtenidos. La reducción en la intensidad de la banda del RE en presencia de aurapteno sugiere un posible efecto similar al observado con fulvestrant, lo que podría implicar un mecanismo de acción compartido entre estos compuestos en la regulación del RE. Además, se observó un aumento en la presencia de c-Jun en el gel en comparación con las moléculas evaluadas, lo que sugiere una posible interacción entre c-Jun y el RE en la regulación de la expresión génica asociada con la proliferación celular. Sin embargo, se destacó una disminución notable en la expresión de c-Jun en el grupo de control, lo que podría indicar una regulación diferencial de c-Jun en presencia de los compuestos evaluados. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que han demostrado la importancia del RE y c-Jun en la regulación de la proliferación celular y la vía de señalización mediada por estrógenos en el cáncer de mama. Adicionalmente, se observó una reducción en la expresión de catepsina D y HSP90 en las células tratadas con aurapteno, que, aunque no es significativo sugiere una posible acción de aurapteno. Catepsina D es una proteína que se deriva de la activación del RE y está involucrada en la degradación de proteínas y en la respuesta inmune. Adicionalmente, el tratamiento con aurapteno mostró visiblemente la expresión de GPR30 en comparación con el grupo de control y el tratamiento con fulvestrant. Este incremento en GPR30 sugiere que aurapteno podría estar modulando la actividad del RE de una manera que refuerza los hallazgos anteriores. La evidencia sugiere que aurapteno no solo afecta la expresión del RE, sino que también puede influir en la interacción entre el RE y

otros factores de transcripción como c-Jun, lo que subraya la complejidad de las vías de señalización mediadas por estrógenos. La disminución de catepsina D podría estar relacionada con la modulación de procesos de degradación celular y señalización, lo que podría afectar la homeostasis celular y contribuir a la inducción de apoptosis. La reducción de HSP90, una chaperona importante para la estabilidad de diversas proteínas, sugiere que el aurapteno puede influir en la homeostasis proteica y en la respuesta al estrés celular. Estos hallazgos complementan la idea de que el aurapteno no solo afecta al RE y a c-Jun, sino que también modula otras vías y proteínas clave en la regulación de la apoptosis y la supervivencia celular.

Los resultados obtenidos en este estudio comparativo proporcionan información valiosa sobre la caracterización y el potencial de aplicación de nanoliposomas preparados con diferentes proporciones de fosfatidil etanolamina y fosfatidil colina.

En primer lugar, los datos de tamaño y distribución de tamaño de los nanoliposomas revelan diferencias significativas dependiendo de la composición lipídica utilizada en su preparación. Los nanoliposomas con una composición de fosfatidil etanolamina al 30% y fosfatidil colina al 70% mostraron un tamaño promedio más pequeño y una distribución de tamaño más homogénea en comparación con aquellos preparados con fosfatidil colina al 30% y fosfatidil etanolamina al 70%. Esta discrepancia en el tamaño podría atribuirse a las propiedades físico-químicas de los lípidos utilizados y su influencia en la estructura y estabilidad de los nanoliposomas. La baja distribución de tamaño observada en ambos tipos de nanoliposomas indica una uniformidad en el tamaño de las partículas en cada muestra, lo que es un aspecto positivo para su aplicación en la entrega de fármacos. Sin embargo, es importante destacar que los nanoliposomas con una composición de fosfatidil colina al 30% y fosfatidil etanolamina al 70% excedieron el tamaño deseado para nanoliposomas, lo que sugiere la necesidad de ajustar la proporción de los componentes lipídicos para optimizar sus propiedades. El análisis del potencial zeta proporciona información adicional sobre

la estabilidad coloidal de los nanoliposomas. El potencial zeta de 200 mV observado en los nanoliposomas con una composición de fosfatidil etanolamina al 30% y fosfatidil colina al 70% sugiere una repulsión entre las partículas y una mejor distribución en la solución, lo que podría mejorar su estabilidad y capacidad de dispersión. Esta repulsión electrostática entre los nanoliposomas, facilitada por las cargas de los fosfolípidos, no solo contribuye a la estabilidad de la formulación, sino que también favorece un encapsulamiento eficiente del aurapteno.

Además, la carga positiva en la superficie de los nanoliposomas, que se debe al uso de fosfatidil etanolamina, es deseada para mejorar la incorporación a la membrana celular. Esta característica facilita la interacción con las membranas de las células objetivo, aumentando la eficacia de la entrega del fármaco. Así, la combinación de estabilidad y carga superficial adecuada hace que estos nanoliposomas sean prometedores para aplicaciones farmacológicas.

El aurapteno, al ser una molécula lipofílica, se integra eficazmente en el núcleo de los nanoliposomas, específicamente entre las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos. Esta ubicación permite que el fármaco esté bien protegido y retenido dentro de la estructura lipídica, facilitando una liberación controlada en entornos biológicos.

Además, los resultados del ensayo de carga de aurapteno en los nanoliposomas y el ensayo de MTT indican un efecto significativo en la viabilidad celular, que se observa reducida, lo que sugiere que los nanoliposomas podrían ser vehículos eficaces para la entrega de esta molécula. La estimación de una carga aproximada de 12.5 μM de aurapteno en los nanoliposomas resalta su capacidad para encapsular y liberar eficientemente el fármaco, lo que podría tener importantes implicaciones en aplicaciones terapéuticas.

En conjunto, estos hallazgos subrayan la relevancia de la composición lipídica en la preparación de nanoliposomas y su impacto en las propiedades físicas y

funcionales del sistema. La elección de lípidos adecuados podría optimizar la estabilidad y la liberación controlada del fármaco, maximizando así su eficacia terapéutica. Por tanto, los nanoliposomas elaborados con la formulación óptima tienen el potencial de ser utilizados como sistemas de entrega de fármacos en diversas aplicaciones biomédicas, especialmente en la terapia contra el cáncer. Sin embargo, es crucial llevar a cabo investigaciones adicionales para optimizar la formulación y evaluar su eficacia en modelos in vivo, así como para investigar posibles efectos secundarios y la biodisponibilidad del aurapteno en contextos clínicos antes de considerar su aplicación en pacientes.

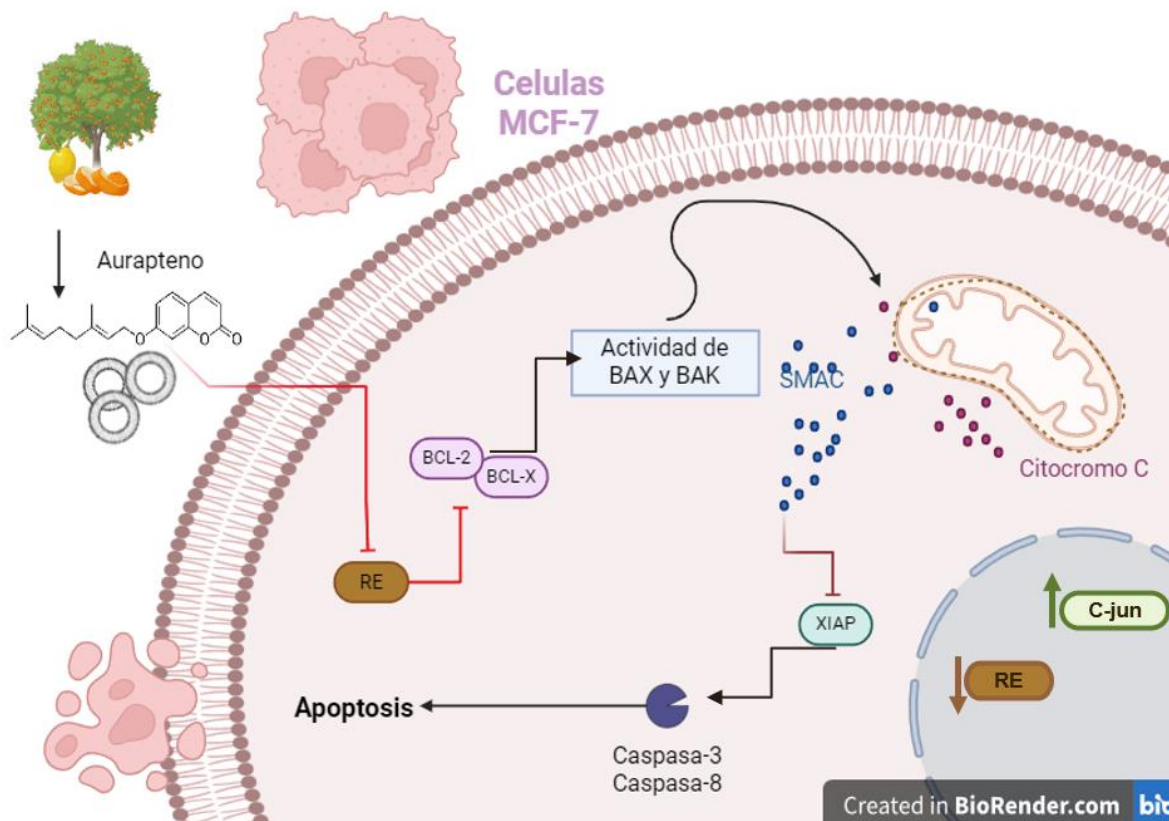


Fig 23. Resumen gráfico de los resultados obtenidos con aurapteno. Se muestra la disminución significativa en la viabilidad celular de la línea celular MCF-7, correlacionada con la baja de proteínas involucradas en la apoptosis, como BAX y Bcl-2. Además, se ilustra la interacción del aurapteno con el receptor de estrógeno, sugiriendo un posible mecanismo de acción a través de la regulación de la vía de señalización estrogénica. Se destaca también el potencial del aurapteno, encapsulado en nanoliposomas, como vehículo para una liberación controlada y eficaz del fármaco.

10. Conclusiones.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una comprensión detallada de los efectos del aurapteno y otros compuestos en la viabilidad celular, morfología celular, formación de colonias y vías de señalización molecular en células de cáncer de mama. Los hallazgos indican que el aurapteno exhibe un potente efecto citotóxico, induciendo apoptosis y afectando múltiples vías de señalización celular, lo que sugiere su potencial como agente terapéutico contra el cáncer de mama. Además, el análisis de docking molecular sugiere que el aurapteno podría actuar como un modulador del receptor de estrógeno, lo que podría tener implicaciones importantes en el tratamiento del cáncer de mama. Por otro lado, los nanoliposomas cargados con aurapteno muestran una capacidad prometedora como vehículos de administración de fármacos. Sin embargo, se requieren más estudios para validar estos hallazgos, entender completamente los mecanismos subyacentes y evaluar la eficacia de estos compuestos y sistemas de administración en modelos in vivo antes de considerar su aplicación clínica como tratamiento contra el cáncer de mama. En resumen, este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre el aurapteno, un compuesto bioactivo que ha mostrado potencial en la inducción de apoptosis en células cancerosas, así como sobre otros compuestos similares como posibles terapias contra el cáncer de mama. Además, resalta la importancia de la investigación continua en este campo para mejorar las opciones terapéuticas disponibles y explorar la eficacia del aurapteno en diferentes contextos y combinaciones de tratamiento.

11. Logros Alcanzados.

11.1. Participación en patente.

Certificado de acuse de
recibo registro:
MX/2024/037190

Expediente de Patente **MX/a/2024/006501**

Asunto: Se informa resultado del examen de forma.

Ciudad de México, a 3 de junio de 2024.

No. Folio: **48682**

Narciso FLORES ROMERO
Apoderado de
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
SAN VICENTE 97
EL REFUGIO
21440, TECATE, Baja California Norte, México

REF: Se da acuse de recibo a su Solicitud

En términos de lo dispuesto por el artículo 106 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial y artículos 18, 19 y 26 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; se tiene por satisfecho el examen de forma al haber cumplido con lo dispuesto por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial y el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial, aplicable a la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial en términos de lo dispuesto por el artículo Cuarto Transitorio del DECRETO por el que se expide la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial y se abroga la Ley de la Propiedad Industrial publicado en el Diario Oficial de la Federación del día 01 de julio de 2020.

Por lo anterior, de conformidad con los artículos 107 y 108 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial y artículo 9 del Acuerdo por el que se establecen los plazos de respuesta a diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, una vez **aprobado** el examen de forma, **la publicación en Gaceta de la presente solicitud de patente en trámite**, tendrá lugar después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, la cual contendrá los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, **el penúltimo párrafo del artículo 107 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículo 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial** y 10 del Acuerdo por el que se establecen los plazos de respuesta a diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, prevén que a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente



MX/2024/48682

Arenal 550, Pueblo Santa María Tepepan, C.P. 16020, Alcaldía Xochimilco, Ciudad de México,
Teléfono: 55 5334 0700, www.gob.mx/impi





MX/E/2024/037190

MX/a/2024/006501

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES.
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE PATENTES.
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE RECEPCIÓN Y CONTROL DE DOCUMENTOS.

EXPEDIENTE: MX/a/2024/006501
FOLIO DE RECEPCIÓN: MX/E/2024/037190
IDENTIFICADOR DE LA SOLICITUD: 176456
LUGAR, FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD:
CIUDAD DE MÉXICO 28/05/2024 09:39:37

ACUSE DE RECIBO DE LA SOLICITUD DE:

Patente

SOLICITANTE(S)

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

REPRESENTANTE LEGAL:

Narciso FLORES ROMERO

DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD:

DOCUMENTO	NOMBRE ARCHIVO	TAMAÑO	HOJA(S)
SOLICITUD	Solicitud_000176456_28_05_2024.pdf	499,46 KB	4
COMPROBANTE DE PAGO	Pago.pdf	22,51 KB	1
HOJA DE DESCUENTO	HOJA DE DESCUENTO.pdf	25,24 KB	1
CONSTANCIA RGP	RGP IMPI NARCISO FLORES.pdf	251,94 KB	2
MEMORIA TECNICA	Memoria_técnica_Aurapteno.pdf	282,18 KB	19
DIBUJOS	Figuras_Aurapteno.pdf	761,58 KB	3
OTROS	Cesión derechos inventores Aurapteno.pdf	2203,89 KB	6
OTROS	IDs Aurapteno inventores estigios.pdf	1007,56 KB	3

TOTAL DE HOJAS: 39 (No se incluyen hoja(s) del acuse)

Los documentos adjuntos están sujetos al estudio correspondiente que el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial realice de conformidad con la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial o la Ley de la Propiedad Industrial, según sea el caso, considerando la fecha de recepción de su solicitud; así como de conformidad al Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial, aplicable a ambas legislaciones en términos de lo dispuesto por los artículos Transitorios Cuarto y Noveno del Decreto por el que se expide la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, publicado el día 01 de julio de 2020 en el diario oficial de la federación

La presente solicitud se recibe en términos del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; por lo tanto, previo a su presentación, el usuario aceptó lo siguiente:

I.- Que el trámite se efectúe, desde su inicio hasta su conclusión, a través de medios de comunicación electrónica;

II.- Bajo protesta de decir verdad, que revisó en la vista previa la información capturada y los anexos a la solicitud y que éstos son correctos; así mismo que, una vez concluido el proceso, no podría editar o variar la información o sus anexos;

III.- Bajo protesta de decir verdad, indicó que la información capturada es cierta;

IV.- Consultar su tablero, al menos, los días quince y último de cada mes, o bien, el día hábil siguiente si alguno de éstos fuere inhábil y que, en caso de no hacerlo, la notificación se tendría por hecha el día hábil siguiente a los días quince y último de cada mes, y

V.- Dar aviso por escrito, a través del correo electrónico buzon@impi.gob.mx, a la Dirección Divisional de Patentes, dentro de los tres días hábiles siguientes a aquel en que se vea imposibilitado, por causas imputables al Instituto, a consultar el tablero o abrir los archivos depositados en el mismo, en los días señalados en la fracción IV anterior.

A efecto de que los documentos presentados a través del Sistema de Patentes en Línea, produzcan los mismos efectos que los documentos firmados autógrafamente y tengan el mismo valor probatorio, manifestó bajo protesta de decir verdad, que los documentos son copia íntegra e inalterada del documento impreso; que se encuentren digitalizados en formato PDF (Portable Document Format), y que los remitió de forma legible.

Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
(55) 53340700 - www.gob.mx/impi

11.2. Coautora en artículo de investigación de revista arbitrada.

Article

Auraptene Boosts the Efficacy of the Tamoxifen Metabolites Endoxifen and 4-OH-Tamoxifen in a Chemoresistant ER+ Breast Cancer Model

Angel Pulido-Capiz ^{1,2}, Brenda Chimal-Vega ^{1,2}, Luis Pablo Avila-Barrientos ³, Alondra Campos-Valenzuela ^{1,2}, Raúl Díaz-Molina ^{1,2}, Raquel Muñiz-Salazar ⁴, Octavio Galindo-Hernández ^{1,2} and Victor García-González ^{1,2,*}

- ¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico; pulido.angel@uabc.edu.mx (A.P.-C.); brenda.chimal@uabc.edu.mx (B.C.-V); campos.alondra85@uabc.edu.mx (A.C.-V.); rauldiaz@uabc.edu.mx (R.D.-M.); octavio.galindo@uabc.edu.mx (O.G.-H.)
 - ² Laboratorio Multidisciplinario de Estudios Metabólicos y Cáncer, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico
 - ³ Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam, Germany; luispablo.barrientos@mpimp-golm.mpg.de
 - ⁴ Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California, Campus Ensenada, Ensenada 22890, Mexico; ramusal@uabc.edu.mx
- * Correspondence: vgarcia62@uabc.edu.mx; Tel.: +52-686-5571622 (ext. 45309)



Citation: Pulido-Capiz, A.; Chimal-Vega, B.; Avila-Barrientos, L.P.; Campos-Valenzuela, A.; Diaz-Molina, R.; Muñiz-Salazar, R.; Galindo-Hernández, O.; García-González, V. Auraptene Boosts the Efficacy of the Tamoxifen Metabolites Endoxifen and 4-OH-Tamoxifen in a Chemoresistant ER+ Breast Cancer Model. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 1179. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091179>

Academic Editors: Thomas Efferth, Michele Navarra, Santa Cirmi and Alessandro Mauger

Received: 7 July 2024
Revised: 22 August 2024
Accepted: 3 September 2024
Published: 6 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Approximately 80% of breast cancer (BC) cases are estrogen receptor positive (ER+) and sensitive to hormone treatment; Tamoxifen is a prodrug, and its main plasmatic active metabolites are 4-hydroxytamoxifen (4-OH Tam) and endoxifen. Despite the effectiveness of tamoxifen therapy, resistance can be developed. An increment in eukaryotic initiation factor-4A complex (eIF4A) activity can result in tamoxifen-resistant tumor cells. For this work, we developed a cell variant resistant to 4-OH Tam and endoxifen, denominated MCF-7^{VarE}; then, the aim of this research was to reverse the acquired resistance of this variant to tamoxifen metabolites by incorporating the natural compound auraptene. Combination treatments of tamoxifen derivatives and auraptene successfully sensitized the chemoresistant MCF-7^{VarE}. Our data suggest a dual regulation of eIF4A and ER by auraptene. Joint treatments of 4-OH Tam and endoxifen with auraptene identified a novel focus for chemoresistance disruption. Synergy was observed using the auraptene molecule and tamoxifen-derived metabolites, which induced a sensitization in MCF-7^{VarE} cells and ER α parental cells that was not observed in triple-negative breast cancer cells (TNBC). Our results suggest a synergistic effect between auraptene and tamoxifen metabolites in a resistant ER+ breast cancer model, which could represent the first step to achieving a pharmacologic strategy.

Keywords: auraptene; breast cancer; estrogen receptor; resistance; eukaryotic initiation factor-4A complex

1. Introduction

Breast cancer (BC) is a heterogeneous disease classified into the following molecular subtypes: estrogen receptor positive α (ER α), epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+), and triple negative (TNBC) [1]. Approximately 80% of BC cases are estrogen receptor positive (ER+) [1]. One of the most widely used drugs for the treatment of BC ER+ is tamoxifen, a selective ER modulator that competes with its natural ligand, estradiol (E2), an estrogen hormone playing a critical role in breast tissue growth, development, and function [2]. Tamoxifen is classified as a prodrug due to its transformation into active metabolites upon metabolism. These metabolites include N-desmethyltamoxifen (NMD), 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen (endoxifen), and 4-hydroxytamoxifen (4-OH Tam), which exhibit significantly 30 to 100 times greater affinity for ER compared to tamoxifen itself [3].

11.3. Proyección de resultados para publicar un artículo de investigación original.

Breast cancer is the second most frequently diagnosed cancer worldwide and the fifth leading cause of death from neoplastic diseases. This disease is characterized by the heterogeneity in the growth and survival of mammary epithelial cells, classified according to the presence of hormone receptors, such as estrogen receptor alpha (ER α +), as well as subtypes like luminal A, luminal B, HER2+, and triple-negative (TNBC). Recent data have shown that various coumarins inhibit cell proliferation, migration, and angiogenesis in breast cancer cell lines, suggesting their potential as complementary treatments. In our research, we evaluated the therapeutic effect of coumarin and two of its derivatives, 2-hydroxy-6-methoxybenzaldehyde and 4-methylumbelliferone, as well as aurapteno, in a cellular model of ER+ breast cancer (MCF-7). Additionally, a molecular docking study was conducted to analyze the interaction between aurapteno and the estrogen receptor. The docking results indicated that aurapteno has a high affinity for the receptor, suggesting that its therapeutic action may be mediated through this interaction. Techniques were employed to assess cell viability, and the expression of proteins involved in proliferation and apoptosis was analyzed using Western Blot (WB). Furthermore, nanoliposomes were developed to encapsulate aurapteno, allowing for controlled release and increased bioavailability of the drug. The results showed that aurapteno significantly reduces cell viability and modulates proteins related to apoptosis. These findings underscore the potential of aurapteno in breast cancer management and suggest that formulation in nanoliposomes could enhance treatment efficacy by optimizing the delivery of the molecule. In conclusion, the prenyl group in the structure of aurapteno is crucial for its therapeutic activity, as it facilitates interaction with the estrogen receptor and enhances its effects on apoptosis induction. Preserving this structural feature is essential to maximize its efficacy in breast cancer treatment. However, further research is needed to validate these findings and determine the long-term safety of this therapeutic strategy.

12. Fuente de financiamiento.

El anteproyecto forma parte del proyecto: “Regulación del eje PERK/eIF4A por moléculas terpénicas: implicación metabólica en quimioresistencia” (vigencia 2019-2022), aprobado en la Convocatoria Ciencia Básica del Conacyt 2018-2019. Responsable técnico: Dr. Victor Guadalupe García González.

13. Bibliografía:

Akasaka, Y., Hasei, S., Ohata, Y., Kanna, M., Nakatsu, Y., Sakoda, H., Fujishiro, M., Kushiya, A., Ono, H., Matsubara, A., Hinata, N., Asano, T., & Yamamotoya, T. (2023). Auraptene enhances AMP-activated protein kinase phosphorylation and thereby inhibits the proliferation, migration and expression of androgen receptors and prostate-specific antigens in prostate cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 16011. <https://doi.org/10.3390/ijms242116011>

Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>

Asadzadeh, Z., Safarzadeh, E., Safaei, S., Baradaran, A., Mohammadi, A., Hajiasgharzadeh, K., Derakhshani, A., Argentiero, A., Silvestris, N., & Baradaran, B. (2020). Current approaches for combination therapy of cancer: The role of immunogenic cell death. *Cancers*, 12(4), 1047. <https://doi.org/10.3390/cancers12041047>

Avendaño, C., & Menéndez, J. C. (2015). Anticancer drugs that modulate hormone action. En *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* (pp. 81–131). Elsevier.

Baraldi, P. G., & Tabrizi, M. A. (2016). Esculin as a potential anticancer agent: Mechanistic insights and therapeutic applications.

Cancer Today. (s/f). Who.int. Recuperado el 29 de mayo de 2024, de <https://gco.iarc.who.int/today/>

Casa, A. J., Potter, A. S., Malik, S., Lazard, Z., Kuitse, I., Kim, H.-T., Tsimelzon, A., Creighton, C. J., Hilsenbeck, S. G., Brown, P. H., Oesterreich, S., & Lee, A. V. (2012). Estrogen and insulin-like growth factor-I (IGF-I) independently down-regulate critical repressors of breast cancer growth. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(1), 61–73. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1540-0>

Charmforoshan, E., Karimi, E., Oskoueian, E., Es-Haghi, A., & Iranshahi, M. (2019). Inhibition of human breast cancer cells (MCF-7 cell line) growth via cell proliferation, migration, and angiogenesis by auraptene of *Ferula szowitsiana* root extract. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 13(4), 2644–2653. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00185-6>

Ciruelos Gil, E. M. (2014). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(7), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.03.004>

Cosentino, K., Hertlein, V., Jenner, A., Dellmann, T., Gojkovic, M., Peña-Blanco, A., Dadsena, S., Wajngarten, N., Danial, J. S. H., Thevathasan, J. V., Mund, M., Ries, J., & Garcia-Saez, A. J. (2022). The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation. *Molecular Cell*, 82(5), 933-949.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.01.008>

Coumarin: A promising scaffold for anticancer agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* (s/f). *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*

Denkert, C., Nekljudova, V., & Loibl, S. (2021). HER2-low-positive breast cancer from four neoadjuvant clinical trials - Authors' reply. *The Lancet Oncology*, 22(10), e427. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00548-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00548-9)

Epifano, F., Genovese, S., Miller, R., & Majumdar, A. P. N. (2013). Auraptene and its effects on the re-emergence of colon cancer stem cells. *Phytotherapy Research: PTR*, 27(5), 784–786. <https://doi.org/10.1002/ptr.4773>

Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), 95–120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

Gabrielson, J. E. (2018). Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*.

Galindo-Hernandez, O., Gonzales-Vazquez, C., Cortes-Reynosa, P., Reyes-Uribe, E., Chavez-Ocaña, S., Reyes-Hernandez, O., Sierra-Martinez, M., & Salazar, E. P. (2015). Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(12), 9649–9659. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3711-9>

Galindo-Hernandez, O., Serna-Marquez, N., Castillo-Sanchez, R., & Salazar, E. P. (2014). Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 91(6), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.09.002>

García-González, V., Gutiérrez-Quintanar, N., Mendoza-Espinosa, P., Brocos, P., Piñeiro, A., & Mas-Oliva, J. (2014). Key structural arrangements at the C-terminus

domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *Journal of Structural Biology*, 186(1), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.002>

García-González, V., & Mas-Oliva, J. (2017). A novel β -adaptin/c-Myc complex formation modulated by oxidative stress in the control of the cell cycle in macrophages and its implication in atherogenesis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13880-5>

Gong, H., Zuliani, P., Komuravelli, A., Faeder, J. R., & Clarke, E. M. (2012). Computational modeling and verification of signaling pathways in cancer. En *Algebraic and Numeric Biology* (pp. 117–135). Springer Berlin Heidelberg.

González Espinoza, I. R., Villarreal Garza, C., Juárez León, O. A., Adel Álvarez, L. A., Cruz López, J. C., & Téllez Bernal, E. (2015). Cáncer de mama con receptores hormonales positivos: tratamiento adyuvante, primera línea en cáncer metastásico y nuevas estrategias (inhibición de mTOR). *Gaceta mexicana de oncología*, 14(5), 277–292. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.11.001>

Gortaire, J. A. D. (2017). Caracterización in vitro de un profármaco derivado de la camptotecina para el tratamiento del Glioblastoma Multiforme. Unpublished. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25850.80323>

Gupta, P. B., Pastushenko, I., Skibinski, A., Blanpain, C., & Kuperwasser, C. (2019). Phenotypic plasticity: Driver of cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Cell Stem Cell*, 24(1), 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.011>

Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen hormone biology. *Current Topics in Developmental Biology*, 125, 109–146. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hernández, A., & González, M. (2015). Cumarinas: un grupo de compuestos con potencial farmacológico. *Revista de Ciencias Farmacéuticas*.

Hoque, S. A., Iizuka, I., Kobayashi, M., Takanashi, S., Anwar, K. S., Islam, M. T., Hoque, S. A., Khamrin, P., Okitsu, S., Hayakawa, S., & Ushijima, H. (2019). Determining effectiveness of rotavirus vaccine by immunochromatography and reverse transcriptase polymerase chain reaction: A comparison. *Vaccine*, 37(39), 5886–5890. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.091>

Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., & Grohe, C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18447–18453. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910345199>

Kang, J., Yu, Y., Jeong, S., Lee, H., Heo, H. J., Park, J. J., Na, H. S., Ko, D. S., & Kim, Y. H. (2020). Prognostic role of high cathepsin D expression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12, 1758835920927838. <https://doi.org/10.1177/1758835920927838>

Kargozar, S., Hoseini, S. J., Milan, P. B., Hooshmand, S., Kim, H.-W., & Mozafari, M. (2020). Quantum dots: A review from concept to clinic. *Biotechnology Journal*, 15(12), e2000117. <https://doi.org/10.1002/biot.202000117>

Karp, D. (2005). *Biología celular y molecular - 4b: Edición*. McGraw-Hill Companies.

Khatpe, A. S., Adebayo, A. K., Herodotou, C. A., Kumar, B., & Nakshatri, H. (2021). Nexus between PI3K/AKT and estrogen receptor signaling in breast cancer. *Cancers*, 13(3), 369. <https://doi.org/10.3390/cancers13030369>

Krishnan, P., & Kleiner-Hancock, H. (2012). Effects of auraptene on IGF-1 stimulated cell cycle progression in the human breast cancer cell line, MCF-7. *International Journal of Breast Cancer*, 2012, 502092. <https://doi.org/10.1155/2012/502092>

Krishnan, P., Yan, K. J., Windler, D., Tubbs, J., Grand, R., Li, B. D. L., Aldaz, C. M., McLarty, J., & Kleiner-Hancock, H. E. (2009). Citrus auraptene suppresses cyclin D1 and significantly delays N-methyl nitrosourea induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *BMC Cancer*, 9(1), 259. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-259>

Lee, C. I., Goodwin, A., & Wilcken, N. (2017). Fulvestrant for hormone-sensitive metastatic breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(1), CD011093. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011093.pub2>

Li, P., Zhang, X., Wang, H., Wang, L., Liu, T., Du, L., Yang, Y., & Wang, C. (2023). Supplementary Table 3 from MALAT1 is associated with poor response to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer patients and promotes chemoresistance through EZH2. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.22509045.v1>

Lim, Y. C., Desta, Z., Flockhart, D. A., & Skaar, T. C. (2005). Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55(5), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0926-7>

Lipovka, Y., & Konhilas, J. P. (2016). The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: enemy or ally? *Bioscience Reports*, 36(3), e00352–e00352. <https://doi.org/10.1042/bsr20160017>

Liu, Y., Chen, C., Hao, Z., Shen, J., Tang, S., & Dai, C. (2024). Ellagic acid mitigates cadmium exposure-induced apoptosis in HT22 cells via inhibiting oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and activating Nrf2/ho-1 pathway. *En Preprints*. <https://doi.org/10.20944/preprints202409.0912.v1>

Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C., & Curigliano, G. (2021). Breast cancer. *Lancet*, 397(10286), 1750–1769. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32381-3)

Majnooni, M. B., Fakhri, S., Smeriglio, A., Trombetta, D., Croley, C. R., Bhattacharyya, P., Sobarzo-Sánchez, E., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2019). Antiangiogenic effects of coumarins against cancer: From chemistry to medicine. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(23), 4278. <https://doi.org/10.3390/molecules24234278>

Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.004>

Marcela, E., Alvarez, L., Raquel, E., & Haro, A. (s/f). FACULTAD DE ODONTOLOGÍA MÉTODOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD CELULAR CON APLICACIÓN EN ODONTOLOGÍA PRESENTADA POR. Edu.pe. Recuperado el 29 de noviembre de 2022, de https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/5143/lopez_aem.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Marin, J. J. G., Monte, M. J., Blazquez, A. G., Macias, R. I. R., Serrano, M. A., & Briz, O. (2014). The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.131>

Mercurio, A. M., Lipscomb, E. A., & Bachelder, R. E. (2005). Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(4), 283–290. <https://doi.org/10.1007/s10911-006-9001-9>

Missmer, S. A., Eliassen, A. H., Barbieri, R. L., & Hankinson, S. E. (2004). Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(24), 1856–1865. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh336>

Nathan, M. R., & Schmid, P. (2017). A review of fulvestrant in breast cancer. *Oncology and therapy*, 5(1), 17–29. <https://doi.org/10.1007/s40487-017-0046-2>

Ntellas, P., Mavroeidis, L., Gkoura, S., Gazouli, I., Amylidi, A.-L., Papadaki, A., Zarkavelis, G., Mauri, D., Karpathiou, G., Kolettas, E., Batistatou, A., & Pentheroudakis, G. (2020). Old player-new tricks: Non angiogenic effects of the VEGF/VEGFR pathway in cancer. *Cancers*, 12(11), 3145. <https://doi.org/10.3390/cancers12113145>

Pazo Cida, R. A., Álvarez Alejandro, M., Cebollero De Miguela, A., Agustín, M. J., Martínez Lostaoc, L., Bernalc, A., & Pérez Graciad, J. L. (s/f). Antón Torresa.

Pham, T. H., Lecomte, S., Efstathiou, T., Ferriere, F., & Pakdel, F. (2019). An update on the effects of glyceollins on human health: Possible anticancer effects and underlying mechanisms. *Nutrients*, 11(1), 79. <https://doi.org/10.3390/nu11010079>

Pu, X., Storr, S. J., Zhang, Y., Rakha, E. A., Green, A. R., Ellis, I. O., & Martin, S. G. (2017). Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 22(3), 357–368. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1323-5>

Pulido-Capiz, A., Chimal-Vega, B., Avila-Barrientos, L. P., Campos-Valenzuela, A., Díaz-Molina, R., Muñoz-Salazar, R., Galindo-Hernández, O., & García-González, V. (2024). Auraptene boosts the efficacy of the tamoxifen metabolites endoxifen and 4-OH-tamoxifen in a chemoresistant ER+ breast cancer model. *Pharmaceutics*, 16(9), 1179. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091179>

Qi, X., Borowicz, S., Pramanik, R., Schultz, R. M., Han, J., & Chen, G. (2004). Estrogen receptor inhibits c-jun-dependent stress-induced cell death by binding and modifying c-jun activity in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6769–6777. <https://doi.org/10.1074/jbc.m311492200>

Reddy, P. S., & Singh, M. (2015). Hesperidin: A promising anticancer agent. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(4), 665–673.

Retraction: Effective targeting of triple-negative breast cancer cells by PF-4942847, a novel oral inhibitor of hsp 90. (2017). *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(2), 612. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2872>

Riveiro, M., De Kimpe, N., Moglioni, A., Vazquez, R., Monczor, F., Shayo, C., & Davio, C. (2010). Coumarins: Old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Current medicinal chemistry*, 17(13), 1325–1338. <https://doi.org/10.2174/092986710790936284>

Sahakijpijarn, S., Smyth, H. D. C., Miller, D. P., & Weers, J. G. (2020). Post-inhalation cough with therapeutic aerosols: Formulation considerations. *Advanced*

Drug Delivery Reviews, 165–166, 127–141.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.05.003>

Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3)

Singh, A., Ansari, V. A., Haider, F., Akhtar, J., & Ahsan, F. (2020). Essential oils used in Modified Drug Delivery and its formulation of Liposomes for Topical Purpose. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*, 12(1), 34.
<https://doi.org/10.5958/2321-5836.2020.00008.7>

Tecalco-Cruz, A. C., Pérez-Alvarado, I. A., Ramírez-Jarquín, J. O., & Rocha-Zavaleta, L. (2017). Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 34, 121–132.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.011>

The International Agency for Research on Cancer (IARC). (s/f). Global Cancer Observatory. *Iarc.Fr*. Recuperado el 11 de septiembre de 2024, de <https://gco.iarc.fr/>

Thomas, M. P., & Potter, B. V. L. (2013). The structural biology of oestrogen metabolism. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 27–49. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.12.014>

Vincent, A. M., & Feldman, E. L. (2002). Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Hormone & IGF Research: Official Journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 12(4), 193–197. [https://doi.org/10.1016/s1096-6374\(02\)00017-5](https://doi.org/10.1016/s1096-6374(02)00017-5)

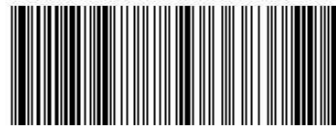
Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective: The Nuclear Receptor Superfamily. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(11), 1876–1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>

What is cancer? (2007, septiembre 17). Cancer.gov. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

Xin, Q.-L., Qiu, J.-T., Cui, S., Xia, G.-L., & Wang, H.-B. (2016). Transcriptional activation of nuclear estrogen receptor and progesterone receptor and its regulation. *Sheng Li Xue Bao [Acta Physiologica Sinica]*, 68(4), 435–454.

Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 28. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00028>

Anexos



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES.
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE PATENTES.

COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE RECEPCIÓN Y CONTROL DE DOCUMENTOS.

EXPEDIENTE: MX/a/2024/006501

FOLIO DE RECEPCIÓN: MX/E/2024/037190

IDENTIFICADOR DE LA SOLICITUD: 176456

LUGAR, FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD:
CIUDAD DE MÉXICO 28/05/2024 09:39:37

ACUSE DE RECIBO DE LA SOLICITUD DE:

Patente

SOLICITANTE(S)

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

REPRESENTANTE LEGAL:

Narciso FLORES ROMERO

DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD:

DOCUMENTO	NOMBRE ARCHIVO	TAMAÑO	HOJA(S)
SOLICITUD	Solicitud_000176456_28_05_2024.pdf	499.46 KB	4
COMPROBANTE DE PAGO	Pago.pdf	22.51 KB	1
HOJA DE DESCUENTO	HOJA DE DESCUENTO.pdf	25.24 KB	1
CONSTANCIA RGP	RGP IMPI NARCISO FLORES.pdf	251.94 KB	2
MEMORIA_TECNICA	Memoria_técnica_Aurapteno.pdf	282.18 KB	19
DIBUJOS	Figuras_Aurapteno.pdf	761.58 KB	3
OTROS	Cesión derechos inventores Aurapteno.pdf	2203.89 KB	6
OTROS	IDs Aurapteno inventores testigos.pdf	1007.56 KB	3

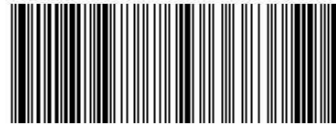
TOTAL DE HOJAS: 39 (No se incluyen hoja(s) del acuse)

Los documentos adjuntos están sujetos al estudio correspondiente que el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial realice de conformidad con la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial o la Ley de la Propiedad Industrial, según sea el caso, considerando la fecha de recepción de su solicitud; así como de conformidad al Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial, aplicable a ambas legislaciones en términos de lo dispuesto por los artículos Transitorios Cuarto y Noveno del Decreto por el que se expide la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, publicado el día 01 de julio de 2020 en el diario oficial de la federación

La presente solicitud se recibe en términos del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; por lo tanto, previo a su presentación, el usuario aceptó lo siguiente:

- I.- Que el trámite se efectúe, desde su inicio hasta su conclusión, a través de medios de comunicación electrónica;
- II.- Bajo protesta de decir verdad, que revisó en la vista previa la información capturada y los anexos a la solicitud y que éstos son correctos; así mismo que, una vez concluido el proceso, no podría editar o variar la información o sus anexos;
- III.- Bajo protesta de decir verdad, indicó que la información capturada es cierta;
- IV.- Consultar su tablero, al menos, los días quince y último de cada mes, o bien, el día hábil siguiente si alguno de éstos fuere inhábil y que, en caso de no hacerlo, la notificación se tendría por hecha el día hábil siguiente a los días quince y último de cada mes, y
- V.- Dar aviso por escrito, a través del correo electrónico buzon@impi.gob.mx, a la Dirección Divisional de Patentes, dentro de los tres días hábiles siguientes a aquel en que se vea imposibilitado, por causas imputables al Instituto, a consultar el tablero o abrir los archivos depositados en el mismo, en los días señalados en la fracción IV anterior.

A efecto de que los documentos presentados a través del Sistema de Patentes en Línea, produzcan los mismos efectos que los documentos firmados autógrafamente y tengan el mismo valor probatorio, manifestó bajo protesta de decir verdad, que los documentos son copia íntegra e inalterada del documento impreso; que se encuentren digitalizados en formato PDF (Portable Document Format), y que los remitió de forma legible.




Asimismo, desde su registro en el Portal de Acceso a Servicios Electrónicos, manifestó reconocer como propia la CURP, la cual no podrá ser sustituida con posterioridad; reconoció como propia y válida la dirección de correo electrónico proporcionada y aceptó que en ella se le envíe cualquier comunicación relacionada con la cuenta; aceptó que el uso de la contraseña queda bajo su exclusiva responsabilidad y que deberá notificar oportunamente al Instituto, cualquier situación que pudiera implicar un uso indebido; reconoció como propia, veraz y auténtica la información que envíe a través del PASE o de los servicios electrónicos del Instituto, ya sea haciendo uso de su CURP y contraseña o, en su caso, su e-firma; aceptó que el uso de su CURP y contraseña o, en su caso, e-firma, por persona distinta quedará bajo su exclusiva responsabilidad y acepta como propia la información que ésta envíe o descargue a través del PASE o de los servicios electrónicos del Instituto; asumió cualquier tipo de responsabilidad derivada del mal uso que hagan de su CURP y contraseña o, en su caso, su e-firma; y reconoció que el simple uso de los servicios electrónicos del Instituto constituye la aceptación más amplia de las condiciones señaladas en el artículo 11 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento.

El presente documento electrónico, su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1° fracción III; 2° fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

	<p>Cadena Original</p> <p>JAVIER ARIZMENDI SHO 00001000000514523498 SERVICIO DE ADMINISTRACION TRIBUTARIA 176456 MX/a/2024/006501 MX/E/2024/037190 28/05/2024 09:39:37 Documento_Firma_Electronica.pdf 19821.12 KB ANmBPVRoNuwX9xKypzRToUoH6wE=</p> <p>Sello Digital</p> <p>FQ0u34qObkKRWBfpcwcfnsjTi4TamT0RfR91INVrgAy20m +lkEuhuA5dtt72acnDs2ATihEz0PfnGOEEOE6NSbBFxXhChrc5NwDLZwyamsWiesqZaeUoQJx5K0UmAxeBwRNiI05D2pxPKN HbrEf1DVTMMcS5NYe4BWJraVZdI5iGcK/cAH7oDaj1viQMP0X//AWtSgmM/N9wMG5SVEO6EZopUV84UJHw3Vd3vaxIZ13m9 oikFsG2PfsUgYI7SBIZDuDbKoqd895sLYOqRuABtUx2hE5q+t547MTVXNm9SeXZVonmUIKOFvRBNJbTJQKRsTL6SwBNq +o32fag1A==</p>
<p>Para verificar la autenticidad del presente documento, podrá ingresar a la página electrónica https://validadocumento.impi.gob.mx/, escaneando el código bidimensional QR que aparece a un costado de la e-firma del Servidor Público que signó el mismo, indicando, en su caso, el tipo de documento que pretende validar (solicitud, acuse, oficio o promoción); lo anterior, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 1° fracción III; 2° fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; en caso de no contar con lector QR o en su defecto no pueda ser leído por su dispositivo, digitar en la página antes referida el siguiente código: yljy01pWXYKsf0j2xEddz51cM=</p>	

REPRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTE ENVIADA A TRAVÉS DEL PORTAL DE ACCESO A SERVICIOS ELECTRÓNICOS (PASE).

Homoclave del formato	Folio
IMPI-00-009	Folio: MX/E/2024/037190

Fecha de solicitud del trámite
28 05 2024

Datos generales de la solicitud

<input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente Normal <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial Especifique cual: <input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial	Expediente: MX/a/2024/006501 ID Solicitud: 176456 Fecha: 28/05/2024 09:39:37
--	--

Datos del (de los) solicitante(s)

Personas físicas	Personas morales
CURP:	RFC: UAE570228755
Nombre(s):	Denominación o razón social:
Primer apellido:	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
Segundo apellido:	Nacionalidad: MÉXICO
Nacionalidad:	Teléfono (Lada, Número, Extensión):
Teléfono (Lada, Número, Extensión):	6865518238, Ext. 33170
Correo electrónico:	Correo electrónico: opi@uabc.edu.mx
<input type="radio"/> Continúa en anexo	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo

gob mx	
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial	
Domicilio del (de los) solicitante(s)	
Código postal: 21100	
Calle: AVENIDA ALVARO OBREGON	
Número exterior: SN	Número interior:
Colonia: NUEVA	
Municipio o delegación: MEXICALI	Localidad:
Estado o entidad federativa: BAJA CALIFORNIA	Entre calles:
País: MÉXICO	

Datos del (de los) inventor(es) /diseñador(es)	
CURP: GAGV830918HMCRC04	
Nombre(s): Victor Guadalupe	
Primer apellido: GARCÍA	
Segundo apellido: GONZÁLEZ	
Nacionalidad: MÉXICO	
Teléfono (Lada, Número, Extensión): 6862489106	
Correo electrónico: vgarcia62@uabc.edu.mx	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo

Domicilio del (de los) inventor(es)/diseñador(es)	
Código postal: 21180	
Calle: AV PARIS	
Número exterior: 218	Número interior:
Colonia: VILLAFONTANA	
Municipio o delegación: MEXICALI	Localidad:
Estado o entidad federativa: BAJA CALIFORNIA	Entre calles:
País: MÉXICO	

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Datos del (de los) apoderado(s)

CURP: FORN791022HDFLMR03	RGP:
Nombre(s): Narciso	Personas autorizadas para oír/recibir notificaciones:
Primer apellido: FLORES	
Segundo apellido: ROMERO	
Nacionalidad: MÉXICO	
Teléfono (Lada, Número, Extensión): 6658519222	
Correo electrónico: narciso.flores@uabc.edu.mx	<input type="radio"/> Continúa en anexo

Domicilio del (de los) apoderado(s)

Código postal: 21440	
Calle: SAN VICENTE	
Número exterior: 97	Número interior:
Colonia: EL REFUGIO	
Municipio o delegación: TECATE	Localidad:
Estado o entidad federativa: BAJA CALIFORNIA	Entre calles:
País: MÉXICO	

Datos de la Solicitud

Denominación o título de la invención: USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO DE RE+ DE CÁNCER DE MAMA
Fecha divulgación previa:

Divisional de la solicitud

Fecha presentación:
Número:
Figura jurídica:

Prioridad Reclamada

País:	Fecha de Presentación:	Número de Serie:	Código DAS



Contacto:

Arenal # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
Teléfono: 55-53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 800-570-59-90.
Correo electrónico: buzón@impi.gob.mx

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Observaciones

Bajo protesta de decir verdad, el firmante manifiesta que los datos asentados en esta solicitud son ciertos y que en caso de actuar como mandatario, cuenta con facultades para llevar a cabo el presente trámite.



Cadena Original

NARCISO FLORES ROMERO|CURP|FORN791022HDFLMR03|RENAPO|28/05/2024 09:39:36|1267582|39| Documento_Firma_Electronica.pdf|9247.91 KB|ANmBPVROnuwX9xKypzRTToUoH6wE=|000176456|PATENTE|Norma|USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO DE RE+ DE CÁNCER DE MAMA|UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA|MORAL|Victor Guadalupe GARCÍA GONZÁLEZ| Narciso FLORES ROMERO|FORN791022HDFLMR03|

Sello Digital

zoRG3zZb1ZPom20NVG76sXEEKJqOLbakZxdEv189gV4=

Anexo(s)

Hoja anexa a la solicitud ID: 176456

De Fecha: 28/05/2024 09:39:37

Lista Inventores/Diseñadores

Inventor/Diseñador 2

- Nombre: Angel Armando PULIDO CAPIZ

- CURP: PUCA880705HBCLPN02

- Nacionalidad: MÉXICO

- Domicilio: Calle AV BAIKAL, Ext. 642, Col. JARDINES DEL LAGO, C. P. 21330, E-mail pulido.angel@uabc.edu.mx

- Población, Estado y País: MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

Inventor/Diseñador 3

- Nombre: Alondra Elizabeth CAMPOS VALENZUELA

- CURP: CAVA990705MSLMLL05

- Nacionalidad: MÉXICO

- Domicilio: Calle C 12, Ext. SN, Col. ZARAGOZA, C. P. 21604, E-mail campos.alondra85@uabc.edu.mx

- Población, Estado y País: MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

Número de Páginas Manifestadas

- Número de Páginas: 24



Contacto:

Arenal # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
Teléfono: 55-53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 800-570-59-90.
Correo electrónico: buzon@impi.gob.mx

COMPROBANTE ELECTRÓNICO DE PAGOS POR SERVICIOS



NUMERO DE FOLIO
10069408713



10069408713

PERIFÉRICO SUR 3106, COL JARDINES DEL PEDREGAL
DEL ALVARO OBREGON, CP 01900, CIUDAD DE MEXICO
REGIMEN FISCAL(803) PERSONAS MORALES CON FINES NO LUCRATIVOS
RFC: IMP-931211-NE1

TRÁMITE EN LÍNEA: 790184

CONCEPTO	CANTIDAD U.M.	PRECIO UNITARIO	IMPORTE TARIFA	DESCUENTO	TOTAL TARIFA	IVA
1a Por la presentación de una solicitud de patente y sus anexos de hasta 30 hojas	1	\$4,550.00	\$4,550.00	\$2,275.00	\$2,275.00	\$364.00

PUE - PAGO EN UNA SOLA EXHIBICIÓN

ANOTACIONES : --- DOS MIL SEISCIENTOS TREINTA Y NUEVE PESOS 00/100 MN ---	TOTAL TARIFA	\$4,550.00
	DESCUENTO	\$2,275.00
	SUBTOTAL	\$2,275.00
	IVA	\$364.00
	ACTUALIZACIÓN	\$0.00
	RECARGOS	\$0.00
TOTAL A PAGAR	\$2,639.00	

DATOS DEL TITULAR O SOLICITANTE
Nombre: UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA
C.P. 21100
RFC: UAE5702287S5

BANCO: Banorte
CONVENIO: 82833
FECHA DE OPERACION: 27/05/2024 00:00:00
FOLIO: 87624148549419082833

- * Este documento no es un comprobante fiscal.
- * Su factura estará generada dentro de los tres días hábiles posteriores a su pago.
- * El comprobante de pago FEPS sin factura es válido para presentar el trámite que ampara ante el IMPI.
- * Si su RFC no coincide con el registrado ante el SAT, la factura se emitirá con un RFC genérico.



Ciudad de México, 28/05/2024

Solicitud de: PATENTE

Bajo Protesta de decir verdad declaro, con respecto al beneficio señalado en la Cuarta Disposición General de la Tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, y con fundamento en la fracción III de dicha Disposición, que me encuentro en el supuesto abajo señalado, por lo que solicito el 50% de descuento de la Tarifa establecida para el Artículo 1a.

Hago la presente declaración en cumplimiento de dicha disposición, según el Acuerdo por el que se da a conocer la Tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, publicado en el Diario Oficial de la Federación con fecha 23 de agosto de 1995.

Micro y Pequeña Empresa ()

Instituto de Investigación Científica y Tecnológica del Sector Público ()

Universidad (X)

Diseñador/Inventor Independiente ()

ATENTAMENTE:

Nombre: Narciso FLORES ROMERO por poder de UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

**DIRECCION DIVISIONAL DE ASUNTOS JURIDICOS
SUBDIRECCION DIVISIONAL DE ASUNTOS JURIDICOS**

EXPEDIENTE: RGP-DDAJ-000741/2023

OFICIO: JU/S/2023/003311

ASUNTO: Constancia

**REF.: Escrito recibido el 28/04/2023, bajo el folio
775/2023**

Ciudad de México a 15/05/2023

**NARCISO FLORES ROMERO
CALLE SAN VICENTE NUMERO 97 COLONIA
EL REFUGIO MUNICIPIO TECATE ESTADO
BAJA CALIFORNIA C.P. 21440
P R E S E N T E**

En contestación a su escrito de referencia, se le comunica que para los fines declarativos de registro, se expide la presente constancia de inscripción en el Registro General de Poderes de este Instituto, del poder conferido al C. NARCISO FLORES ROMERO, por la persona Moral, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA; quedando registrado con el número RGP-DDAJ-000741/2023 a partir del 28/04/2023.

El ejercicio de las facultades que constan en el poder que se registra se encuentra limitado y sujeto a las formalidades y disposiciones de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, que para cada trámite establece.

En ese orden de ideas se establece que el poder inscrito tiene una vigencia de diez años desde la fecha de su otorgamiento el 20 de abril de 2023, tal y como lo señala el instrumento notarial 81,683 registrado.

Asimismo, se hace de su conocimiento que este Organismo al inscribir el documento antes indicado, deja a salvo los derechos de terceros para impugnar su registro y, en su caso, proceder a la cancelación de la inscripción.

El presente se signa además, con fundamento en el artículo 9 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial y su Capítulo III; ; 1°, 2°, 3° fracción V, inciso i), subíndice i), 4°, 5°, 11 fracción II y su último párrafo, así como 20 fracción V del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; ; 1°, 2°, 3°, 4°, 5° fracción V, inciso i), subíndice i), único

DIRECCION DIVISIONAL DE ASUNTOS JURIDICOS
SUBDIRECCION DIVISIONAL DE ASUNTOS JURIDICOS

guion), 15 fracción II y su último párrafo, 24 fracción V y 38 de su Estatuto Orgánico; 1° y 12 fracción v) y su último párrafo del Acuerdo Delegatorio de facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

ATENTAMENTE
Sergio Odin Castillo Espino



Cadena Original
SERGIO ODIN CASTILLO
ESPINO|CAES800816HDFSSR09|JU/S/2023/003311|RGP-DDAJ-
000741/2023|JU/R/2023/000741|28/04/2023 08:04:21|19564|Pág(s)
2|qo6a3BpOg4Gf0dKnK0T6wfcYdyY=1VZYXP93ggh5QwUP4PZB56G
9/bA=VESbqjkriitlQW6tbHAkaX7Q3evQ=ncvYPkUzG2nNRXZ+S2gw+Z
59j1o=RJ2X/32nL9OZ/J/uQauDv8YCCJQ=gLXV1oMy6GjsmNUumpuU
2J44X6s=

Sello Digital
Qspg9UR9z2FcmSqLUz+g8ZCEWxkWQnZDT5KbYhhxiOgyu6oXBvfpd
RunrecZ/RBZNN4JEArpz8191JJ7
FDFxKyZRj6xJUOYktdVzEns3tLVONTNm7O9YdRYoPFVoiBCiJyfLek2
cXhVMtdWnLbgReoJUexOGU9/
/SPxel1RQUjxH10HQ87yhpI12Z5AFjkLDMfMQhUR3b5m9iPIfc9h+A4J
0JFgEYNYS8i+jal9Ld3q3p91
jTUijgFU+FjHegrmVVp7WQx0MQVG2n0vTH2wacG54Mg5yrvNMOQ+
w+8QSk7EvHg4EhVVn/wIRs/CnpMk nHXLlkhz4M3Yhj215eGPww==

Para verificar la autenticidad del presente documento, podrá ingresar a la página electrónica <https://validadocumento.impi.gob.mx/>, escaneando el código QR que aparece a un costado de la FIEL (Firma Electrónica Avanzada) del Servidor Público que signó el mismo, indicando, en su caso, el tipo de documento que pretende validar (solicitud, acuse, oficio o promoción); lo anterior con fundamento en lo dispuesto por los artículos 1° fracción III, 2° fracciones II y V, 25, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO RE+ DE CÁNCER DE MAMA

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se engloba en el sector farmacéutico, y en concreto, en el uso de una molécula de aurapteno como tratamiento anticancerígeno.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El cáncer de mama (CM) es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres de todo el mundo. En 2020, el CM tuvo una incidencia aproximada de 2.2 millones de casos y originó 685 mil muertes (Global Cancer Observatory, 2022) asociadas a tumores metastásicos en órganos y tejidos vitales. Los tumores de mama pueden ser clasificados por subtipos moleculares, dependiendo de la expresión de los receptores hormonales (Meisner, A. L. W., Houman Fekrazad, M., & Royce, M. E. (2008). *Medical Clinics of North America*, 92(5), 1115–1141.) De igual manera, estos también se pueden clasificar de acuerdo a su origen, los
- 15 cuales pueden ser ductales, cuando las células proliferan en los conductos mamarios, y lobulares cuando éstas crecen en los lóbulos de las glándulas mamarias (Oliveira NCS, Gomig THB, Milioli HH, Cordeiro F, Costa GG, *et al*, *Genet Mol Res*. 2016). En un estudio retrospectivo realizado en México entre el 2005 al 2014, respaldado por el IEM-FUCAM
- 20 (Instituto de enfermedades de la mama, Fundación de cáncer de mama) sobre los tipos de cáncer de mama reportados, se reportó que el 79.7 % de las pacientes diagnosticadas presentaron lesiones de origen ductal, mientras que el 7.8 % fueron de origen lobular y el 4.2 % de origen mixto (Maffuz-Aziz A, Labastida-Almendaro S, Espejo-Fonseca A, Rodríguez-Cuevas S. *Cir Cir*. 2017).
- 25 Dentro de la clasificación molecular se encuentran los siguientes subtipos, Luminal A con expresión del Receptor de estrógenos (RE)/receptor de progesterona (RP) y sin expresión del

receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2); Luminal B con expresión de RE/RP y HER2; HER2+ con sobreexpresión de HER2 y sin expresión de RE/RP; y triple negativo (TNBC) sin la expresión de alguno de los receptores hormonales (Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), 95–120). En la población mexicana se han reportado las siguientes frecuencias, 65 % para luminal A, 12 % para luminal B, 9 % para HER2+, y 14 % para triple negativo o TNBC (Pérez-Rodríguez G. *Cir Cir.* 2015).

Aproximadamente, el 80 % de los tumores de cáncer de mama son RE+ y para estos casos el tratamiento de elección neoadyuvante para mujeres premenopáusicas son los moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERMS), específicamente el Tamoxifeno. El Tamoxifeno es un profármaco cuyos metabolitos activos primarios 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHTam) y el 4-hidroxi-N-desmetil-tamoxifeno (endoxifeno) son generados por la familia de isoenzimas del citocromo P450. La concentración plasmática de los metabolitos puede variar entre pacientes debido a polimorfismos en la enzima CYP2C9, la cual es importante para la formación del 4-OHTam, siendo las siguientes CYP2C9 R144C, I359 L, D360E, R150H, R335W y el L90P (Manish Manish, Andrew M Lynn, Smriti Mishra, *Cytochrome P450 2C9 polymorphism*, 2020), y por lo tanto influir en la eficacia del tratamiento (Helland, T., Alsomairy, S., Lin, C., et al. (2021). *Journal of Personalized Medicine*, 11(3), 1–23). El 4-OHTam y el endoxifeno tienen una potencia similar, posiblemente asociado al grupo funcional hidroxilo en la posición 4 de su estructura (Lim, Desta, Flockhart, & Skaar, 2005); sin embargo, el endoxifeno es más abundante en el plasma de las pacientes tratadas con Tamoxifeno (Helland, T., Alsomairy, S., Lin, C., et al. (2021). *Journal of Personalized Medicine*, 11(3), 1–23).

El tamoxifeno y sus metabolitos actúan como antagonistas del RE en el tejido mamario, inhibiendo las vías de señalización de crecimiento y proliferación de las células cancerosas (Lim, Y. C., Desta, Z., Flockhart, D. A., et al (2005). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55(5), 471–478.). Aunque el tratamiento con tamoxifeno se ha asociado con una disminución en la tasa de recurrencia en un 41 % y una tasa de mortalidad de hasta el 31

% (Jordan, V. C. (2014). *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), 1–20), casi un tercio de las pacientes recaen, asociado con el desarrollo de resistencia al tratamiento (Sahoo, S., Mishra, A., Kaur, H., et al (2021). *NAR Cancer*, 3(3), 1–19)

El Tamoxifeno es un fármaco no esteroideo derivado del trifeniletileno. En pacientes con
5 cáncer de mama, a nivel tumoral, el tamoxifeno actúa principalmente como un antiestrógeno, inhibiendo la unión del estrógeno estradiol al RE. En mujeres con tumores de mama RE+, la terapia adyuvante de tamoxifeno ha mostrado reducir significativamente la recurrencia de la enfermedad y mejorar la supervivencia a 10 años, alcanzando un efecto significativamente mayor con el tratamiento a cinco años comparado con el de 1 ó 2 años (Love SM; Lindsey
10 K. Dr. Susan love's breast book. 5a ed. Londres, Inglaterra: Da Capo Press; 2010).

Estos beneficios son independientes de la edad, estado menopáusico, dosis de Tamoxifeno y quimioterapia adicional. En la situación clínica, se reconoce que el Tamoxifeno induce reducciones del orden del 10-20 %, en los niveles de colesterol sanguíneo total y en las lipoproteínas de baja densidad en mujeres postmenopáusicas. Adicionalmente, se ha
15 reportado que el tamoxifeno mantiene la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas (Neyro, JL, Cristóbal, I, & Palacios, S. (2020). *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 12(1)).

La dosis varía de 20 a 40 mg, administrando 10 o 20 mg dos veces al día, o 20 mg en una sola dosis. Después de la administración oral, el tamoxifeno es absorbido rápidamente,
20 alcanzando concentraciones séricas máximas a las 4-7 horas. Las concentraciones en estado de equilibrio (alrededor de 300 ng/mL) se alcanzan después de la administración de 40 mg al día, durante 4 semanas. El fármaco presenta una fuerte unión a la albúmina sérica (M. Maciążek-Jurczyk, M. Maliszewska, J. Pożycka, J. *et al* (2013), *Journal of Molecular Structure*, 1044).

25 El metabolismo del Tamoxifeno se debe a reacciones de hidroxilación, desmetilación y conjugación, dando lugar a la elevación de diferentes metabolitos, los cuales poseen un perfil farmacológico superior al compuesto original, lo cual contribuye al efecto terapéutico (Lim

YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC (2005). *Cancer Chemother Pharmacol.* 55(5):471-8). El tamoxifeno se metaboliza principalmente a través de la vía CYP3A4 a N-desmetil-tamoxifeno, que es metabolizado por el CYP2D6 a otro metabolito activo, el endoxifeno. En los pacientes que carecen de la enzima CYP2D6, las concentraciones de endoxifeno son aproximadamente un 75% menor que en pacientes con niveles normales de actividad de la CYP2D6 (Coller JK, Krebsfaenger N, Klein K, et al. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2002;54(2):157–167; Stearns V, Johnson MD, Rae JM, et al. *J. Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1758–1764.). La excreción tiene lugar principalmente por orina y vía fecal con una vida media de eliminación de aproximadamente 7 días para el fármaco y de 14 días para el metabolito principal circulante N-desmetil-tamoxifeno (Kisanga ER, Mellgren G, Lien EA (2005). *Anticancer Res.* 25(6C):4487-92).

La principal ruta para el metabolismo del tamoxifeno en humanos, es la desmetilación catalizada por las enzimas citocromos CYP3A4. Aunque, se ha descrito la interacción farmacocinética con el agente inductor de la CYP3A4, la rifampicina, induciendo una reducción en los niveles plasmáticos de tamoxifeno (Binkhorst L, van Gelder T, Loos WJ, et al (2012). *Clin Pharmacol Ther.* 92(1):62-7). En varios reportes se han descrito interacciones farmacocinéticas con inhibidores del CYP2D6, mostrando una reducción del 65-75 % en los niveles plasmáticos de endoxifeno (Borges S, Desta Z, Li L, et al (2006). *Clin Pharmacol Ther.* 80(1):61-74). Así mismo, el tamoxifeno estimula a los ovarios para el aumento de la síntesis de estrógenos (Lum SS, Woltering EA, Fletcher WS, et al. (1997). *Am J Surg.* 173(5):399-402), mientras actúa ejerciendo una actividad antagonista hacia el RE α , actuando como inhibidor competitivo del estradiol, esta característica es responsable de sus efectos secundarios negativos, como el cáncer uterino y el aumento en la formación de coágulos de sangre; también de sus beneficios, los cuales son aumento en la densidad ósea y una disminución del colesterol (Powles TJ, Hickish T, Kanis JA, et al. (1996). *J Clin Oncol.* 14(1):78-84; Dnistrian AM, Schwartz MK, Greenberg EJ, et al (1993). *Clin Chim Acta.* 223(1-2):43-52). Sin embargo, el tamoxifeno no es recomendable en tumores que sean negativos a RE α .

De forma importante, el uso de tamoxifeno en combinación con agentes citotóxicos puede favorecer un mayor riesgo de desarrollar efectos adversos tromboembólicos. Asimismo, el uso de tamoxifeno en combinación con un inhibidor de la aromatasas como terapia adyuvante no ha mostrado mayor eficacia en comparación con la monoterapia de tamoxifeno (Howell A, Cuzick J, Baum M, et al. (2005). Lancet. 1-7;365(9453):60-2). De manera que es necesario la búsqueda de nuevas alternativas que coadyuven a mejorar la eficacia del tamoxifeno.

Aurapteno y moléculas análogas

El aurapteno es un compuesto natural de bajo peso molecular (298.4 g/mol), el cual presenta una alta estabilidad, es fácil de manipular y su control de calidad es adecuado. Además, se pueden producir a bajo costo, y en su estructura química cuenta con 3 aceptores de enlace de hidrógeno. La estructura de la molécula se encuentra dentro de la Tabla 2.

El aurapteno o *7-geraniloxicoumarina* es miembro de las cumarinas umbeliferonas en las que el hidrógeno fenólico ha sido reemplazado por un grupo geranilo, es decir, se describe como una preniloxicoumarina. El aurapteno se puede aislar de las plantas del género *Ferula* y *Citrus*, como son la toronja, naranja, mandarina, limones y pomelos (Tayarani-Najaran Z;Tayarani-Najaran N;Eghbali S. (2021). Front Pharmacol. 12:698352). En un análisis de la composición de aurapteno en *Citrus* realizado por Ogawa *et al.*; los autores cuantificaron su contenido en los frutos de 77 especies de cítricos de Tanaka, incluidas 14 variedades cultivares, 5 especies de *Fortunella*, 1 especie de *Poncirus*, 27 híbridos entre especies de cítricos y 51 híbridos intergenéricos entre cítricos y *Poncirus*. Las plantas con un mayor contenido en aurapteno son *C. paradisi* (0.432 mg/g de peso seco), *C. glaberrima* (0,408 mg/g), *C. hassaku* (0.58-1.14 mg/g), *C. medioglobosa* (1.453 mg/g), *C. natsudaidai* (0.586-1.04 mg/g), *C. ampullacea* (0.493 mg/g), *C. sinograndis* (0.56 mg/g), y *C. pseudoaurantium* (1.127 mg/g) (Matsumoto, Takumi, ed. 2008, Phytochemistry research progress. Nova Publishers).

En nuestro grupo de trabajo, hemos llevado a cabo el aislamiento y caracterización de

moléculas aisladas de fuentes naturales, tales como las moléculas terpénicas Criptotanshinona, la cual fue aislada de la raíz de la planta *Salvia brandegeei* (González-Ortiz A, Pulido-Capiz A, Castañeda-Sánchez CY, et al. (2022), *Cells*. 11(24):4069). Los resultados muestran que la criptotanshinona y la Doxorubicina, una antraciclina, inducen la quimiosensibilización en células de cáncer de mama triple negativo que muestran el fenómeno de quimioresistencia a Doxorubicina, el impacto terapéutico se debe al efecto de la criptotanshinon sobre la proteína eIF4A (González-Ortiz A, Pulido-Capiz A, Castañeda-Sánchez CY, et al. (2022), *Cells*. 11(24):4069). De manera que moléculas aisladas de fuentes naturales pueden tener una efectividad terapéutica en patologías como el cáncer de mama.

Otros miembros de la familia con potenciales funciones biológicas importantes son la Cumarina y la 4-metil-umbeliferona. La estructura de la Cumarina se deriva del ácido cinámico mediante ortohidroxilación, el núcleo benzo-2-pirona de las cumarinas simples se deriva del esqueleto fenilacrílico de los ácidos cinámicos, la isomerización trans-cis del doble enlace de la cadena lateral y lactonización. Asimismo, su derivado 4-metil-umbeliferona se caracteriza por tener un grupo metilo en el carbono 4. Las estructuras de ambas moléculas se encuentran en la Tabla 2.

La cumarina es insoluble en agua; sin embargo, la modificación del 4-hidroxi le confiere propiedades débilmente ácidas a la molécula que mejora su solubilidad en condiciones ligeramente alcalinas. Debido a sus propiedades bioquímicas, se ha propuesto el uso de cumarina y su derivado 4-metil-umbeliferona en investigaciones biomédicas, aunque se debe seguir profundizando en su caracterización.

Principalmente, el aurapteno puede presentar propiedades farmacológicas como antineoplásico, inductor de apoptosis, aunque también como agente neuroprotector, antihipertensivo y agonista de los receptores PPAR α , inhibidor de metaloproteinasas de matriz extracelular, antioxidante y agente hepatoprotector (Bibak B, Shakeri F, Barreto GE, et al. (2019) *Biofactors*. 45(6):867-879). Ohigashi *et al.* han descrito un perfil farmacocinético preliminar del aurapteno, así como su estabilidad química evaluada a través

de un modelo de digestión estomacal (Matsumoto, Takumi, ed. 2008, Phytochemistry research progress. Nova Publishers).

- Otra de las características del aurapteno, se debe a su actividad anti-inflamatoria, suprimiendo la generación del anión superóxido (O_2^-) durante experimentos *in vitro* en un modelo de inflamación de leucocitos (Murakami (2000), Carcinogenesis. 21,1843–50).
5 También se han reportado efectos neuroprotectores del aurapteno al suprimir respuestas inflamatorias en un modelo murino, durante la hiperactivación de microglía y astrocitos, así como la sobreexpresión de factores inflamatorios en astrocitos (Furukawa Y, Washimi Y-S, Hara R-I, et al. 2020, Molecules, 25,1117).
- 10 En este sentido, se ha reportado al aurapteno como un antioxidante eficaz que tiene efectos positivos en los ovocitos envejecidos post-ovulatorios, a través de la disminución de los radicales libres y en la activación del sistema antioxidante que controla la vía del factor Nrf2, modulando de esta manera el estrés oxidativo (Kim Y-H, Lee S-Y, Kim E-Y, et al. (2022). Antioxidants (Basel), 12, 87). Aunque de forma importante, el aurapteno ejerce una serie de
15 efectos anti-tumorales, induciendo condiciones de apoptosis y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de cáncer colorectal, así como efectos antiproliferativos al inducir el arresto del ciclo celular (Ebrahimi S, Soukhtanloo M, Mostafavi-Pour Z. (2023). Tissue Cell. 81:102004.).

20 *Efecto del aurapteno en ensayos In vitro*

- Se ha descrito que el aurapteno puede disminuir la proliferación de las células de cáncer de mama, además de disminuir la expresión del blanco proteico IGF-1, esta condición induce un aumento en la expresión de la ciclina D1 (Krishnan P, Yan KJ, Windler D, et al, 2009. BMC Cancer. 9:259). De forma importante, se ha observado que el aurapteno podría
25 modular al RE en un rango de concentraciones de 3.5-4.5 μ M, de igual manera también puede tener un efecto agonista sobre la expresión del factor TGF- α , ya que puede bloquear la vía de señalización del receptor EGF (de Medina P, Genovese S, Paillasse MR, et al.

2010, *Mol Pharmacol.* 78(5):827-36). Otro de los efectos que tiene el aurapteno es la inhibición de la enzima ACAT, lo cual puede conducir a la inhibición del ciclo celular (de Medina P, Genovese S, Paillasse MR, et al. 2010, *Mol Pharmacol.* 78(5):827-36).

Además, el aurapteno podría disminuir la proliferación de las líneas células MCF-7 y MDA-
5 MB-231 a través de la inhibición de las ciclina D1, así como del factor de crecimiento de
insulina (IGF-1) (Krishnan P, Kleiner-Hancock H. (2012). *Int. J. Breast Cancer.* 502092).
De forma complementaria, se ha descrito el efecto del aurapteno en varias líneas celulares
cancerígenas, donde podría actuar como sensibilizante a las terapias convencionales; por
ejemplo, en un reporte el aurapteno mejoró la radio-respuesta de linfoma de células T
10 (Bagheri R, Rassouli FB, Gholamhosseinian H, et al. (2022). *Dose Response.*
20(3):15593258221124479).

En otros reportes, se ha descrito que el aurapteno a una concentración de 10 μ M puede
inhibir el crecimiento de las células HT-29 y HT-116, las cuales son células colorrectales,
debido a que puede suprimir la expresión de CD166 y CD44 (Epifano, F., Genovese, S.,
15 Miller, R., et al. (2013). *Res.* 27 (5), 784–786). También se ha observado que el aurapteno
puede inhibir la expresión de las MMP-9 y MMP-2 en células de cáncer colorrectales
(Kawabata, K., Murakami, A., and Ohigashi, H. (2006a). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70,
3065). De forma importante, se han realizado tratamientos conjuntos de aurapteno y
radioterapia, en donde el aurapteno incrementa el efecto de la radioterapia induciendo a las
20 células a condiciones de apoptosis (Salari, H., Afkhami-Poostchi, A., Soleymanifard, S., et
al. et al. (2020). *Int. J. Radiat. Biol.* 96, 1051–1059).

De forma complementaria, se ha demostrado que el aurapteno puede inducir la apoptosis en
modelos de cáncer de próstata, esto es en células PC3 y DU145, debido a que aumenta la
activación de las caspasas 3 y 9 así como de Bax e inhibiendo a los blancos Bcl-2 y Mcl-1
25 (Lee JC, Shin E A, Kim B, et al. (2017). *Phytother. Res.* 31 (6), 891–898). Este efecto
también se encuentra presente en las células HeLa, en donde el aurapteno induce un efecto
citotóxico mediante la regulación de la vía de Mcl-1 (Motlagh FM and Gholami O (2017).
Indian J. Pharm. Sci. 78 (6), 827–833), además de promover la reducción de las MMP-2 y

MMP-9 (Jamialahmadi K, Salari S, Alamolhodaei NS, et al. (2018). *J. Pharmacopuncture*. 21 (3), 177–184). También se ha encontrado que, en células de cáncer del tallo esofágico, el aurapteno en tratamiento conjunto con cisplatino, paclitaxel, y 5-fluorouracilo, inducen un efecto sinérgico, el cual promueve la apoptosis celular (Saboor-Maleki S, Rassouli FB, 5
Matin MM, Iranshahi M (2017). *Technol Cancer Res Treat*. 16(4):519-527).

En otros documentos, se reporta el uso general de inhibidores de la enzima metaloproteinasa, dentro del grupo de inhibidores se incluye al aurapteno (United States Patent S20230101403A1. Method of treating or ameliorating cancers driven by receptor tyrosine kinase fusion oncogenes, and compositions for the same). Si bien se propone que 10
esta invención es para mejorar el cáncer, no resuelve el problema técnico del tratamiento de cáncer de mama. En otro documento (Patente CN1585647A. Compositions comprising matrine and dictamnine for treating or preventing cancer and other diseases), hacen referencia a la preparación de composiciones de las moléculas matrigna y dictamina para el tratamiento o prevención de cáncer y otras enfermedades, incluyendo el aurapteno, sin 15
embargo, solo muestran una preparación con otros compuestos naturales en conjunto con aurapteno, siendo esta composición su principal propuesta, pero no usan al aurapteno como el principal adyuvante para el tratamiento, incluso es el compuesto de menor concentración en la composición.

20

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Gráfica del efecto del tratamiento de las moléculas aurapteno, cumarina y 4-metil-umbeliferona sobre la viabilidad celular en células de cáncer de mama RE α +

Figura 2. Muestra la distribución del porcentaje de células RE α + en estado necrótico, apoptosis tardía y células viables debido al efecto del tratamiento con las moléculas aurapteno, cumarina y 4-metil-umbeliferona, a una concentración de 50 μ M. El ensayo usado fue de Anexina V-FITC y yoduro de propidio.

Figura 3. Muestra el efecto de las moléculas aurapteno, cumarina y 4-metil-umbeliferona a una concentración de 50 μ M sobre la expresión de genes proapoptóticos y antiapoptóticos en las células RE α +

Figura 4. Gráfica de viabilidad celular de los metabolitos activos del tamoxifeno, 4-OHTam y endoxifeno, sobre las células de cáncer de mama RE α +. Se incluyen los valores obtenidos de concentración inhibitoria 50 (CI50) de cada metabolito activo del tamoxifeno.

Figura 5. Gráficas de viabilidad celular del efecto conjunto de los metabolitos 4-OHTam y endoxifeno (8 μ M) y el aurapteno en un rango de concentración de 0-100 μ M, sobre las células de cáncer de mama RE α +

Figura 6. Análisis de viabilidad celular del tratamiento de los metabolitos endoxifeno y 4-OH-Tam en conjunto con aurapteno en células RE α +. En ese ensayo se incluye un control con células de cáncer de mama triple negativo, es decir células TNBC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención hace referencia a una propuesta novedosa enfocada al tratamiento del subtipo de cáncer de mama con sobreexpresión del receptor de estrógenos alfa (RE α). Esta estrategia involucra al uso del aurapteno como sensibilizador del RE α en conjunto con tamoxifeno, el cual es precursor de los metabolitos activos, 4-OHTam y endoxifeno, generando un efecto más potente sobre las células cancerosas RE α . El tratamiento conjunto representa una estrategia novedosa para el abordaje terapéutico del cáncer con características de sobreexpresión del RE α .

El uso del aurapteno como una estrategia como agente sensibilizante en el cáncer de mama receptor de estrógenos positivo dentro de la terapia convencional con tamoxifeno, podría ayudar a mejorar la respuesta a la terapia con los SERMS (el uso del aurapteno como una estrategia de sensibilización).

Esta invención requiere el uso específicamente del aurapteno ó *7-geraniloxicoumarina* para el tratamiento de cáncer de mama con sobreexpresión de RE. El uso de esta molécula representa una cualidad novedosa, la cual se determinó con base en resultados que indican la capacidad del aurapteno para poder bloquear al RE α en células cancerosas que sobreexpresan a este receptor nuclear. En primera instancia, la información se generó a través de la herramienta de cómputo denominada Reposicionamiento Molecular (Molecular Operating Environment (MOE), 2022.02 Chemical Computing Group ULC, 910-1010 Sherbrooke St. W., Montreal, QC H3A 2R7, Canadá, 2024.), en dónde se obtienen valores de afinidad de la proteína con ligandos. Mediante la herramienta computacional mencionada, se obtuvo un valor de ΔG de -9.12 kcal/mol para la interacción aurapteno con la estructura tridimensional del RE α . Dentro de esta caracterización, se incluyó la evaluación de moléculas como la 4-metil umbelliferona con un $\Delta G = -7.44$ kcal/mol, así como la cumarina con un $\Delta G = -6.37$ kcal/mol. En este caso, se usó como molécula de referencia al ligando fisiológico del RE α , la hormona Estradiol, con un $\Delta G = -7.22$ kcal/mol) como se visualiza en la Tabla 1. De las moléculas evaluadas, el aurapteno presentó el valor

de afinidad más alto sobre el RE α , mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1. Valor de afinidad de las moléculas por el receptor de estrógenos alfa mediante Docking Molecular

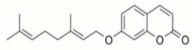
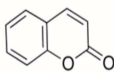
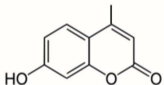
Moléculas	Valor de afinidad con el receptor de estrógenos (PDB: 1A52)
Aurapteno	-9.1200
4-metil umbelliferona	-7.4478
Estradiol	-7.2290
Cumarina	-6.3782

5

De manera que el aurapteno es una pieza fundamental para el diseño de un nuevo esquema de tratamiento para el tipo de cáncer de mama RE α +, mostrando el valor más alto de afinidad al RE α en las moléculas evaluadas. Basado en estos resultados, se amplió la caracterización del aurapteno, así como de las moléculas 4-metil umbelliferona y cumarina.

- 10 El efecto de las moléculas aurapteno, 4-metil umbelliferona y cumarina fue evaluado mediante el ensayo estandarizado de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que mide la actividad metabólica como indicador de la viabilidad y proliferación celular. Para lo cual se usó un modelo de células de cáncer de mama con sobreexpresión del RE+, denominadas células MCF-7 obtenidas de la American
- 15 Type Culture Collection. De manera que los cultivos de células MCF-7 fueron sometidos a tratamientos con concentraciones crecientes de las moléculas cumarinas umbeliferonas en un rango de concentración de 0-150 μ M por 48 h. Los datos arrojan que el aurapteno fue la molécula en la cual se obtuvo el valor más bajo de concentración inhibitoria 50 (CI50) sobre la viabilidad celular (50.79 μ M), en cambio para la cumarina fue de 91.86 μ M y para la 4-
- 20 metil umbelliferona de 73.72 μ M (Figura 1, Tabla 2). Considerando los resultados, el mayor efecto celular fue ejercido por el aurapteno, siendo importante los grupos químicos cumarina y la cadena alifática que forman parte de la estructura del aurapteno como se demuestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de concentración inhibitoria 50 (CI50) y estructuras de las moléculas estudiadas

Moléculas	CI ₅₀ (μM) ± D. E. (n =3, ensayos biológicos)	Estructura
★ Aurapteno	50.79 ± 9.3	
◆ Cumarina	91.86 ± 29.8	
■ 4-Metil umbeliferona	73.21 ± 8.2	

Posteriormente, nos centramos en la caracterización del efecto de las moléculas a través del ensayo de Anexina-V/Yoduro de Propidio para evaluar los diferentes estadios de la apoptosis, inducidos por el tratamiento con las moléculas. La evidencia indica que bajo el tratamiento con aurapteno se inducen los niveles más altos en términos de porcentaje de células en apoptosis (29.31 %) y apoptosis tardía (38.97 %) (Figura 2). Sin embargo, bajo el tratamiento con las moléculas cumarina y 4-metil umbeliferona, los porcentajes de células en apoptosis y apoptosis tardía fueron mínimos. Para la cumarina, los valores de apoptosis fueron de 1.78 % y de apoptosis tardía de 3.56 %. En el caso de la 4-metil umbeliferona, los valores fueron de 5.49 % de apoptosis y de 8.19 % de apoptosis tardía. Los datos indican que el efecto más potente sobre el efecto de los fenómenos de apoptosis es el ejercido por el aurapteno (Figura 2).

Nuestros datos sugieren una alta especificidad del tratamiento con aurapteno por el subtipo REα de cáncer de mama. Cabe mencionar que el aurapteno es una molécula que es obtenida de una fuente natural, aunque encontrada en concentraciones bajas. Sin embargo, concentraciones cercanas a 50 μM pueden inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis, de acuerdo a nuestros resultados.

El aurapteno como modulador de vías proapoptóticas e inhibición de las antiapoptóticas

Considerando el efecto inductor de la apoptosis ejercido por el aurapteno, se estudiaron proteínas representativas que nos identificaron el proceso de apoptosis. Bajo la concentración de 50 μ M de las moléculas, se llevó a cabo el tratamiento sobre las células RE+ MCF-7, los datos sugieren que el aurapteno indujo una drástica disminución en la expresión de las proteínas anti-apoptóticas tales como XIAP y Bcl-2, esta situación no se mostró con el tratamiento con las moléculas cumarina y 4-metil umbelliferona (Figura 3). Este dato confirma el potencial farmacológico del aurapteno.

Posteriormente bajo las mismas condiciones experimentales, en la evaluación del blanco que induce apoptosis, Bax, bajo la incubación con la molécula aurapteno se encontró su activación. No obstante, la activación de Bax no se reportó en el tratamiento con las moléculas cumarina y 4-metil umbelliferona (Figura 3).

Como una evidencia crítica del proceso regulatorio que ejerce el aurapteno, al evaluar la expresión del RE α bajo el tratamiento con aurapteno se encontró una reducción significativa en su expresión. Esta respuesta no se reportó bajo el tratamiento con la cumarina y la 4-metil umbelliferona (Figura 3), de manera que el aurapteno ejerce un efecto importante sobre la inhibición del RE α , así como sobre las proteínas anti-apoptóticas XIAP y Bcl-2. De forma importante, únicamente el tratamiento con aurapteno indujo la activación de la proteína proapoptótica Bax. De esta forma podría ampliarse su uso como una estrategia adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama RE+ en conjunto con la terapia estándar de tamoxifeno.

Evaluación del efecto de las moléculas activas del tamoxifeno

Como parte del sistema de invención, se evaluaron a los metabolitos activos del tamoxifeno que se encuentran en mayores concentraciones plasmáticas, que son los inhibidores farmacológicos del RE α . En este caso, la evaluación estuvo centrada en el 4-OHTam y el endoxifeno, los cuales se usaron con una pureza mayor al 98 %. Con estas consideraciones, se llevaron a cabo los experimentos correspondientes de viabilidad celular con el 4-OHTam

y el endoxifeno.

Para esta determinación experimental, se usaron a las células RE⁺, las cuales fueron tratadas con un rango de concentración de los metabolitos activos del tamoxifeno de 0-32 μ M. Los datos referidos muestran un efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular bajo el tratamiento de los metabolitos, encontrando valores de CI₅₀ de 5.91 μ M para el endoxifeno y de 10.49 μ M para el 4-OHTam (Figura 4). Esta condición es relevante, ya que es la primera vez que se usan los metabolitos farmacológicamente activos (Figura 4). Los resultados obtenidos son base para que se puedan sensibilizar a las células de cáncer de mama RE α ⁺ mediante una estrategia farmacológica adecuada.

10

EJEMPLO DE USO

Una vez demostrado el efecto biológico del aurapteno en las células RE α ⁺ como se demuestra en la tabla 3, se amplió su caracterización para demostrar su eficacia farmacológica. En la presente estrategia experimental, se usó un enfoque sinérgico basado en el tratamiento con aurapteno y los metabolitos 4-OHTam y endoxifeno.

15

A través de una primera estrategia experimental, en la que se usaron cultivos de células RE α ⁺, se diseñaron tratamientos en los que se mantuvo constante la dosis de tratamiento de 4-OHTam (8 μ M) y de forma conjunta se llevó a cabo el tratamiento en un rango de concentración creciente de la molécula aurapteno (25-100 μ M) (Figura 5A). Los datos arrojan un fenómeno de quimio sensibilización inducido por el tratamiento con aurapteno, en donde se redujo de forma importante la viabilidad celular desde la concentración más baja de aurapteno (25 μ M). Esta misma estrategia de tratamiento se siguió con el endoxifeno manteniendo una concentración constante en el tratamiento de 8 μ M y de forma conjunta un rango de concentración de aurapteno (25-100 μ M); los resultados arrojaron un resultado similar (Figura 5B), reportando un fenómeno de quimiosensibilización en la viabilidad celular desde la concentración más baja de aurapteno (25 μ M). Los datos sugieren una alta potencia del efecto sinérgico del tratamiento combinado entre los metabolitos activos del tamoxifeno y el aurapteno.

25

Como estrategia se amplió la evidencia, se llevaron a cabo los tratamientos manteniendo constante la concentración de los metabolitos (8 μM) y ejerciendo el tratamiento de forma conjunta con aurapteno en un rango de concentración de 1-35 μM . Bajo la misma estrategia experimental, se llevaron a cabo tratamientos con células control del tipo de cáncer triple negativo (TNBC) que no presentan la sobreexpresión del RE α , para esta ronda experimental se evaluaron a las células MDA-MB-231 de la ATCC.

Los datos indican una respuesta sinérgica del efecto del aurapteno (1-35 μM) bajo el tratamiento con la dosis de endoxifeno (8 μM); de manera que se registró un efecto terapéutico sobre la viabilidad de las células de cáncer RE α + (Figura 6A). En donde de acuerdo a nuestros resultados el tratamiento no mostró un efecto terapéutico sobre células TNBC (Figura 6A). De esta manera, los resultados arrojan que en las células RE α +, el tratamiento de endoxifeno indujo una disminución en la CI₅₀ del aurapteno, generando un cambio en los datos de 47.49 μM bajo el tratamiento con aurapteno a 13.34 μM en el tratamiento conjunto de endoxifeno (Tabla 3). En el caso de los resultados con las células TNBC, se registró un valor de CI₅₀ del aurapteno de 76.7 μM , y el tratamiento combinado de las moléculas aurapteno y endoxifeno mostró un valor de 52.6 μM como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de CI₅₀ obtenidos del tratamiento conjunto del aurapteno (1-50 μM) en combinación con los metabolitos 4-OHTam (8 μM) y endoxifeno (8 μM) en células de cáncer de mama RE+ y células triple negativo (TNBC).

CI ₅₀	Aurapteno (μM)	Aurapteno + Endofeno (μM)	Aurapteno + 4-OHTam (μM)
Células RE α +	47.49	13.34	12.69
Células TNBC	76.75	52.68	80.65

De igual forma, en la caracterización de la terapéutica del efecto del 4-OHTam (8 μM) en conjunto con el aurapteno (1-35 μM) (Figura 6B); encontramos un efecto sensibilizador ejercido por el aurapteno, desde la concentración de 25 μM se logró reducir la viabilidad

por debajo del 50 %. De forma importante, bajo este mismo esquema experimental en las células TNBC no se registró el efecto sensibilizador, lo cual es sugerente de la especificidad del tratamiento por el tipo de cáncer que sobreexpresa al RE α +

Los resultados arrojan que el tratamiento de 4-OHTam induce una disminución en la CI50 del aurapteno, induciendo una reducción en la CI50, de un valor de 47.49 μ M a 12.69 μ M (Tabla 3). En el caso de los resultados con las células TNBC, se registró un valor de CI50 del aurapteno de 76.7 μ M, y el tratamiento combinado de las moléculas aurapteno y endoxifeno 4-OHTa mostró un valor de 80.65 μ M (Tabla 3). De manera que es novedosa la invención y específica para el tipo de cáncer con sobreexpresión del RE α , indicando los resultados un efecto significativo del tratamiento sensibilizante del aurapteno y los metabolitos 4-OHTam y endoxifeno.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Aurapteno para el uso en el tratamiento del cáncer de mama para el subtipo del RE α +
- 5 2. Aurapteno para usarse de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el aurapteno se usa en combinación con tamoxifeno.
3. El uso de aurapteno para preparar un medicamento útil en el tratamiento de cáncer de mama para el subtipo de RE α +
4. El uso de aurapteno como se reclama en la reivindicación 3, caracterizado porque se usa para preparar un medicamento en combinación con tamoxifeno.
- 10 5. Uso de la molécula aurapteno (0-100 μ M) de conformidad con la reivindicación 1, como método de tratamiento con el fármaco tamoxifeno, como estrategia de sinergia en el cáncer de mama RE α +

15

20

RESUMEN

La invención propone un tratamiento innovador para el cáncer de mama que sobreexpresa el receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$), combinando la molécula de origen natural aurapteno y tamoxifeno. El aurapteno, específicamente 7-geraniloxicoumarina, muestra una alta
5 afinidad con $RE\alpha$, lo que lo hace crucial en este tratamiento. Se demostró que el aurapteno reduce la viabilidad celular en células MCF-7, que sobreexpresan $RE+$, siendo más efectivo que otras moléculas de la familia de las cumarinas. Además, induce apoptosis y reduce la expresión de proteínas anti-apoptóticas como XIAP y Bcl-2, siendo su blanco el $RE\alpha$. Por primera vez, se investigó el uso de los metabolitos activos del tamoxifeno, endoxifeno y 4-
10 OHTam, en células $RE\alpha+$, mostrando un efecto inhibitorio en la viabilidad celular. Se observó una interacción sinérgica entre el aurapteno y el endoxifeno en células $RE\alpha+$, sugiriendo un potencial terapéutico específico para estas células. Estos hallazgos destacan la innovación y la especificidad del tratamiento combinado con aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno para el cáncer de mama con sobreexpresión de $RE\alpha$.

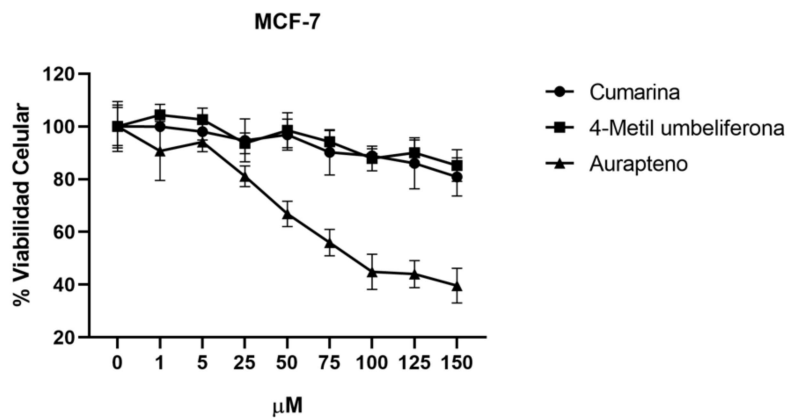


Figura 1

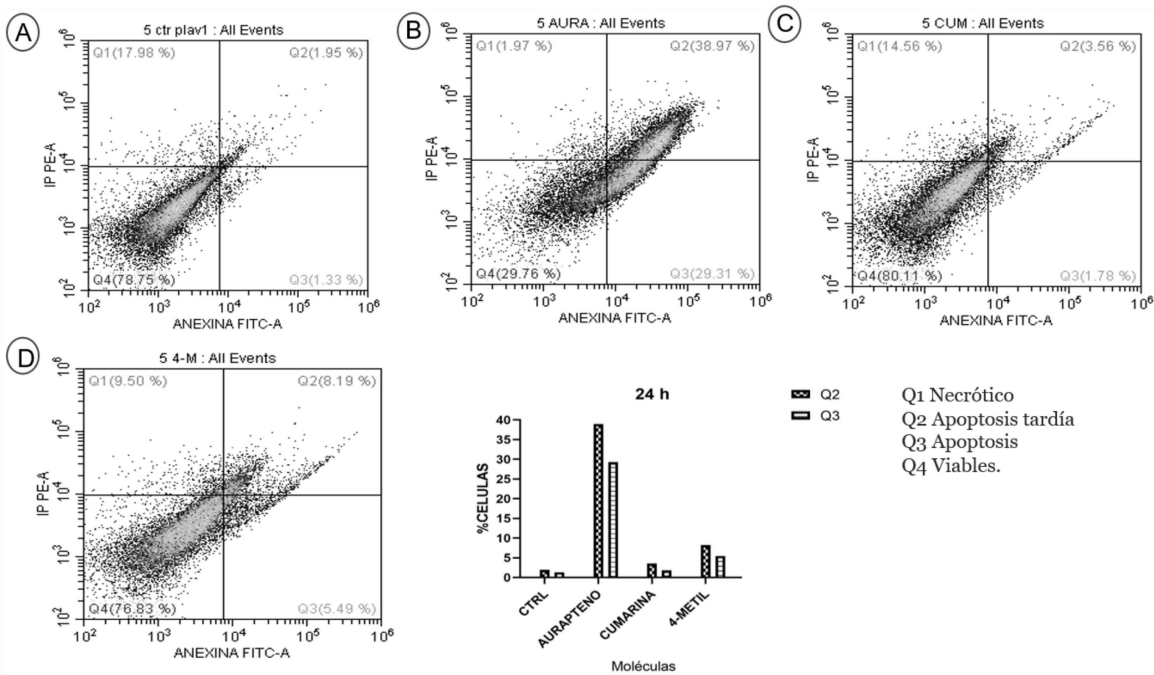


Figura 2

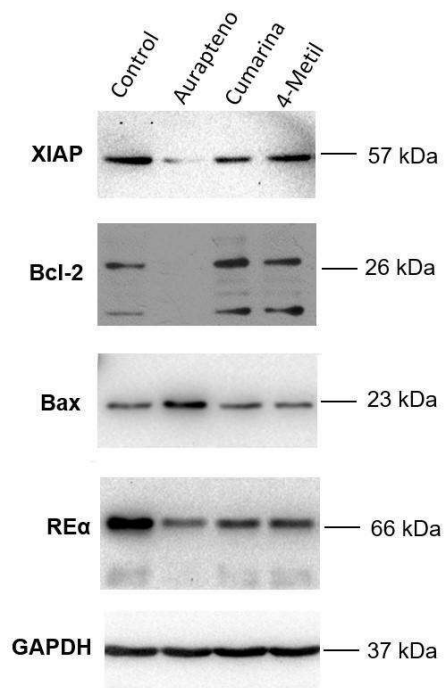


Figura 3

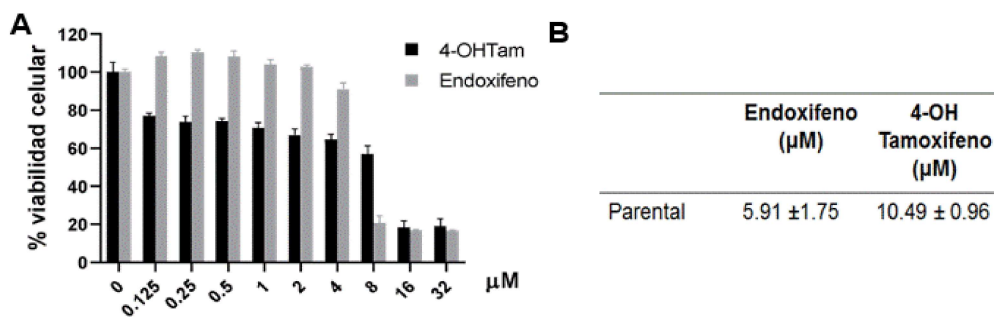


Figura 4

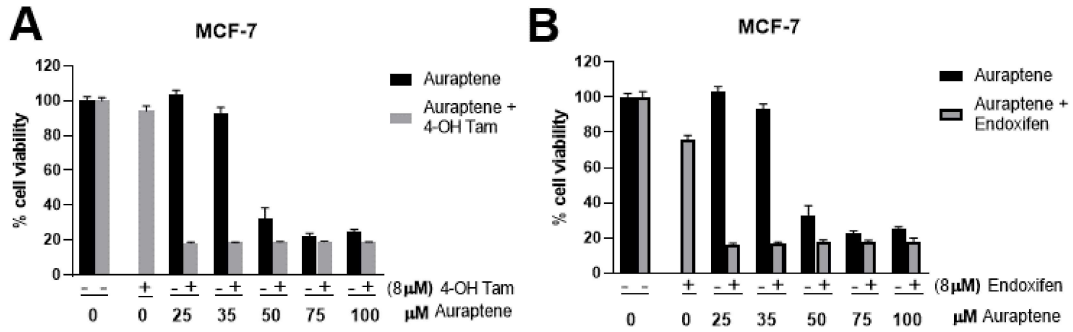


Figura 5

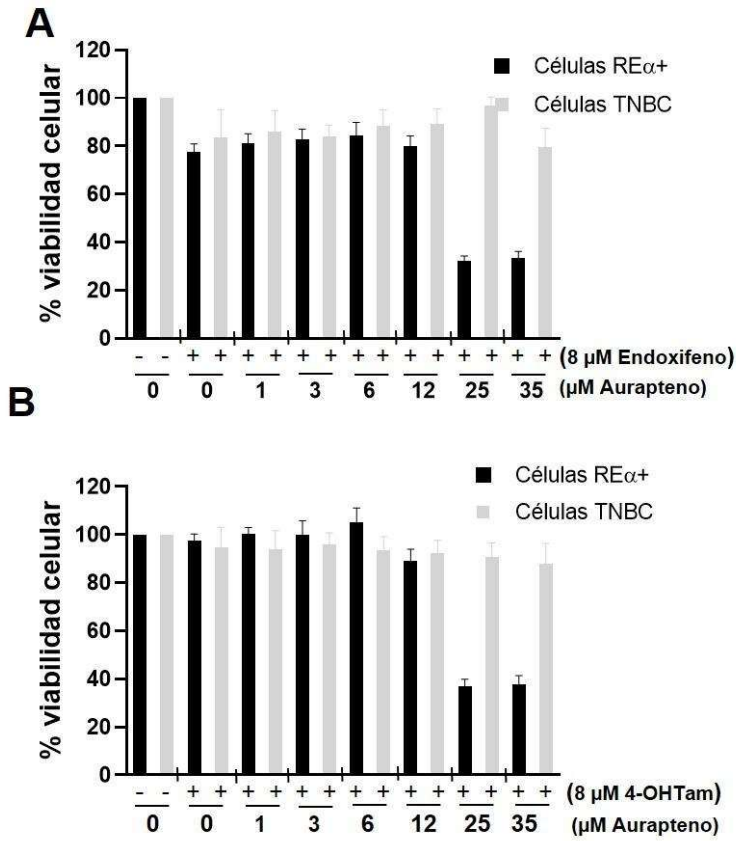


Figura 6

CESIÓN DE DERECHOS

Mexicali, Baja California a x16 de mayo de 2024

Que celebran por una parte Alondra Elizabeth Campos Valenzuela, a quien en lo sucesivo se le denominará "cedente", y la persona jurídica denominada Universidad Autónoma de Baja California (UABC), representada en este acto por Narciso Flores Romero en su carácter de Jefe del Departamento de Propiedad Intelectual y Transferencia y representante legal de la UABC, a quien en lo sucesivo se le denominará "cesionario", los cuales se sujetan al tenor de las siguientes declaraciones y cláusulas:

DECLARACIONES

I. El cesionario:

I.1. Que es una institución de servicio público, descentralizada de la administración del Estado Mexicano, dotada de plena capacidad jurídica de conformidad con lo estipulado en el artículo 1º de su Ley Orgánica publicada el 28 de febrero de 1957 en el Periódico Oficial del Gobierno del Estado de Baja California.

I.2 Que a Narciso Flores Romero, le fue otorgado un poder general para pleitos y cobranzas, facultándola para realizar cualquier tipo de gestiones y trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, relativo a las funciones, atribuciones y facultades jurídicas de la Universidad Autónoma de Baja California, lo que consta en el instrumento 81,683 volumen 1,361 con fecha 20 de abril de 2023, otorgado ante la fe del notario público número 1 del municipio de Mexicali, B.C. Lic. Héctor Manuel Acosta Moreno.

II. El cedente:

II.1. Que es una persona física, de nacionalidad mexicana, mayor de edad, con plena capacidad jurídica para contraer obligaciones, acreditado mediante identificación oficial número 0565118627823.

II.2. Que en materia de propiedad intelectual se sujeta a los términos que establecen 5, 6, 9, 10 y 19 del Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California, así como a la normatividad vigente que resulte aplicable.

II.3. Que ha colaborado en el desarrollo de la invención denominada "USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO RE+ DE CÁNCER DE MAMA". misma que es susceptible de ser protegida por una o más figuras jurídicas de propiedad industrial, sujeto al procedimiento establecido por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial.

CLÁUSULAS

PRIMERA.- Ambas partes reconocen mutuamente la personalidad con que actúan en el presente instrumento jurídico y expresan su libre voluntad de celebrarlo.

SEGUNDA.- Que el "cesionario" reconoce la calidad de inventor del "cedente" en los términos del artículo 6 del Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California.

TERCERA.- Que el "cedente" acuerda que el "cesionario" dispondrá lo que por derecho le corresponda en lo relacionado a la invención denominada "USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO RE+ DE CÁNCER DE MAMA".

CUARTA.- Que el "cedente" acepta que el presente acuerdo será vigente a partir de la fecha en que se suscribe con el "cesionario", y que continuará durante el periodo de protección contemplado por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial para el registro de la(s) figura(s) jurídica(s) de propiedad industrial

QUINTO.- Que tanto el "cedente" como el "cesionario" aceptan los derechos y obligaciones que se desprenden de la firma del presente instrumento jurídico.

Leído el presente documento, los firmantes se comprometen al cumplimiento del mismo.
Mexicali, Baja California a 6 de junio de 2023.

"Cedente"

Alondra Elizabeth Campos Valenzuela

"Cesionario"

Narciso Flores Romero
Jefe del Departamento de Propiedad Intelectual y
Transferencia

TESTIGOS

Víctor Guadalupe García Gonzales

Angel Armando Pulido Capiz

CESIÓN DE DERECHOS

Mexicali, Baja California a 16 de mayo de 2024

Que celebran por una parte Angel Armando Pulido Capiz, a quien en lo sucesivo se le denominará "cedente", y la persona jurídica denominada Universidad Autónoma de Baja California (UABC), representada en este acto por Narciso Flores Romero en su carácter de jefe del Departamento de Propiedad Intelectual y Transferencia y representante legal de la UABC, a quien en lo sucesivo se le denominará "cesionario", los cuales se sujetan al tenor de las siguientes declaraciones y cláusulas:

DECLARACIONES

I. El cesionario:

I.1. Que es una institución de servicio público, descentralizada de la administración del Estado Mexicano, dotada de plena capacidad jurídica de conformidad con lo estipulado en el artículo 1º de su Ley Orgánica publicada el 28 de febrero de 1957 en el Periódico Oficial del Gobierno del Estado de Baja California.

I.2 Que a Narciso Flores Romero, le fue otorgado un poder general para pleitos y cobranzas, facultándola para realizar cualquier tipo de gestiones y trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, relativo a las funciones, atribuciones y facultades jurídicas de la Universidad Autónoma de Baja California, lo que consta en el instrumento 81,683 volumen 1,361 con fecha 20 de abril de 2023, otorgado ante la fe del notario público número 1 del municipio de Mexicali, B.C. Lic. Héctor Manuel Acosta Moreno.

II. El cedente:

II.1. Que es una persona física, de nacionalidad mexicana, mayor de edad, con plena capacidad jurídica para contraer obligaciones, acreditado mediante identificación oficial número 0324075234425

II.2. Que en materia de propiedad intelectual se sujeta a los términos que establecen 5, 6, 9, 10 y 19 del Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California, así como a la normatividad vigente que resulte aplicable.

II.3. Que ha colaborado en el desarrollo de la invención denominada "**USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO RE+ DE CÁNCER DE MAMA**". misma que es susceptible de ser protegida por una o más figuras jurídicas de propiedad industrial, sujeto al procedimiento establecido por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial.

CLÁUSULAS

PRIMERA.- Ambas partes reconocen mutuamente la personalidad con que actúan en el presente instrumento jurídico y expresan su libre voluntad de celebrarlo.

SEGUNDA.- Que el "cesionario" reconoce la calidad de inventor del "cedente" en los términos del artículo 6 del Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California.

TERCERA.- Que el "cedente" acuerda que el "cesionario" dispondrá lo que por derecho le corresponda en lo relacionado a la invención denominada denominada **"USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO RE+ DE CÁNCER DE MAMA"**.

CUARTA.- Que el "cedente" acepta que el presente acuerdo será vigente a partir de la fecha en que se suscribe con el "cesionario", y que continuará durante el periodo de protección contemplado por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial para el registro de la(s) figura(s) jurídica(s) de propiedad industrial

QUINTO.- Que tanto el "cedente" como el "cesionario" aceptan los derechos y obligaciones que se desprenden de la firma del presente instrumento jurídico.

Leído el presente documento, los firmantes se comprometen al cumplimiento del mismo.
Mexicali, Baja California a 6 de junio de 2023.

"Cedente"

Angel Armando Pulido Capiz

"Cesionario"

Narciso Flores Romero
Jefe del Departamento de Propiedad Intelectual y
Transferencia

TESTIGOS

Víctor Guadalupe García González

Alondra Elizabeth Campos Valenzuela

CESIÓN DE DERECHOS

Mexicali, Baja California a 16 de mayo de 2024

Que celebran por una parte Víctor Guadalupe García González, a quien en lo sucesivo se le denominará "cedente", y la persona jurídica denominada Universidad Autónoma de Baja California (UABC), representada en este acto por Narciso Flores Romero en su carácter de jefe del Departamento de Propiedad Intelectual y Transferencia y representante legal de la UABC, a quien en lo sucesivo se le denominará "cesionario", los cuales se sujetan al tenor de las siguientes declaraciones y cláusulas:

DECLARACIONES

I. El cesionario:

I.1. Que es una institución de servicio público, descentralizada de la administración del Estado Mexicano, dotada de plena capacidad jurídica de conformidad con lo estipulado en el artículo 1º de su Ley Orgánica publicada el 28 de febrero de 1957 en el Periódico Oficial del Gobierno del Estado de Baja California.

I.2 Que a Narciso Flores Romero, le fue otorgado un poder general para pleitos y cobranzas, facultándola para realizar cualquier tipo de gestiones y trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, relativo a las funciones, atribuciones y facultades jurídicas de la Universidad Autónoma de Baja California, lo que consta en el instrumento 81,683 volumen 1,361 con fecha 20 de abril de 2023, otorgado ante la fe del notario público número 1 del municipio de Mexicali, B.C. Lic. Héctor Manuel Acosta Moreno.

II. El cedente:

II.1. Que es una persona física, de nacionalidad mexicana, mayor de edad, con plena capacidad jurídica para contraer obligaciones, acreditado mediante identificación oficial número 0303060163172.

II.2. Que en materia de propiedad intelectual se sujeta a los términos que establecen 5, 6, 9, 10 y 19 del Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California, así como a la normatividad vigente que resulte aplicable.

II.3. Que ha colaborado en el desarrollo de la invención denominada **"USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO RE+ DE CÁNCER DE MAMA"**, misma que es susceptible de ser protegida por una o más figuras jurídicas de propiedad industrial, sujeto al procedimiento establecido por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial.

CLÁUSULAS

PRIMERA.- Ambas partes reconocen mutuamente la personalidad con que actúan en el presente instrumento jurídico y expresan su libre voluntad de celebrarlo.

SEGUNDA.- Que el "cesionario" reconoce la calidad de inventor del "cedente" en los términos del artículo 6 del Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California.

TERCERA.- Que el "cedente" acuerda que el "cesionario" dispondrá lo que por derecho le corresponda en lo relacionado a la invención denominada denominada **"USO DEL AURAPTENO COMO SENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO CON TAMOXIFENO EN UN MODELO RE+ DE CÁNCER DE MAMA"**.

CUARTA.- Que el "cedente" acepta que el presente acuerdo será vigente a partir de la fecha en que se suscribe con el "cesionario", y que continuará durante el periodo de protección contemplado por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial para el registro de la(s) figura(s) jurídica(s) de propiedad industrial

QUINTO.- Que tanto el "cedente" como el "cesionario" aceptan los derechos y obligaciones que se desprenden de la firma del presente instrumento jurídico.

Leído el presente documento, los firmantes se comprometen al cumplimiento del mismo.
Mexicali, Baja California a 6 de junio de 2023.

"Cedente"



Víctor Guadalupe García González

"Cesionario"



Narciso Flores Romero
Jefe del Departamento de Propiedad Intelectual y
Transferencia

TESTIGOS



Angel Armando Pulido Capiz



Alondra Elizabeth Campos Valenzuela

Certificado de acuse de
recibo registro:
MX/2024/037190

Expediente de Patente **MX/a/2024/006501**

Asunto: Se informa resultado del examen de forma.

Ciudad de México, a 3 de junio de 2024.
No. Folio: **48682**

Narciso FLORES ROMERO
Apoderado de
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
SAN VICENTE 97
EL REFUGIO
21440, TECATE, Baja California Norte, México

REF: Se da acuse de recibo a su Solicitud

En términos de lo dispuesto por el artículo 106 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial y artículos 18, 19 y 26 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; se tiene por satisfecho el examen de forma al haber cumplido con lo dispuesto por la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial y el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial, aplicable a la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial en términos de lo dispuesto por el artículo Cuarto Transitorio del DECRETO por el que se expide la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial y se abroga la Ley de la Propiedad Industrial publicado en el Diario Oficial de la Federación del día 01 de julio de 2020.

Por lo anterior, de conformidad con los artículos 107 y 108 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial y artículo 9 del Acuerdo por el que se establecen los plazos de respuesta a diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, una vez **aprobado** el examen de forma, **la publicación en Gaceta de la presente solicitud de patente en trámite**, tendrá lugar después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, la cual contendrá los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, **el penúltimo párrafo del artículo 107 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículo 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial y 10 del Acuerdo** por el que se establecen los plazos de respuesta a diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, prevén que a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente



MX/2024/48682



podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad con el artículo 109 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, **en relación con lo dispuesto en el artículo 23 del** Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de **dos meses** posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 47 y 49 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 5° fracciones I y XIX, 9 y 10 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1°, 2°, 3° fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guion, 4°, 5° y 12° fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1°, 2°, 3°, 4°, 5° fracción V inciso a) sub inciso i), segundo guion, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1°, 3° y 5° fracciones VII y XV y penúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento.

El presente documento electrónico, su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1° fracción III; 2° fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

A T E N T A M E N T E
COORDINADOR DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE
FORMA
OMAR SANTIAGO GÁLVEZ CASTILLO.
OSGC/ISG/2024



Cadena Original

OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO|00001000000705235735|SERVICIO DE ADMINISTRACION TRIBUTARIA|1796|FOR|MX/2024/48682|MX/a/2024/006501|Favorable|1846|ISG| Pág(s) 2|vCB9aArnXhEU3TGpZigCkNS7Dwc=




Sello Digital

gbKhwqxBvfWUtInV+JWtjEB1QYpkgVo3KOOOr93lut0EBvTsgj34KifFkNfwi scbG561KCsIAY2QzLL4DMcBdigVt+XQ0FhNm4lv6/7bEhVGW2vpUsUbDo9Y1 pE1E3JnVWZHCwGmzBhOiy+t0og8BdLC364eJMdCN4imHVbu2hB8fAbjPaw6 h 630A987XxaEsiaQm/zLZ14nEOgNCorZb+KaOK06kVLoQfMSBtC+KyMq36YfA E8o8jyBxn7dHkXeQFbgAv9fgv9osQjN5nmstxti+sK4Y8uUtdmnxRpnAPvaj nDMTjffRt8rGsA4Hw3b3FhGrGOcqO4ylaRQRgXAnmA==

Para verificar la autenticidad del presente documento, podrá ingresar a la página electrónica <https://validadocumento.impi.gob.mx/>, escaneando el código bidimensional QR que aparece a un costado de la e-firma del Servidor Público que signó el mismo, indicando, en su caso, el tipo de documento que pretende validar (solicitud, acuse, oficio o promoción); lo anterior, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; en caso de no contar con lector QR o en su defecto no pueda ser leído por su dispositivo, digitar en la página antes referida el siguiente código: gEys1Fi46Q6nuekL0nDkuX5HczQ=

Article

Auraptene Boosts the Efficacy of the Tamoxifen Metabolites Endoxifen and 4-OH-Tamoxifen in a Chemoresistant ER+ Breast Cancer Model

Angel Pulido-Capiz ^{1,2} , Brenda Chimal-Vega ^{1,2}, Luis Pablo Avila-Barrientos ³, Alondra Campos-Valenzuela ^{1,2}, Raúl Díaz-Molina ^{1,2} , Raquel Muñiz-Salazar ⁴ , Octavio Galindo-Hernández ^{1,2}  and Victor García-González ^{1,2,*} 

- ¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico; pulido.angel@uabc.edu.mx (A.P.-C.); brenda.chimal@uabc.edu.mx (B.C.-V.); campos.alondra85@uabc.edu.mx (A.C.-V.); rauldiaz@uabc.edu.mx (R.D.-M.); octavio.galindo@uabc.edu.mx (O.G.-H.)
- ² Laboratorio Multidisciplinario de Estudios Metabólicos y Cáncer, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico
- ³ Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam, Germany; luispablo.barrientos@mpimp-golm.mpg.de
- ⁴ Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California, Campus Ensenada, Ensenada 22890, Mexico; ramusal@uabc.edu.mx
- * Correspondence: vgarcia62@uabc.edu.mx; Tel.: +52-686-5571622 (ext. 45309)

Abstract: Approximately 80% of breast cancer (BC) cases are estrogen receptor positive (ER+) and sensitive to hormone treatment; Tamoxifen is a prodrug, and its main plasmatic active metabolites are 4-hydroxytamoxifen (4-OH Tam) and endoxifen. Despite the effectiveness of tamoxifen therapy, resistance can be developed. An increment in eukaryotic initiation factor-4A complex (eIF4A) activity can result in tamoxifen-resistant tumor cells. For this work, we developed a cell variant resistant to 4-OH Tam and endoxifen, denominated MCF-7^{Var E}; then, the aim of this research was to reverse the acquired resistance of this variant to tamoxifen metabolites by incorporating the natural compound auraptene. Combination treatments of tamoxifen derivatives and auraptene successfully sensitized the chemoresistant MCF-7^{Var E}. Our data suggest a dual regulation of eIF4A and ER by auraptene. Joint treatments of 4-OH Tam and endoxifen with auraptene identified a novel focus for chemoresistance disruption. Synergy was observed using the auraptene molecule and tamoxifen-derived metabolites, which induced a sensitization in MCF-7^{Var E} cells and ER α parental cells that was not observed in triple-negative breast cancer cells (TNBC). Our results suggest a synergistic effect between auraptene and tamoxifen metabolites in a resistant ER+ breast cancer model, which could represent the first step to achieving a pharmacologic strategy.

Keywords: auraptene; breast cancer; estrogen receptor; resistance; eukaryotic initiation factor-4A complex



Citation: Pulido-Capiz, A.; Chimal-Vega, B.; Avila-Barrientos, L.P.; Campos-Valenzuela, A.; Diaz-Molina, R.; Muñiz-Salazar, R.; Galindo-Hernández, O.; García-González, V. Auraptene Boosts the Efficacy of the Tamoxifen Metabolites Endoxifen and 4-OH-Tamoxifen in a Chemoresistant ER+ Breast Cancer Model. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 1179. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091179>

Academic Editors: Thomas Efferth, Michele Navarra, Santa Cirmi and Alessandro Maugeri

Received: 7 July 2024

Revised: 22 August 2024

Accepted: 3 September 2024

Published: 6 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer (BC) is a heterogeneous disease classified into the following molecular subtypes: estrogen receptor positive α (ER α), epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+), and triple negative (TNBC) [1]. Approximately 80% of BC cases are estrogen receptor positive (ER+) [1]. One of the most widely used drugs for the treatment of BC ER+ is tamoxifen, a selective ER modulator that competes with its natural ligand, estradiol (E2), an estrogen hormone playing a critical role in breast tissue growth, development, and function [2]. Tamoxifen is classified as a prodrug due to its transformation into active metabolites upon metabolism. These metabolites include N-desmethyltamoxifen (NMD), 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen (endoxifen), and 4-hydroxytamoxifen (4-OH Tam), which exhibit significantly 30 to 100 times greater affinity for ER compared to tamoxifen itself [3].

Although one of the most recurrent treatments against ER+ BC is tamoxifen, some patients develop a resistance to this drug. Particularly, there are reports on the acquisition of 4-OH Tam resistance for ER inhibition [3]; however, there is limited information available regarding resistance to the more potent metabolite, endoxifen. Moreover, 4-OH Tam and endoxifen are the main plasmatic metabolites. The emergence of chemoresistance at various stages has significantly increased the complexity of BC treatment [4].

Several mechanisms have been elucidated to explain how neoplastic cells develop resistance to therapy. These include diminished prodrug activation, heightened expression of efflux pumps, reduced drug internalization [5], and the activation of enzymatic systems responsible for drug catabolism.

Likewise, one of the causes of resistance to tamoxifen is the decrease in ER expression through transcriptional suppression, causing a phenotype transformation or changes in the percentage of cell populations among low and normal expression of ER [6]. A low concentration of intratumoral tamoxifen metabolites has also been observed in some cases of tamoxifen-resistant BC, suggesting a condition of acquired resistance associated with an increase in ATP-binding cassette (ABC) or Multidrug resistance (MDR) efflux pumps [7]. ER α is a key player in the context of ER+ breast cancer, influencing both pathogenesis and treatment response. Moreover, ER α signaling exhibits intricate cross-talk with other pathways, such as those mediated by growth factor receptors, influencing cell growth and survival [8].

This interaction leads to an increase in selective protein synthesis, making the eukaryotic initiation factor 4F complex (eIF4F) an important target [9,10]. The eIF4F complex is composed of three key components, eIF4E, eIF4A, and eIF4G, which together coordinate the initiation of mRNA translation in eukaryotic cells. An overexpression or hyperactivation of factor eIF4E has been implicated in the translation of mRNA targets including cyclin D1, c-Myc, VEGF, and Bcl-2, which are known to depend on ER signaling and contribute to BC progression, and also the increase in translation of pro-survival proteins, including those involved in drug resistance mechanisms such as anti-apoptosis and drug efflux pumps. Moreover, aberrant eIF4G signaling can enhance the assembly and stability of the eIF4F complex, leading to the increased translation of mRNA. In addition, alterations that increase the expression or enhance the helicase function of eIF4A can lead to the translation of specific mRNA transcripts, thereby potentiating chemoresistance according to our results [11,12]. Together, these components form a dynamic complex crucial for efficient mRNA translation, whose dysregulation is often implicated in chemoresistance phenomena registered in cancer cells [13]. Through its influence on the translation of these key proteins, the eIF4F complex can impact various aspects of ER-mediated cellular processes, including cell cycle regulation, proliferation, angiogenesis, and apoptosis resistance. Moreover, in MCF-7 cells (ER+ cells), heightened expression levels of ABCB1 and ABCC1 efflux pumps have been described [14]. Therefore, this dual regulation eIF4F and ER could represent a strategic therapeutic approach for ER chemoresistance.

Natural compounds have potential as a therapeutic strategy. In this regard, several molecules such as rocaglates, hippuristanol, and pateamine A have been reported to have anticancer activity in vitro and in vivo models [15]. Indeed, rocaglamide and silvestrol have been characterized as adjuvant compounds in cancer treatment, capable of inhibiting the subunit eIF4A [16–18]. However, new molecules of natural origin may represent a potential opportunity area; in this regard, auraptene, a prenyloxycoumarin obtained from plants of the genus *Citrus*, could show several pharmacological properties, such as being an antineoplastic agent, apoptosis inducer, neuroprotective agent, metalloproteinase inhibitor, and an antioxidant and hepatoprotective agent. Auraptene has also been proposed to bind to ER α and modulate its transcriptional activity in ER+ cells [19]. Therefore, auraptene is proposed as a molecule with a dual function in the modulation of strategic protein targets in ER cancer cells, moreover, in chemoresistance conditions.

Natural compounds, the bioactive molecules derived from plants, herbs, and other sources, have demonstrated a therapeutic anti-cancer effect, ranging from anti-inflammatory

and antioxidant properties to immune modulation and apoptosis induction. Tamoxifen metabolites used along these natural compounds may have a potential to counteract chemoresistance mechanisms and enhance therapeutic outcomes. In this regard, we explored the use of auraptene for developing improved treatment strategies targeting ER signaling in breast cancer, as well as its use in chemoresistance conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The salts and buffers were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The cell culture reagents were purchased from Thermo-Fisher (Carlsbad, CA, USA); tissue culture plates and other plastic materials were obtained from Corning Inc. (Corning, NY, USA). For the MTT reactive, endoxifen, 4-OH Tam, and auraptene (Aur) were obtained from Merck in a concentration of $\geq 98\%$ (HPLC). Anti- β actin (sc-8432), anti-eIF4A (sc-377315), anti-eIF4E (sc-271480), anti-eIF4G (sc-133155), anti-RE (sc-8002), anti-Cathepsin D (sc-377299), anti-GADPH (sc-32233), and anti-p-4E-BP1/2/3 (sc-271947) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). The horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody from Thermo-Fisher was used for detection using the immobilon western kit (Millipore Western from Millipore, Burlington, MA, USA) [20]. β -actin and GAPDH were used as loading controls.

2.2. Cell Culture

MCF-7 cells, ER α and PR positive, were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), accession number: HTB-22. The TNBC cell line model MDA-MB-231 was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), accession number: HTB-26. Cell cultures were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 U/mL penicillin, 10 μ g/mL streptomycin, and 25 μ g/mL amphotericin B; 1100 units of insulin were added for MCF-7 according to ATCC recommendations. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 95% air and 5% CO₂. The culture medium was changed every 3 to 4 days according to ATCC recommendations.

2.3. Chemoresistance Protocol

To generate a drug-resistant phenotype in MCF-7 cells, we established a protocol for resistance development to the active metabolites 4-OH Tam and endoxifen. Cells were treated with 1 μ M concentrations of each metabolite and supplemented with 2 μ M estradiol. Stock solutions of the metabolites were prepared at 1 mM in DMSO for endoxifen and estradiol, while 4-OH Tam was prepared in ethanol.

The treatment protocol involved exposing the cells to 1 μ M of 4-OH Tam and endoxifen for 48 h; these concentrations of the metabolites were also used by Calley et al. [21], but they were applied independently. Following this treatment, a recovery period was implemented wherein the cells were maintained in fresh medium free of 4-OH Tam and endoxifen for 24 h. Subsequently, the cells were again treated with 1 μ M of each metabolite plus 2 μ M of estradiol for another 48 h, maintaining a molar 1:1 ratio of each metabolite. This cycle was repeated for a duration of 4 months to induce resistance. For maintaining the resistant cell variant, the culture was maintained with 50 nM of 4-OH Tam and endoxifen. This maintenance protocol was adapted from Chen et al. (2020) [22].

2.4. Cell Viability

Cell viability was assessed using the MTT assay according to a previous protocol [23]. The experiments were performed in a 96-well plate, seeding 20,000 cells, which were incubated to reach 80% of confluence. Next, cells were incubated under different treatments. Formazan crystals were dissolved in a lysis buffer containing 20% SDS and 50% N,N-dimethylformamide (pH 3.7) for 12 h at 37 °C. Optical densities were measured at 570 nm using a microplate reader.

The treatments used in the cell viability assays were under 24 h incubation periods using the following increasing concentrations: 0–16 μM for endoxifen, 4-OH Tam, and fulvestrant. For auraptene, the concentrations used were 0–100 μM , and for joint treatments, endoxifen and 4-OH Tam was used in a concentration of 8 μM with 12 h of incubation.

To determine EC50 values, the software GraphPad Prism 8 was used. The obtained data were transformed and normalized, followed by the application of a five-parameter asymmetric curve model.

2.5. Western Blot (WB) Analysis

Cells were seeded at a density of 200,000 cells/mL in 20 mm 6-well plates and incubated until they reached 90% confluence. After reaching the desired confluence, cells were exposed to the specified treatments. Subsequently, cells were washed with PBS and lysed for 35 min at 4 °C using a protein lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors. The lysates were centrifuged at $4100 \times g$ for 10 min, and the supernatant was collected. Protein quantification was performed using a BCA assay.

Samples (12 μg /lane) from the total protein fraction were analyzed using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 8–12% gels, depending on the molecular weight of the target proteins. Proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore, Burlington, MA, USA). Membranes were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBS-T) for 1 h at 37 °C, followed by overnight incubation at 4 °C with the respective primary antibodies: anti-ER (1:250), anti- β actin (1:500), anti-eIF4A (1:500), anti-eIF4E (1:400), anti-GAPDH (1:500), anti-Cathepsin D (1:450), anti-eIF4G (1:300), and anti-p-4E-BP1/2/3 (1:400).

After washing with TBS-T, membranes were incubated for 2 h at 37 °C with the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. Membranes were washed again with TBS-T, and HRP activity was detected using the Immobilon Western kit (Millipore, MA, USA). Immunoblots were analyzed using the ImageJ 1.51 program, and the figures presented are representative of the blots.

2.6. Optical Microscopy

Cells were seeded at a density of 200,000 cells/mL in 6-well plates of 20 mm and were subsequently proliferated until 90% of confluence. Next, cells were incubated under indicated treatments. We utilized an inverted microscope VWR Vista Vision coupled to a camera Moticam 5 (Vancouver, BC, Canada), and cell imaging data were analyzed using Motic Images plus 3.0.

2.7. Molecular Docking

The three-dimensional structure of eIF4A1 was obtained from the Protein Data Bank (PDB) [24] ID 5ZC9, which corresponds to the structure of human eIF4A1-ATP at 2 Å resolution. The PDB 3ERT three-dimensional structure of ER α at 1.9 Å resolution was used. The structures of the ligand molecules were obtained from the PubChem database [25], rocaglamide (CID 331783), auraptene (CID 1550607), endoxifen (CID 10090750), 4-OH Tam (CID 449459), and fulvestrant (CID 104741). The protein structures were prepared by removing water and small molecules, leaving only the protein structure. The ligand and receptor were protonated in 3D and energy minimization; these experiments were performed using Molecular Operating Environment (MOE) 2022.02 software [26] with default parameters under the AMBER99 force field [27]. For the ligands, different conformations were generated using a stochastic search on the MOE default parameters.

Binding sites were predicted by employing the site finder option of the MOE software [28]. Molecular docking was established with the default parameters of MOE software, and refinement was used. For interpretation of the docking results, MOE identifies salt bridges, hydrogen bonds, hydrophobic interactions, sulfur-LP, cation- π , and solvent exposure, and gives the score S as a value of affinity ligand–receptor. Ligand interactions with target proteins were predicted based on the S score [29].

To find inaccessible binding modes with MOE's scoring function, molecular docking simulations were also carried out using Vina [30]. Protein and ligand structures were prepared using Chimera's [31] Dockprep plugin. Polar hydrogens were added, Gasteiger charges were calculated with ANTECHAMBER [32] and AMBER ff99sb force field, and missing residues were added using Dunbrack's rotamer library [33]. Structures were then minimized using 100 steps of steepest descent with step sizes of 0.02 Å followed by 10 conjugate gradient steps of the same step size. Autodock Vina was then used to prepare pdbqt files and run the docking simulations using a grid box of enough volume to contain both the protein and the ligand and with an exhaustiveness parameter of 8.

2.8. Overexpression and Purification of eIF4A1

The gene coding for the eIF4A1 protein was cloned into a modified pET19b expression vector (pET19bm), which contains an ampicillin resistance gene, a polylinker site, the lac operon sequence controlled by the T7 promoter, and a 10-histidine tract at the N-terminal of eIF4A1. Additionally, the vector includes a proteolysis site for Prescission Protease (PPS, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) to facilitate the removal of the histidine tract.

The plasmid was transformed into *Escherichia coli* Rosetta Star cells (Novagen, Darmstadt, Germany) harboring the pET19b-eIF4A1 plasmid. Cultures were grown at 37 °C in 2XYT medium supplemented with ampicillin (100 µg/mL) until an optical density (OD₆₀₀) of 0.6 was reached. Protein expression was induced by adding Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM, followed by incubation for 16–24 h at 37 °C.

After incubation, the cells were collected using centrifugation and lysed using sonication. The supernatant was obtained and washed with a buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, and 10 mM imidazole. Purification of the eIF4A1 protein was carried out using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) with Ni-NTA agarose resin (QIAGEN, Hilden, Germany). Purification was evaluated using native acrylamide gel adapted from Arndt Cluadia et al. protocol [34], and the identification was performed using Western blot.

2.9. Fluorescence Assays for Auraptene-eIF4A Binding

Measurements were performed using a Cary Eclipse fluorometer (Mulgrave, VIC, Australia) scanning from 250 to 350 nm at 25 °C in a synchronous mode. Protein–ligand interactions were evaluated using 12 µM eIF4A1 and a range of auraptene concentration 0–80 µM. Solutions were homogenized and incubated for 5 min at 25 °C, and measurements were performed in a quartz cell with a path length of 1 cm and 500 µL volume at 25 °C.

2.10. ATPase Activity Assay for eIF4A1

The ATPase assay in polyacrylamide gel with lead nitrate (PbNO₃) staining was employed to evaluate the effect of auraptene on eIF4A ATPase activity. Serial dilutions of auraptene were prepared through a concentration range of 0–200 µM. Rocaglamide, used as a control, was prepared at a concentration of 5 nM based on a previous report [17]. After performing gel electrophoresis, the gels were stained with lead nitrate. Then, ATPase activity was visualized as clear bands against a dark background.

2.11. qPCR for ABCC1 and ABCB1 Expression

Cells were seeded at a density of 200,000 cells/mL in 6-well plates of 20 mm and were subsequently incubated until 90% confluence was reached. Next, cells were incubated under indicated treatments for 12 h. The total RNA from cell variants were obtained with Trizol reagent, following the supplier's instructions. cDNA was synthesized using 1 µg of RNA and the Primer Script RT-PCR. cDNA concentration was standardized for qPCR with the PowerUp Sybr Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, and 10 µL of the resultant cDNAs was used for each PCR reaction. Primer sequences were ABCB1 forward

5'-GCCAGCTGAACTCCTTAGAC-3'; *ABCB1* reverse 5'-GATTCGTGCACAGCAGCA-3'; *ABCC1* forward 5'-GGCTCAAGGAGTATTCAGAG-3'; *ABCC1* reverse 5'-CCATCGATGATGATCTCTCC-3'; *GAPDH* forward 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'; and *GAPDH* reverse 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'. qPCR reactions were performed in QuantStudio 1 by applied biosystems. Data were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with *GAPDH* as reference, and results were reported as fold change.

2.12. ADME Properties of Auraptene

The chemical structure of auraptene was input into the SwissADME [35] web tool and the ADMETlab 2.0 [36] interface to identify favorable ADME characteristics. The ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) properties of auraptene determine its drug-likeness and desired pharmacokinetic profiles. Specifically, we focused on evaluating optimal lipophilicity, high water solubility, and predicted bioavailability.

2.13. Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using two-way analysis of variance (ANOVA) with GraphPad Prism 8. For MTT assays, the data are also expressed as mean \pm SD. According to GraphPad Prism, manual results were considered statistically significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Resistance Acquisition under Tamoxifen-Derived Metabolites and Estradiol Treatments in ER α Cells

An MCF-7 (ER+) cell variant resistant to 4-OH Tamoxifen (4-OH Tam) and endoxifen was generated, denominated as MCF-7^{Var E}. The endocrine resistance was acquired through treatment under a scheme of 1 μ M of endoxifen, 1 μ M 4-OH Tam, and 2 μ M estradiol (E2) in a concomitant incubation; E2 was utilized as an antagonist against the tamoxifen metabolites. The ratio of active metabolites to hormones was maintained at an equimolar concentration. The resistant variant was generated by stimulating the cell cultures with Tamoxifen metabolites for 48 h periods followed by a 24 h recovery period; maintenance doses of 50 nM of each compound were incubated over a 120-day cycle to induce endocrine resistance (Figure 1A). Cell viability experiments were performed to determine the endocrine resistance of the MCF-7^{Var E} variant. Using the MTT assay, the half maximal effective concentration (EC₅₀) of each active metabolite for MCF-7 and MCF-7^{Var E} cell cultures was quantified to determine the resistance of the variants (Figure 1B–D).

The MCF-7^{Var E} showed an increase in EC₅₀ values under treatment with endoxifen ($9.62 \pm 0.49 \mu$ M) and 4-OH Tam ($12.13 \pm 1.5 \mu$ M) in comparison to MCF-7 cells with values for endoxifen ($5.91 \pm 1.75 \mu$ M) and 4-OH Tam ($10.49 \pm 0.96 \mu$ M) (Figure 1B–D). Results demonstrate the acquisition of resistance to the pharmacologically active tamoxifen metabolites. In a complementary way, the experimentation with the fulvestrant drug showed a similar behavior; an increase in the EC₅₀ value for the MCF-7^{Var E} ($29.62 \pm 0.49 \mu$ M) compared to MCF-7 cells (19.81 ± 0.49) was registered (Supplementary Figure S1).

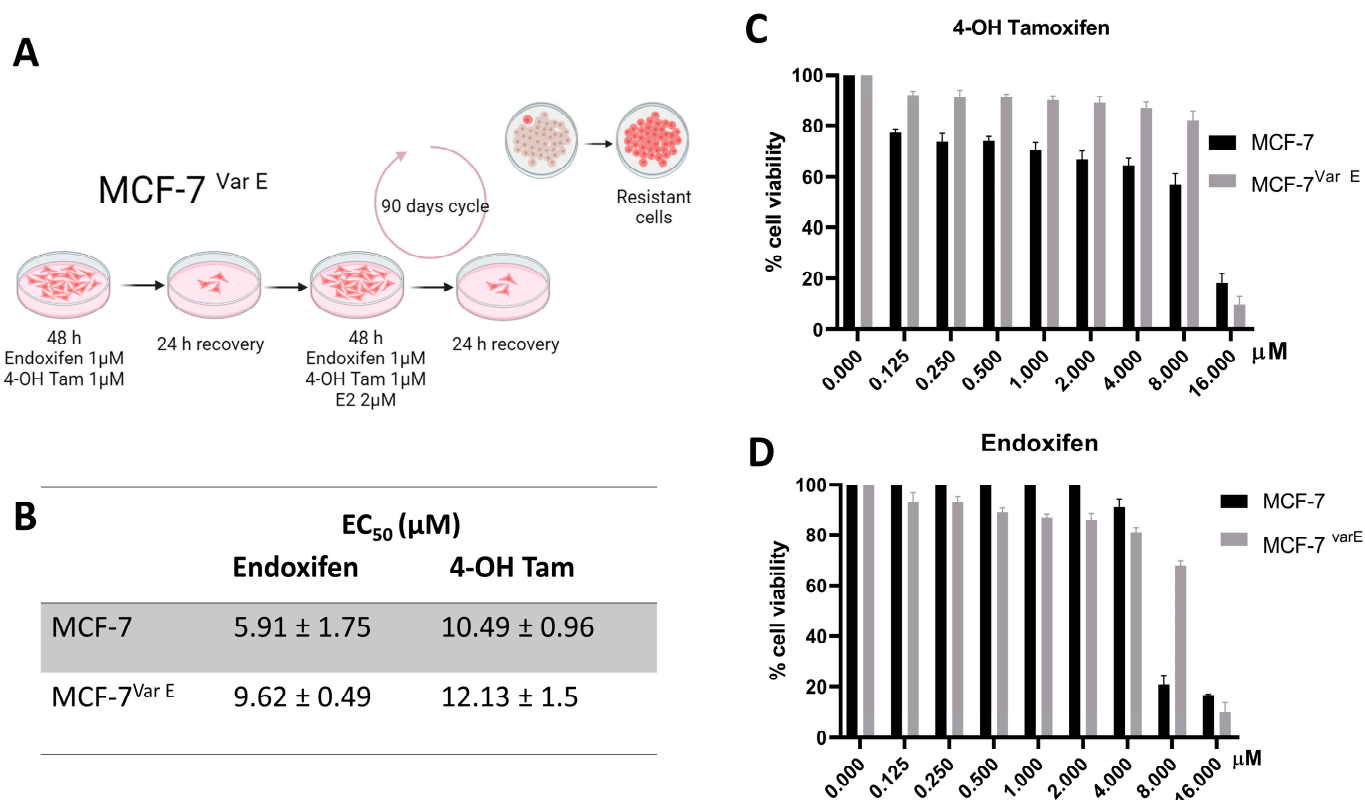


Figure 1. Resistance development in MCF-7 cells and its characterization. (A) Illustration of the protocol used to carry out chemoresistance, showing the procedure for resistance acquisition in MCF-7^{Var E} cells. (B) Comparison of the EC₅₀ values and SD among MCF-7 and MCF-7^{var E} cells under the 4-OH Tam (C) and endoxifen (D) treatments (0–16 μM).

3.2. Effect of Estradiol as a Determinant of Chemoresistance

E2 functions as a critical regulator of ER α signaling. Although its presence promotes cell growth and proliferation, elucidating the effects of E2 is crucial for unraveling the complexities of ER⁺ breast cancer regulation and for developing therapeutic strategies.

Under conditions of chemoresistance, tamoxifen metabolites induced an increase in ER expression in the MCF-7^{Var E} in comparison to MCF-7 cells under basal conditions (Figure 2A,B). Moreover, combined treatment with E2- and tamoxifen-derived metabolites showed a down-regulation in ER α expression (Figure 2A,B), which in turn caused more significant cell damage (Supplementary Figure S2). This phenomenon could be associated with the fact that E2 stimulation increases cellular activity, enhancing the effectiveness of tamoxifen metabolites, particularly under the combined treatments. In addition, in the resistant MCF-7^{Var E} cells, the combined effect was more pronounced, resulting in a significant decrease in ER α expression (Figure 2A,B) and, consequently, a more potent cytotoxic effect (Supplementary Figure S2). These results suggest a role of ER α under elevated concentrations of pharmacologically active tamoxifen-derived metabolites.

Given the impact of changes in cathepsin D expression levels on breast cancer prognosis [37], we also determined its expression in control and resistant cells. Importantly, we observed an increase in cathepsin D levels in both MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells when treated with a combination of estradiol and tamoxifen metabolites.

Additionally, we observed an association between the resistant phenotype and increased ER expression. To investigate whether tamoxifen metabolites could modulate ER activity, we conducted molecular docking simulations (Supplementary Figure S3A–C). The obtained affinity values through algorithm MOE (Molecular Operating Environment), E-scores, were -5.60 kcal/mol for estradiol, -7.81 for endoxifen, and -7.29 for 4-OH Tam, suggesting a higher affinity for tamoxifen-derived metabolites on ER structure.

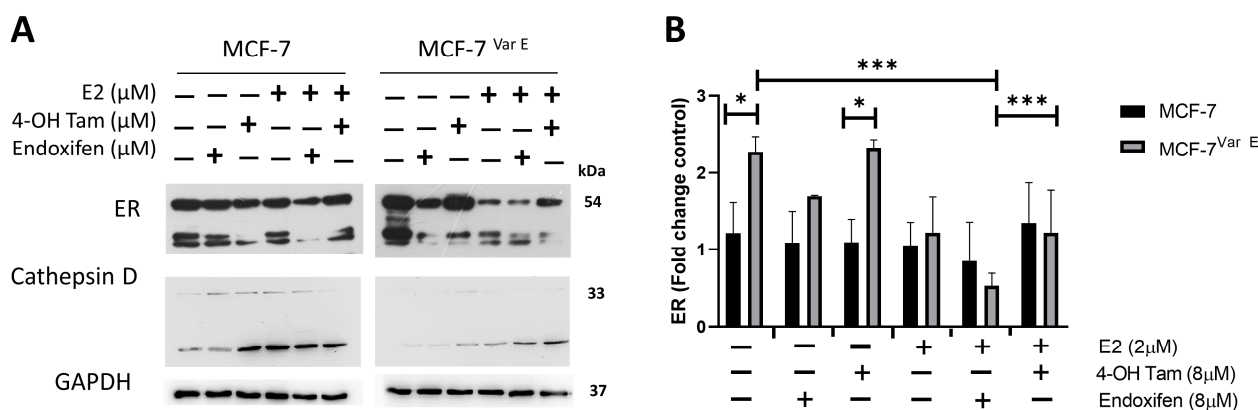


Figure 2. Role of estrogen receptor (ER) in chemoresistance. **(A)** Expression of ER and cathepsin D. The comparative expression between MCF-7 and MCF-7^{Var E} under the indicating conditions, with E2 (2 μM) and tamoxifen metabolites treatment (8 μM). **(B)** Quantitative analysis of ER expression. Comparative expression by densitometry analysis in three independent experiments of ER in MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells. Results are reported as mean ± SD ($n = 3$) and expressed as fold-change in regard to loading control; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ in regard to control. GAPDH were used as loading controls.

Notably, these results revealed that the binding site of tamoxifen-derived metabolites overlaps with the interaction region of E2, suggesting a potential competition phenomenon for the ER-native ligand-binding domain (LBD); indeed, several residues involved in E2 binding, such as Glu₃₈₀, Leu₅₃₆, and Leu₅₂₅, are also involved in binding both endoxifen and 4-OH Tam (Supplementary Figure S3D–G).

Ligand/tamoxifen-derived molecules competing for ER could favor a potent inhibitory effect, inhibiting cell proliferation by down-regulating the translation of ER downstream genes. Under these conditions, adaptive mechanisms must be triggered to maintain chemoresistance; in this regard, targeting the eIF4F complex and its associated signaling pathways have emerged as potential therapeutic strategies to overcome ER+ cancer chemoresistance [38].

3.3. eIF4F Protein Components Are Conserved during Chemoresistance and through Treatment of Tamoxifen-Derived Metabolites Plus E2

To determine the role of the eIF4F complex in ER drug resistance cells, we characterized its expression in MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells. In the first instance, for eIF4A, the RNA-helicase protein MCF-7^{Var E}'s cells showed increased expression levels when compared to MCF-7 parental cells, possibly due to drug resistance (Figure 3A,B). Notwithstanding, eIF4A levels were higher in E2-treated MCF-7 cells compared to their control; in contrast, MCF-7^{Var E} cells show an eIF4A reduction with E2 treatment, suggesting that E2 has a differential effect on the cell variants. Interestingly, the levels of eIF4A were maintained despite the concomitant treatment of tamoxifen-derived metabolites and E2 (Figure 3A,B).

In the case of the eIF4G translation initiation factor, we obtained a similar result, an increased expression in MCF-7^{Var E} compared to the MCF-7 cells (Figure 3A,C); however, endoxifen and 4-OH Tam treatment (8 μM) induced a slight reduction in its expression in MCF-7^{Var E}. Moreover, in MCF-7 cells, the same tamoxifen-derived treatments induced a slight increment (Figure 3A,C). In this case, the response was regulated by the E2 treatment, and the MCF-7^{Var E} cells had a more active complex that could confer chemoresistance (Figure 3A,C).

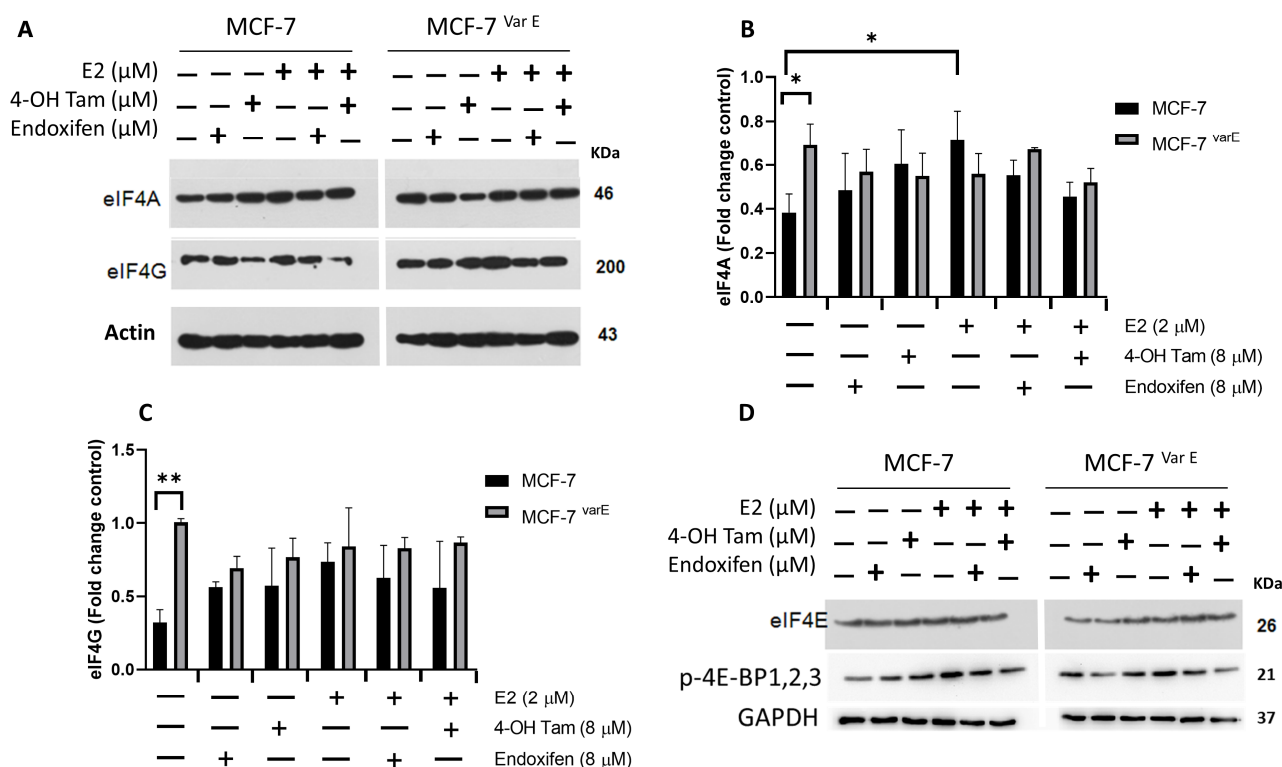


Figure 3. eIF4F complex characterization. (A) Expression of eIF4A and eIF4G targets. The comparative expression between MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells under different treatments, with E2 (2 μ M) and tamoxifen metabolites (8 μ M) for 12 h. Densitometry analysis of eIF4A (B) and eIF4G (C) in MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells under the same conditions. (D) Expression of eIF4E and p-4E-BP1,2,3. The comparative expression between MCF-7 and MCF-7^{Var E} under different treatments with E2 and tamoxifen metabolites is shown. Results are reported as mean \pm SD ($n = 3$) and expressed as fold-change in regard to loading control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$ in regard to control. β -actin and GAPDH were used as loading controls.

Regulation of eIF4E expression is crucial, with 4E-BP proteins modulating its activity by binding to eIF4E and inhibiting eIF4F complex formation. Interestingly, in MCF-7 cells, eIF4E expression remained unchanged despite tamoxifen metabolite stimuli (Figure 3D). Moreover, in MCF-7^{Var E} cells, eIF4E expression increased with concomitant treatments (Figure 3D). The phosphorylation status of p-4E-BP1,2,3 implies a potential eIF4E incorporation into the eIF4F complex, likely rendering it more active in MCF-7^{Var E} cells (Figure 3D).

Evidence suggests a compensatory mechanism to maintain the activity of the complex by potentially increasing the expression of eIF4G and eIF4A. Moreover, the expression of the translation factor is maintained despite tamoxifen-derived treatment and concomitant treatment with E2. eIF4A could remain bound to the eIF4F complex and fulfill its function, a particular feature of the MCF-7^{Var E}-resistant cells. This prompted us to search for strategies for eIF4F regulation, specifically eIF4A and Er α , through inhibition by natural compounds, such as coumarins.

3.4. Regulation of eIF4A by Auraptene Binding

Auraptene, a natural coumarin found in citrus fruits, could show promising potential in cancer treatment. According to our results, auraptene may disrupt the translation process through eIF4A inhibition, in turn affecting the expression of proteins involved in cell growth, survival, and potentially chemoresistance. To find if auraptene binds eIF4A, we overexpressed and purified recombinant eIF4A from *Escherichia coli* Rosetta Star strain cultures (Figure 4A,B). Results showed a significant decrease in fluorescence under the interaction of eIF4A (4 μ M) and auraptene at concentrations of 50 μ M and 100 μ M; a

reduction in the emission intensity was observed, resulting from a quenching phenomenon, suggesting that auraptene binds with the eIF4A protein (Figure 4C). Molecular docking simulation results suggest that Aur binds eIF4A close to the rocaglamide binding site, as different docking protocols found highly scored auraptene binding poses near the RNA binding site. Critical residues for rocaglamide interaction are also shared, such as Asp330, Leu331, Pro108, and Thr109 (Figure 4D–G). The E-score for values for auraptene was -9.68 Kcal/mol, which was close to rocaglamide's -10.21 (Kcal/mol) (Figure 4H). Additionally, Vina's scoring function allowed us to find an auraptene pose in which the lactone oxygen hydrogen bonds to Arg³³⁴ (Supplementary Figure S4).

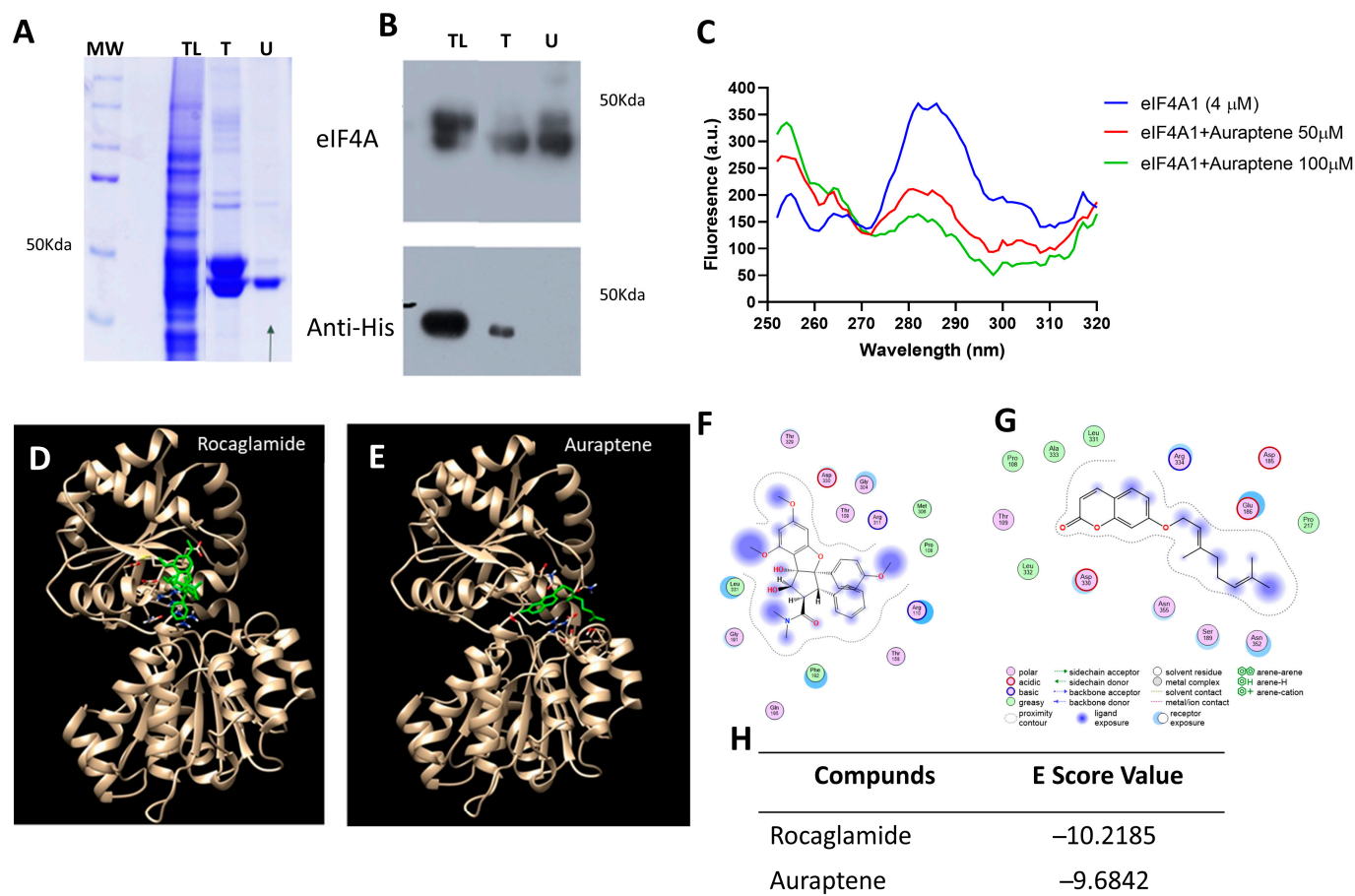


Figure 4. Effect of auraptene on the eIF4A regulation. (A) Coomassie-stained SDS-PAGE of eIF4A-purified fractions corresponding to TL: total lysate, T: tagged protein, and U: untagged protein. (B) Immunodetection for the fractions of eIF4A overexpression. Antibodies to detect eIF4A and polyhistidine tags were used. (C) Fluorescence assay of eIF4A and auraptene. Emission fluorescence spectra of eIF4A, eIF4A plus 50 μ M auraptene, and eIF4A plus 100 μ M auraptene are shown in blue, red, and green, respectively. (D) Docking of rocaglamide in the eIF4A RNA binding site (PDB ID: 5ZC9). eIF4A protein is shown in beige and rocaglamide molecule in green. (E) Docking of auraptene in the eIF4A RNA interaction site. eIF4A is shown in beige and auraptene in green. (F) Rocaglamide–eIF4A ligand interactions, showing the residues and type of interaction. (G) Auraptene–eIF4A binding residues and the nature of the interactions with molecules are shown. (H) E-score values obtained for each molecule in the molecular docking simulation.

3.5. Enhancing Chemotherapeutic Sensitivity in ER+ Cells with Auraptene Treatment

Auraptene is a natural compound which has been proposed to have anticarcinogenic effects in several cancer cell lines [39]; however, it has not been studied in chemoresistant conditions. We thus set out to test the effects of auraptene on MCF-7^{Var E} and MCF-7 cells to evaluate potential synergistic effects with the active tamoxifen metabolites. We employed

concentrations below their EC₅₀ values (Figure 5A,D), and active metabolites of tamoxifen, endoxifen, and 4-OH Tam at a concentration of 8 μM (Figure 5).

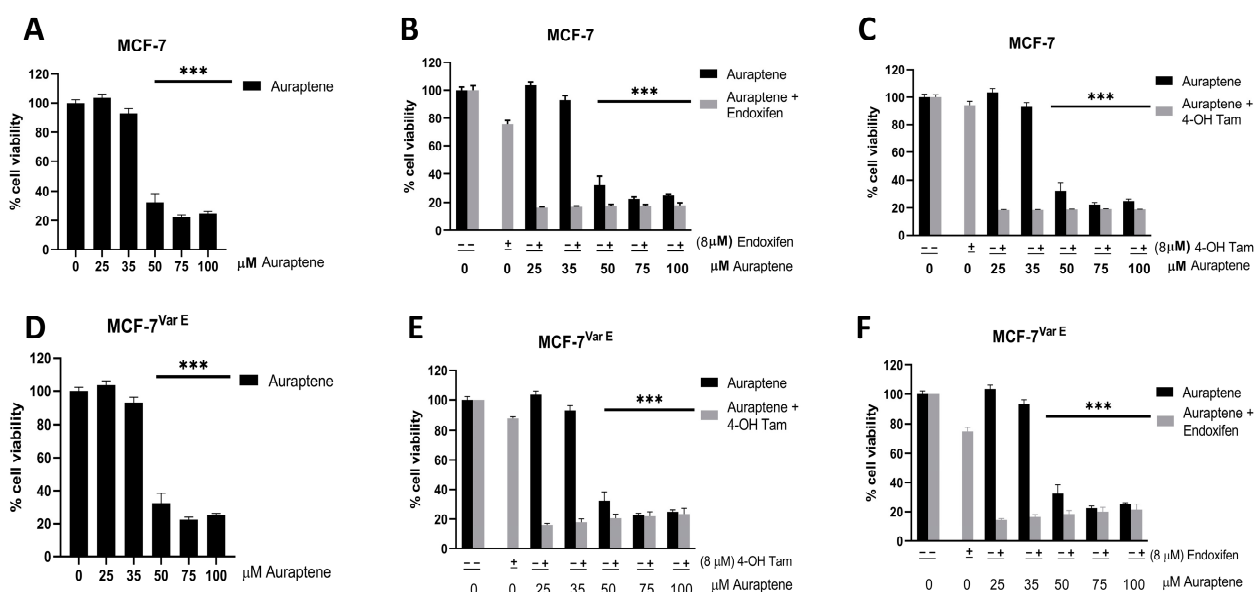


Figure 5. Cell viability of MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells with auraptene treatments. Comparison of auraptene and auraptene plus tamoxifen metabolite treatments. Viability percentages of MCF-7 cells under auraptene (A), auraptene and 4-OH tamoxifen (B), and auraptene and endoxifen treatments (C). Results of auraptene and auraptene plus tamoxifen metabolites shown in black and gray columns, respectively. Viability percentages of MCF-7^{Var E} cells under auraptene (D), auraptene and 4-OH tamoxifen (E), and auraptene and endoxifen (F) treatments. Results of auraptene and auraptene plus tamoxifen metabolites shown in black and gray columns, respectively. Results are reported as mean ± SD ($n = 3$); *** $p < 0.0001$ regard to control.

Our results revealed that auraptene significantly reduced cell viability starting from a 50 μM concentration in both MCF-7 and MCF-7^{Var E} (Figure 5A–D). Subsequently, we explored the combined treatment of auraptene with tamoxifen metabolites. Interestingly, auraptene exhibited a synergistic effect with both 4-OH Tam (Figure 5B,E) and endoxifen (Figure 5C,F), resulting in a substantial reduction in cell viability in both MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells. Remarkably, this effect was observed even at the lowest auraptene concentration evaluated (25 μM), highlighting the potency of the auraptene–tamoxifen metabolite combination treatment.

Despite its chemoresistance acquisition, we observed a potential therapeutic effect in MCF-7^{Var E} cells. By modulating key signaling pathways involved in drug resistance mechanisms, auraptene exhibited the potential to enhance the efficacy of conventional treatments in ER+ breast cancer cells. Notably, the joint treatments were shown to be effective for both MCF-7 cells and the resistant variant MCF-7^{Var E}. Nevertheless, this treatment may be specific to ER+ breast cancer. Thus, we evaluated this therapeutic effect in another breast cancer molecular subtype.

3.6. Auraptene Specificity in ER+ Breast Cancer Cells

To elucidate if the effects of the combined treatments of auraptene with tamoxifen-derived metabolites are specific to BC cells that overexpress ER+, the triple-negative breast cancer cell model lacking expression of hormone receptors, MDA-MB-231 (MDA) cell line, which shows the main phenotypic properties of TNBC cancer, was evaluated. The MDA cell line displayed a higher tolerance to auraptene than the MCF-7 and MCF-7^{Var E} ER+ cell lines, with a viability of 80% observed at the auraptene concentration of 35 μM (Figure 6).

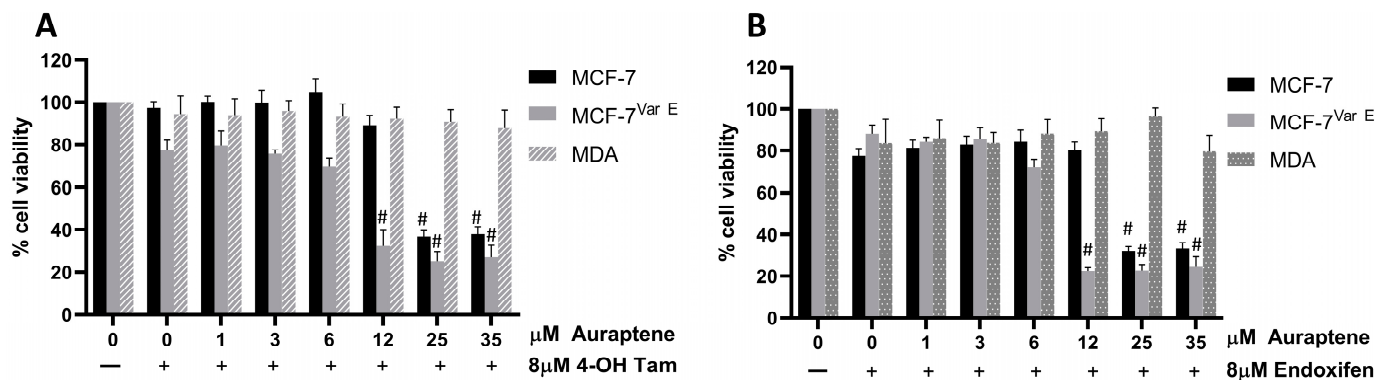


Figure 6. Auraptene and mixed auraptene plus tamoxifen metabolites treatments on ER+ and ER- cell variants. Comparative cell viability percentages of MCF-7, MCF-7^{Var E}, and MDA-MB-231 cells are shown in black, light gray, and pattern gray, respectively, under increasing doses of auraptene plus 4-OH Tam 8 μM (A) and endoxifen 8 μM (B). Results are reported as mean ± SD (n = 3); # p < 0.0001 regard to control.

To determine the minimal auraptene concentration at which synergy with auraptene and tamoxifen metabolites could be registered, we used low concentrations of auraptene (0–35 μM) and a fixed concentration of tamoxifen metabolites (8 μM) (Figure 6A,B). Results suggest a sensitizing effect observed on both ER+ cell variants MCF-7 and MCF-7^{Var E} under the treatment with 4-OH Tam (Figure 6A, Table 1). In contrast, triple-negative cells showed higher tolerance to joint treatments (Figure 6A, Table 1). Both MCF-7 variants displayed synergy between auraptene and both tamoxifen metabolites, as evidenced by lower EC₅₀ values for auraptene when cells were treated with tamoxifen metabolites. This synergy resulted in EC₅₀ values almost four times lower for MCF-7 cells treated with auraptene and tamoxifen metabolites when compared to cells treated with auraptene (Figure 6A,B, Table 1); synergy was more pronounced in MCF-7^{Var E} cells, as concomitant treatments of tamoxifen metabolites and auraptene resulted in EC₅₀ lowering by almost an order of magnitude when compared with cells treated with auraptene (Figure 6A,B, Table 1). However, MDA cells (TNBC) displayed no synergy between auraptene and tamoxifen metabolites, the EC₅₀ value for auraptene was 76.75 μM and the concomitant treatment with 4-OH Tam did not induce a significant therapeutic effect, the EC₅₀ value remained at 80.65 μM (Figure 6A, Table 1).

Table 1. EC₅₀ values for ER+ and TNBC under auraptene and tamoxifen metabolite treatments. Values for the combined treatments in different cell variants.

Cell Variant	Characteristic	Auraptene (μM)	Auraptene + 4-OH Tam (μM)	Auraptene + Endoxifen (μM)
MCF-7	ER+	47.49	12.69	13.34
MCF-7 ^{Var E}	Drug resistance	52.40	8.53	6.47
MDA	TNBC	76.75	80.65	52.68

Results for endoxifen showed a synergistic effect on MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells, but for the triple-negative cells, it did not show any significant effect (Figure 6B). We registered a reduction in EC₅₀ values in both variants, while the EC₅₀ for auraptene treatment in MCF-7 cells was 47.49 μM, the impact of endoxifen reduced the EC₅₀ to 13.34 μM; for MCF-7^{Var E} cells, the values were 52.4 μM for auraptene treatment, while the concomitant use of endoxifen promoted a reduction to 6.47 μM in EC₅₀. For MDA cells, the EC₅₀ value for auraptene was 76.75 μM and the concomitant treatment with endoxifen did not induce a significant therapeutic effect; the EC₅₀ value was maintained at 52.68 μM (Figure 6B, Table 1).

Our results suggest a therapeutic potential for the concomitant treatment for ER+ cells, which requires further testing. Auraptene displayed efficacy at concentrations as low as 12 μM , almost five times lower than the effective concentration of auraptene alone (50 μM) at 24 h of treatment. As a result, subsequent experiments were carried out at an auraptene concentration of 12.5 μM to elucidate the specific mechanism of sensitization on ER+ cell lines.

3.7. Characterization of Auraptene Molecular Mechanism of Resistance

Taking into account auraptene can modulate ER activity, impacting cellular processes such as proliferation, apoptosis, and, potentially, chemoresistance; we evaluated the possibility that the synergy observed between auraptene- and tamoxifen-derived metabolites could arise from auraptene ER binding. Therefore, a molecular docking simulation compared the binding positions of auraptene and tamoxifen metabolites to the natural ER ligand, estradiol (Figure 7A–F). In the first instance, estradiol and auraptene displayed similar affinity values or E-scores of -5.60 and -5.39 , respectively. Notably, auraptene was found to bind the estradiol-denominated ligand-binding domain (LBD), suggesting potential competition for the estrogen receptors' (ER) natural ligand-binding domain (Figure 7A–D). In this regard, auraptene shares several binding residues with estradiol, including Arg₃₉₄, Glu₃₅₃, Leu₃₄₆, Leu₃₄₉, Leu₃₈₄, Leu₅₂₅, Ile₄₂₄, and Met₄₂₁, resulting in a similar affinity value to estradiol.

Critically, the values of the E-scores for endoxifen and 4-OH Tam were -7.81 and -7.29 , respectively (Figure 7A–F), and share some binding residues among them such as Glu₃₈₀, Leu₅₃₆, and Leu₅₂₅ (Figure 7A–F). Trp₃₈₃ and Leu₅₂₅ are shared among auraptene and endoxifen binding sites, and Tyr₃₄₇ and Leu₅₂₅ are shared among 4-OH Tam and auraptene binding sites, suggesting that auraptene may exert similar activity as tamoxifen metabolites, which is a competitive inhibition of the ER, which remains to be confirmed with *in vitro* experiments.

We thus attempted to completely inhibit ER with the strategy of joint treatments of tamoxifen-derived metabolites and auraptene. However, these treatments are quite aggressive for the cellular models, as evidenced in Figures 5 and 6; therefore, the incubation time was reduced from 12 h in the previous experiments to 6 h in order to obtain enough cellular lysates to perform Western blot assays (Figure 7G,H), as a result of significant cellular damage (Supplementary Figure S5). Under the joint treatments of active tamoxifen metabolites (8 μM) and auraptene (12.5 μM), we evaluated the ER, cathepsin D, and eIF4F protein expressions. The results indicate that simultaneous treatment of auraptene alongside tamoxifen metabolites exert a notable down-regulation effect on ER α in MCF-7 with a more pronounced effect in MCF-7^{Var E} variant (Figure 7G,H). In addition, a decrease in cathepsin D was also registered under the combined treatments. Then, the development of a potential therapeutic strategy is highlighted (Figure 7G,H).

Concomitant treatments also triggered the down-regulation of eIF4G, another eIF4F complex protein (Figure 7G,H), which may disrupt the assembly of the eIF4F complex. This effect could be further potentiated in MCF-7 cells, wherein eIF4E expression was also down-regulated under concomitant treatment of auraptene and 4-OH Tam (Figure 7H,I).

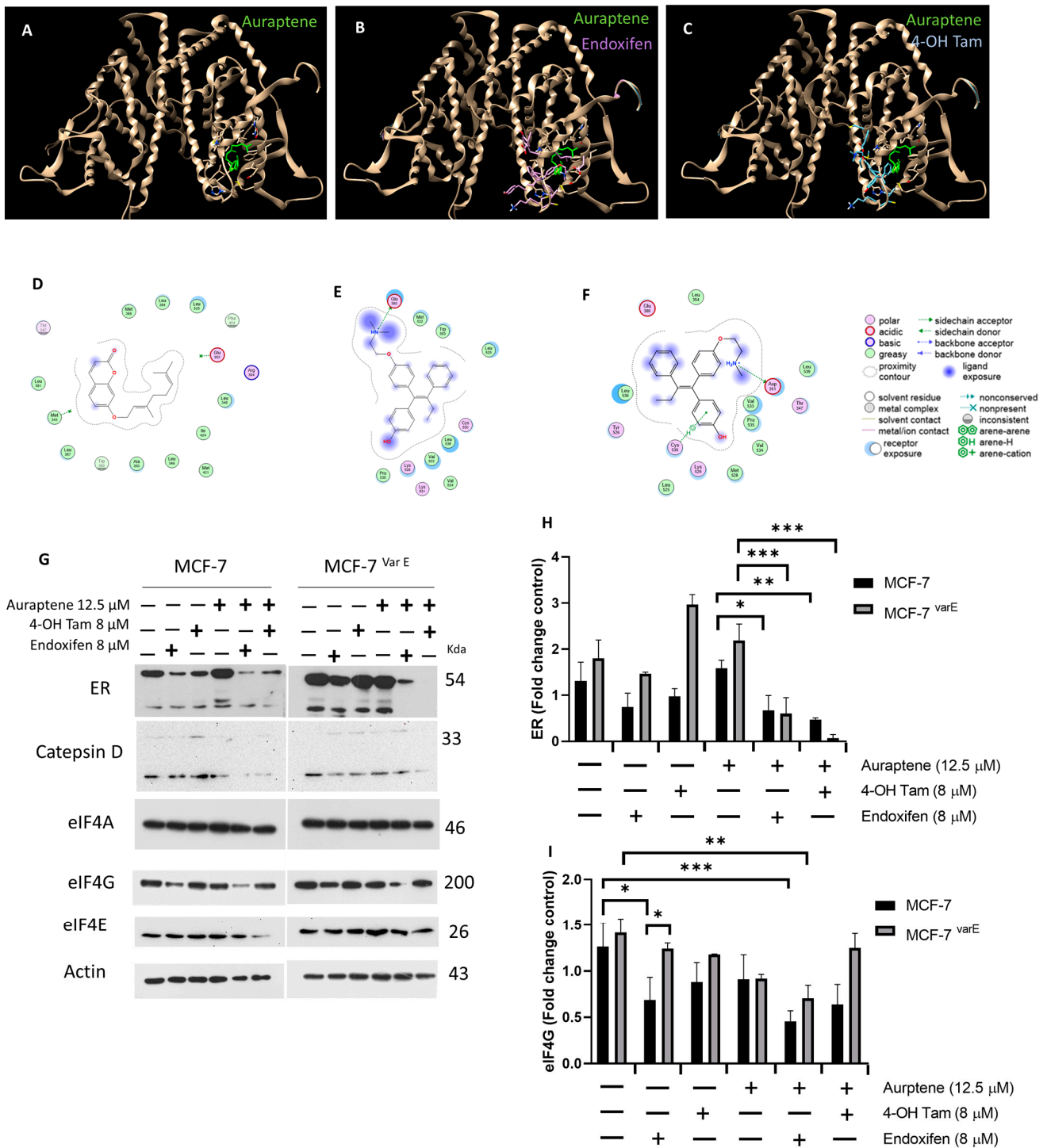


Figure 7. Characterization of eIF4F complex and ER. Molecular docking of molecules of auraptene and tamoxifen metabolites on estrogen receptor. Molecular docking of auraptene that is shown in green (A), endoxifen in purple (B), and 4-OH tamoxifen in light blue (C) on the ER α (PDB: 3ERT). ER α is shown in beige. Binding site residues and their types of interactions with auraptene (D), endoxifen (E), and 4-OH tamoxifen (F). (G) Comparison between MCF-7 and MCF-7^{Var E} under treatments with metabolites of tamoxifen and auraptene for ER, Catepsin D, eIF4A, eIF4G, and eIF4E. Densitometry analysis of ER (H) and eIF4G (I) in MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells under the same conditions. Results are reported as mean \pm SD ($n = 3$) and expressed as fold-change in regard to loading control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$ in regard to control. β -actin and Actin were used as loading controls.

3.8. Auraptene Treatment Could Inhibit Chemoresistance to Tamoxifen Metabolites through Suppression of ABC Transport Expression

To broaden the characterization of the chemoresistance mechanism in MCF-7^{Var E} cells and the potential effect of auraptene and tamoxifen metabolites, we characterized the transcriptional modulation of the ABCB1 and ABCC1 transporter genes associated with the eIF4F translation complex. Under control conditions, MCF-7^{Var E} cells have expression levels almost twice as high as ABCB1 (Supplementary Figure S6A). In this regard, endoxifen severely alters the ABCB1 expression pattern, as MCF-7 cells display a 25-fold increase in expression, whereas MCF-7^{Var E} cells only show a slight expression decrease. The 4-OH Tam treatment promotes a slight increase in expression on both MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells (Supplementary Figure S6A). In an interesting way, joint treatment of auraptene and endoxifen completely abates ABCB1 expression in both cellular variants (Supplementary Figure S6A).

The ABCC1 transporter showed a similar expression pattern as ABCB1, as MCF-7^{Var E} cells also show almost two-fold expression levels of ABCC1. Both 4-OH Tam and auraptene single treatments trigger a 2.5-fold expression increase in MCF-7^{Var E} cells. However, mixed treatments of auraptene- and tamoxifen-derived metabolites abated ABCC1 expression on MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells (Supplementary Figure S6B). The concomitant treatments demonstrate their highest efficacy once MCF-7^{Var E} acquires resistance; on the other hand, they up-regulate the expression when treating MCF-7 cells with endoxifen, and reduce the expression of ABCB1 and ABCC1.

3.9. Pharmacological Potential of Auraptene

As a perspective into an eventual use in clinical treatment, we performed an ADME analysis of auraptene from SwissADME (Supplementary Figure S7) and ADMETlab2.0, which provides an *in silico* analysis of a chemical compound's properties and its potential as a drug. In this sense, auraptene has molecular weight of 298.16, a logP of 5.18, and a logS of -5.75 , suggesting potential pharmaceutical properties based on its calculated solubility and permeability parameters [36]. It has moderately soluble characteristics according to ESOL and Ali models [35], suggesting its potential for adequate dissolution and absorption in biological systems. Its synthetic accessibility score (SA score) suggests simplicity for synthesis, and it adheres to the Golden Triangle rule, indicating a potentially favorable ADME profile [36].

In particular, auraptene displays a high gastrointestinal absorption, which indicates a favorable pharmacokinetic behavior. Moreover, auraptene shows no significant inhibition of key cytochrome P450 enzymes (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4), suggesting its minimal potential for drug–drug interactions according to the ADME profile (Supplementary Figure S7). These findings suggest that auraptene cannot be ruled out as a compound for eventual pharmaceutical development.

4. Discussion

In the present work, tamoxifen-derived metabolite-resistant variant MCF-7^{Var E} was generated as a model to replicate the chemoresistant phenotype observed in patients with ER+ breast cancer, wherein tamoxifen is one of the main adjuvants used. In this regard, this model is a heterogeneous pool of cells, which is obtained through multiple processes of resistance generation. Although cellular models resistant to tamoxifen have been developed [40–43], resistant models to its primary plasmatic active metabolites, 4-OH Tam and endoxifen, have yet to be developed. In this context, a novel approach was taken in generating resistance by incorporating E2 into the 4–5 months resistance induction protocol (Figure 1A). This model closely mirrors physiological conditions that involve competition between tamoxifen metabolites and E2. As a result, we generated an endoxifen and 4-OH Tam-resistant MCF-7^{Var E} cellular model with higher EC₅₀ values compared to the MCF-7 cell line.

We characterized the mechanisms associated with drug resistance and the main cellular features of the resistant cell line with evident phenotypic changes. In contrast to previous reports, our results indicate an ER expression increase in resistant cells. ER overexpression could have been driven by the metabolites used to induce resistance, given their ER agonist nature. In this regard, ER overexpression could act as a resistance mechanism, wherein the dual stimulation by tamoxifen metabolites and E2 triggers an increase in receptor expression. The MCF-7^{Var E} variant shows a distinct phenotype from the usual scenario, wherein drug resistance is associated with decreased ER expression [44,45].

The dose of tamoxifen metabolites was insufficient to decrease receptor activity. Furthermore, when using estradiol, which increases ER expression levels, a new phenotype was generated in which we registered that the growth rate of the resistant cell lines is lower compared to the parental cells, in addition to exhibiting slight morphological changes (Supplementary Figure S2).

On the other hand, we evaluated the effect of treatments with E2 on both MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells, in which a protective E2 effect was expected. However, combined treatments with E2 plus tamoxifen metabolites resulted in a decrease in ER+ expression in resistant cells (Figure 2A). Due to the combined ER binding, diminished ER expression levels, and lower downstream signaling processes, significant cellular damage was observed through optical microscopy (Supplementary Figure S2) [46].

In the context of acquired resistance in MCF7^{Var E} cells and the ER expression increase, which is associated with higher protein translation levels [47], analyzing the eIF4F complex becomes relevant [9]. We observed an increase in the expression of translation initiation factors eIF4A and eIF4G in MCF7^{Var E} cells, which are crucial for the assembly of the translationally active ribosome. Given their crucial role in translation, these proteins have been identified as potential therapeutic targets. Natural compounds have shown therapeutic potential against the translation machinery, and compounds like rocaglamide have been proven to inhibit eIF4A [17]. It has also been observed that inhibiting eIF4A can reduce ER expression when combined with fulvestrant [16], showing an effect similar to our proposal involving auraptene and tamoxifen metabolites. Given its anticancer activity, we explored auraptene regulation of eIF4A activity.

In this regard, spectroscopy data from interaction assays support its binding capability, indicating a similar mechanism of activity to rocaglamide. However, the binding mechanism of auraptene to eIF4A remains to be elucidated.

Auraptene has also been shown to have anticarcinogenic effects in different cancer cell lines [39]. It has been observed that auraptene exerts a series of anti-tumor effects, inducing apoptosis and the generation of reactive oxygen species (ROS) in colorectal cancer cells, as well as antiproliferative effects by inducing cell cycle arrest [48]. Thus, our data add an additional effect of auraptene and indicate a potential to be included in chemoresistant breast cancer treatment, but further experiments will be necessary.

In this regard, auraptene showed similar results on both the native and resistant cell lines, with an EC₅₀ close to 50 µM for both cases. Due to this, combined treatments were performed with tamoxifen metabolites, wherein, surprisingly, we found a similar behavior in both cell lines, with effects observed even at the lowest concentration used in this assay, which was 25 µM for auraptene and 8 µM for the tamoxifen metabolites (Figure 5), suggesting a synergy between both compounds. Based on this, an assay was conducted with auraptene concentrations ranging from 0 to 35 µM to determine the minimum effective concentration. The combined treatments were found to be effective at a concentration of 12.5 µM (Figure 6). Similarly, a TNBC cell line was characterized to determine if the ER was required for the treatment to exert auraptene effects (Table 1). Critically, combined treatment was only effective for the ER+ and not for the TNBC, suggesting the specificity of the treatment of auraptene with tamoxifen metabolites (Table 1). With this evidence, it is worth noting that the proposed tamoxifen–auraptene treatment would have no effect on ER cell populations or populations which respond to treatment by down-regulating ER expression.

Notwithstanding, in the resistant cell MCF-7^{Var E}, the therapeutic effect was more significant with the endoxifen and auraptene joint treatment (EC_{50} 6.47 μ M), a phenomenon that could be caused by a synergism between the two compounds. The synergy between tamoxifen metabolites has already been reported by Chisholm, K and collaborators, where they observed synergy between epicatechins and metabolites derived from tamoxifen in the MDA-MB-231 cell line [49] and attributed the effect to the sensitization of the apoptosis process [50].

A down-regulation effect on ER α was observed in MCF-7 and MCF-7^{Var E} variant cells under the joint treatments of auraptene and tamoxifen metabolites, suggesting a potential for complete ER inhibition (Figure 7G). Interestingly, the concomitant treatments also led to a decrease in cathepsin D and eIF4G expression, critical proteins involved in cellular processes. This down-regulation of eIF4G could disrupt the assembly of the eIF4F complex, further impacting cellular functions. These findings represent a first step in proving that the ER activity and eIF4F components could be modulated by auraptene and be exploited as a therapeutic strategy for breast cancer treatment. Further experiments are needed to exactly determine the inhibition mechanism of this compound on eIF4A.

In a complementary way, we broadly elucidate the drug resistance mechanism in MCF-7^{Var E} cells and its potential regulation by auraptene and tamoxifen metabolites. We focused on characterizing the transcriptional modulation of transporter genes associated with the eIF4F translation complex [51] and ABCB1 and ABCC1 transporters. The combined treatment of auraptene and 4-OH tamoxifen completely diminish ABCB1 expression in MCF-7^{Var E} while maintaining basal levels in MCF-7 cells (Supplementary Figure S5). Similarly, joint treatments profoundly impacted ABCC1 expression, leading to a significant decrease in expression levels in both cell lines. This phenomenon suggests that auraptene, in combination with tamoxifen metabolites, may exert regulatory effects on ABCB1 and ABCC1 transporter expression.

5. Conclusions

Our study presents a novel approach to design treatments for chemoresistance in an ER+ cellular model. We discovered a previously unreported mechanism involving the participation of estradiol (E2) in the development of chemoresistance under an equimolar scheme with active tamoxifen-derived metabolites. This unique condition suggests an increment of estrogen receptor (ER) activity and the participation of the eIF4F complex. Also, auraptene may be a potential candidate for modulating eIF4A activity in addition to ER, hampering key factors of cell translation and proliferation. It is worth mentioning that this phenomenon presents specificity for the ER+ phenotype, considering the results in the TNBC model. Interestingly, combined treatments of auraptene and tamoxifen metabolites resulted in a significant down-regulation of ER expression, suggesting a potential therapeutic strategy to overcome chemoresistance.

6. Patents

The experimental analysis is protected under Mexico law MX/E/2024/037190.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics16091179/s1>, Figure S1. Resistance development in MCF-7 cells. Figure S2. Effect of estradiol in MCF-7 cells. Figure S3. Docking of estrogen receptor. Figure S4. Effect of auraptene on the eIF4A regulation. Figure S5. Effect of auraptene and joint treatments in MCF-7 cells and MCF-7^{Var E}. Figure S6. Modulation of the gene expression of ABCC1 and ABCB1. Figure S7. SwissADME results on auraptene properties.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.-C. and V.G.-G.; Methodology, A.P.-C., B.C.-V. and A.C.-V.; Software, B.C.-V., L.P.A.-B. and A.C.-V.; Formal analysis, A.P.-C.; Data curation, R.D.-M.; Writing—original draft, A.P.-C.; Writing—review & editing, L.P.A.-B. and V.G.-G.; Visualization, A.P.-C. and V.G.-G.; Supervision, B.C.-V., R.D.-M., R.M.-S. and O.G.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CB 2017–2018 (A1-S-28653/SEP/CONACYT) and Programa Presupuestario F003, “Programas Nacionales Estratégicos de Ciencia, Tecnología y Vinculación con los Sectores Social, Público y Privado”; 23a. Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación (2-12-213-2-003-2-1994) (Coordinación General de Investigación y Posgrado/UABC).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors recognize the administrative support of Josue Villegas-Sandoval and Liliana García-Hernández. The authors recognize the antibody donations of Santa Cruz Biotechnology Inc. (Antibodies anti-Cathepsin D, anti-p-4E-BP1/2/3).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Fragomeni, S.M.; Sciallis, A.; Jeruss, J.S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2018**, *27*, 95–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nair, S.; Sachdeva, G. Estrogen matters in metastasis. *Steroids* **2018**, *138*, 108–116. [[CrossRef](#)]
3. Lim, Y.C.; Desta, Z.; Flockhart, D.A.; Skaar, T.C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *55*, 471–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zahreddine, H.; Borden, K.L. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Marin, J.J.; Monte, M.J.; Blazquez, A.G.; Macias, R.I.; Serrano, M.A.; Briz, O. The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 1–10. [[CrossRef](#)]
6. Chang, M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol. Ther.* **2012**, *20*, 256–267. [[CrossRef](#)]
7. Sodani, K.; Patel, A.; Kathawala, R.J.; Chen, Z.S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin. J. Cancer* **2012**, *31*, 58–72. [[CrossRef](#)]
8. Ali, S.; Coombes, R.C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 101–112. [[CrossRef](#)]
9. Fagan, D.H.; Fettig, L.M.; Avdulov, S.; Beckwith, H.; Peterson, M.S.; Ho, Y.Y.; Wang, F.; Polunovsky, V.A.; Yee, D. Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation. *Horm. Cancer* **2017**, *8*, 219–229. [[CrossRef](#)]
10. Robichaud, N.; Sonenberg, N.; Ruggero, D.; Schneider, R.J. Translational Control in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *11*, a032896. [[CrossRef](#)]
11. Castaneda-Sanchez, C.Y.; Chimal-Vega, B.; Leon-Gutierrez, R.; Araiza-Robles, A.E.; Serafin-Higuera, N.; Pulido-Capiz, A.; Rivero, I.A.; Diaz-Molina, R.; Alatorre-Meda, M.; Rodriguez-Velazquez, E.; et al. Low-Density Lipoproteins Increase Proliferation, Invasion, and Chemoresistance via an Exosome Autocrine Mechanism in MDA-MB-231 Chemoresistant Cells. *Biomedicines* **2024**, *12*, 742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gonzalez-Ortiz, A.; Pulido-Capiz, A.; Castaneda-Sanchez, C.Y.; Ibarra-Lopez, E.; Galindo-Hernandez, O.; Calderon-Fernandez, M.A.; Lopez-Cossio, L.Y.; Diaz-Molina, R.; Chimal-Vega, B.; Serafin-Higuera, N.; et al. eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model. *Cells* **2022**, *11*, 4069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bhat, M.; Robichaud, N.; Hulea, L.; Sonenberg, N.; Pelletier, J.; Topisirovic, I. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 261–278. [[CrossRef](#)]
14. Hembruff, S.L.; Laberge, M.L.; Villeneuve, D.J.; Guo, B.; Veitch, Z.; Cecchetto, M.; Parissenti, A.M. Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 318. [[CrossRef](#)]
15. Naineni, S.K.; Liang, J.; Hull, K.; Cencic, R.; Zhu, M.; Northcote, P.; Teesdale-Spittle, P.; Romo, D.; Nagar, B.; Pelletier, J. Functional mimicry revealed by the crystal structure of an eIF4A:RNA complex bound to the interfacial inhibitor, desmethyl pateamine A. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 825–834.e6. [[CrossRef](#)]
16. Boyer, J.A.; Sharma, M.; Dorso, M.A.; Mai, N.; Amor, C.; Reiter, J.M.; Kannan, R.; Gadal, S.; Xu, J.; Miele, M.; et al. eIF4A controls translation of estrogen receptor alpha and is a therapeutic target in advanced breast cancer. *bioRxiv* **2024**. [[CrossRef](#)]
17. Iwasaki, S.; Iwasaki, W.; Takahashi, M.; Sakamoto, A.; Watanabe, C.; Shichino, Y.; Floor, S.N.; Fujiwara, K.; Mito, M.; Dodo, K.; et al. The Translation Inhibitor Rocaglamide Targets a Bimolecular Cavity between eIF4A and Polypurine RNA. *Mol. Cell* **2019**, *73*, 738–748.e9. [[CrossRef](#)]
18. Naineni, S.K.; Itoua Maiga, R.; Cencic, R.; Putnam, A.A.; Amador, L.A.; Rodriguez, A.D.; Jankowsky, E.; Pelletier, J. A comparative study of small molecules targeting eIF4A. *RNA* **2020**, *26*, 541–549. [[CrossRef](#)]

19. de Medina, P.; Genovese, S.; Paillasse, M.R.; Mazaheri, M.; Caze-Subra, S.; Bystricky, K.; Curini, M.; Silvente-Poirot, S.; Epifano, F.; Poirot, M. Auraptene is an inhibitor of cholesterol esterification and a modulator of estrogen receptors. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 827–836. [[CrossRef](#)]
20. Guevara-Olaya, L.; Chimal-Vega, B.; Castaneda-Sanchez, C.Y.; Lopez-Cossio, L.Y.; Pulido-Capiz, A.; Galindo-Hernandez, O.; Diaz-Molina, R.; Ruiz Esparza-Cisneros, J.; Garcia-Gonzalez, V. LDL Promotes Disorders in beta-Cell Cholesterol Metabolism, Implications on Insulin Cellular Communication Mediated by EVs. *Metabolites* **2022**, *12*, 754. [[CrossRef](#)]
21. Jones, C.J.; Subramaniam, M.; Emch, M.J.; Bruinsma, E.S.; Ingle, J.N.; Goetz, M.P.; Hawse, J.R. Development and Characterization of Novel Endoxifen-Resistant Breast Cancer Cell Lines Highlight Numerous Differences from Tamoxifen-Resistant Models. *Mol. Cancer Res.* **2021**, *19*, 1026–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chen, R.; Guo, S.; Yang, C.; Sun, L.; Zong, B.; Li, K.; Liu, L.; Tu, G.; Liu, M.; Liu, S. Although c-MYC contributes to tamoxifen resistance, it improves cisplatin sensitivity in ER-positive breast cancer. *Int. J. Oncol.* **2020**, *56*, 932–944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Garcia-Gonzalez, V.; Mas-Oliva, J. Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2019–2035. [[CrossRef](#)]
24. Berman, H.M.; Battistuz, T.; Bhat, T.N.; Bluhm, W.F.; Bourne, P.E.; Burkhardt, K.; Feng, Z.; Gilliland, G.L.; Iype, L.; Jain, S.; et al. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 899–907. [[CrossRef](#)]
25. Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B.A.; Thiessen, P.A.; Yu, B.; et al. PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D1373–D1380. [[CrossRef](#)]
26. *Molecular Operating Environment (MOE)*; Chemical Computing Group (CCG): Montreal, QC, Canada, 2024.
27. Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **2006**, *65*, 712–725. [[CrossRef](#)]
28. Soga, S.; Shirai, H.; Kobori, M.; Hirayama, N. Use of amino acid composition to predict ligand-binding sites. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 400–406. [[CrossRef](#)]
29. Clark, A.M.; Labute, P. 2D depiction of protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 1933–1944. [[CrossRef](#)]
30. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)]
31. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)]
32. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 247–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Shapovalov, M.V.; Dunbrack, R.L., Jr. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure* **2011**, *19*, 844–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Arndt, C.; Koristka, S.; Bartsch, H.; Bachmann, M. Native polyacrylamide gels. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *869*, 49–53. [[CrossRef](#)]
35. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; et al. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W5–W14. [[CrossRef](#)]
37. Kang, J.; Yu, Y.; Jeong, S.; Lee, H.; Heo, H.J.; Park, J.J.; Na, H.S.; Ko, D.S.; Kim, Y.H. Prognostic role of high cathepsin D expression in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, *12*, 1758835920927838. [[CrossRef](#)]
38. Pelletier, J.; Graff, J.; Ruggero, D.; Sonenberg, N. Targeting the eIF4F translation initiation complex: A critical nexus for cancer development. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 250–263. [[CrossRef](#)]
39. Tayarani-Najaran, Z.; Tayarani-Najaran, N.; Eghbali, S. A Review of Auraptene as an Anticancer Agent. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 698352. [[CrossRef](#)]
40. Benz, C.C.; Scott, G.K.; Sarup, J.C.; Johnson, R.M.; Tripathy, D.; Coronado, E.; Shepard, H.M.; Osborne, C.K. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res. Treat.* **1992**, *24*, 85–95. [[CrossRef](#)]
41. Hiscox, S.; Jiang, W.G.; Obermeier, K.; Taylor, K.; Morgan, L.; Burmi, R.; Barrow, D.; Nicholson, R.I. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 290–301. [[CrossRef](#)]
42. Jordan, V.C. Selective estrogen receptor modulation: Concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 207–213. [[CrossRef](#)]
43. Jordan, V.C. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147* (Suppl. 1), S269–S276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wijayarathne, A.L.; McDonnell, D.P. The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35684–35692. [[CrossRef](#)]
45. Zhou, C.; Zhong, Q.; Rhodes, L.V.; Townley, I.; Bratton, M.R.; Zhang, Q.; Martin, E.C.; Elliott, S.; Collins-Burow, B.M.; Burow, M.E.; et al. Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF-7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration. *Breast Cancer Res.* **2012**, *14*, R45. [[CrossRef](#)]
46. Yao, J.; Deng, K.; Huang, J.; Zeng, R.; Zuo, J. Progress in the Understanding of the Mechanism of Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 592912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Avdulov, S.; Li, S.; Michalek, V.; Burrichter, D.; Peterson, M.; Perlman, D.M.; Manivel, J.C.; Sonenberg, N.; Yee, D.; Bitterman, P.B.; et al. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 553–563. [[CrossRef](#)]
48. Ebrahimi, S.; Soukhtanloo, M.; Mostafavi-Pour, Z. Anti-tumor effects of Auraptene through induction of apoptosis and oxidative stress in a mouse model of colorectal cancer. *Tissue Cell* **2023**, *81*, 102004. [[CrossRef](#)]
49. Chisholm, K.; Bray, B.J.; Rosengren, R.J. Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Anticancer Drugs* **2004**, *15*, 889–897. [[CrossRef](#)]
50. van Dyk, L.; Verhoog, N.J.D.; Louw, A. Combinatorial treatments of tamoxifen and SM6Met, an extract from *Cyclopia subternata* Vogel, are superior to either treatment alone in MCF-7 cells. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1017690. [[CrossRef](#)]
51. Gupta, S.V.; Sass, E.J.; Davis, M.E.; Edwards, R.B.; Lozanski, G.; Heerema, N.A.; Lehman, A.; Zhang, X.; Jarjoura, D.; Byrd, J.C.; et al. Resistance to the translation initiation inhibitor silvestrol is mediated by ABCB1/P-glycoprotein overexpression in acute lymphoblastic leukemia cells. *AAPS J.* **2011**, *13*, 357–364. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.