

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



“Efecto de la hipercolesterolemia en la generación de resistencia sobre un modelo de cáncer mamario RE+”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

P R E S E N T A

QFB Andrea Muñoz Ayala

Mexicali, Baja California

Octubre de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI
COORDINACIÓN DE INVESTIGACION Y POSGRADO

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

Mexicali, B.C., a 20 de septiembre de 2022

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del trabajo terminal titulado "Efecto de la hipercolesterolemia en la generación de resistencia sobre un modelo de cáncer mamario RE+", que para obtener el Diploma de **Grado en Maestría en Ciencias en Biomedicina**, presenta la C. Andrea Muñoz Ayala, una vez concluida la evaluación correspondiente, hemos resuelto: **APROBARLA**

Dr. Víctor Guadalupe García González

Presidente

Dr. Iván Córdova Guerrero

Secretario

Dra. Gladys Eloísa Ramírez Rosales

Sinodal

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo incondicional, por formarme y guiarme.

A mi hermana por ser mi compañera de estudio de toda la vida.

Al Dr. Victor G. García González por abrirme las puertas del laboratorio de Bioquímica, por su apoyo invaluable como tutor y sus consejos.

A la Dra. Gladys Eloísa Ramírez Rosales y al Dr. Iván Córdova Guerrero por su apoyo como codirectores e importante contribución al proyecto.

Al Dr. Octavio Galindo por su apoyo en el desarrollo del proyecto y redacción de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio Ángel, Liz, Cesar, Roberto, Ruth, Georgina, Andrés, Javier y Mario por hacer el trabajo más ameno y por su apoyo con los protocolos.

A Brenda Chimal y Héctor Frayde por su amistad y apoyo.

A la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme continuar con mi formación y crecimiento profesional.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada.

Dedicatoria

A mis padres Margarita Ayala y Samuel Muñoz.

Abreviaturas

4-OH: 4-OH tamoxifeno

ABCB1: Miembro 1 de la subfamilia B de transportadores con cassette de unión a ATP

ABCC12: Miembro 12 de la subfamilia C de transportadores con cassette de unión a ATP

ACAT: Coenzima A colesterol aciltransferasa

Apo A1: Apolipoproteína A1

ApoE: Apolipoproteína E

ARE: Elementos de respuesta antioxidante

ATCC: American Type Culture Collection

CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50

CTC: Células troncales cancerosas

DBD: Dominio de unión a DNA

Dil-LDL: lipoproteínas de baja densidad marcadas con la sonda fluorescente DilC18

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

E1: Estrona

E2: 17- β -estradiol

E3: Estriol

EMT: Transiciones epitelio-mesénquima

Endoxi: Endoxifeno

ERE: Elementos de respuesta a estrógenos

FAK: Cinasa de adhesión focal

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal

HMGCoAR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

LBD: Dominio de unión a ligando

LCAT: Lecitina-colesterol acil transferasa

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLR: Receptor de LDL

LXR: Receptor X del hígado

MDRTs: Transportadores de multidrogoresistencia

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NMD: N-desmetiltamoxifeno

Nrf2: factor nuclear eritroide 2 similar al factor 2

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PAPS: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato

PBS: Buffer salino de fosfatos

p-FAK: Cinasa de adhesión focal fosforilada

PVDF: Polifloruro de vinilideno

RE: Receptor de estrógenos

RP: Receptor de progesterona

SCAP: Proteína activadora-liberadora de SREBP

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SERM: Modulador selectivo del receptor de estrógenos

SFB: Suero fetal bovino

shRNA: RNA pequeño en horquilla

SREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides

SULT1A1: Miembro 1 de la familia 1A de sulfotransferasas

SULTs: Sulfotransferasas

TBS: Buffer salino de Tris

TGF- β : factor transformante beta

TNBC: Tumores mamarios triple negativos

UGT: Uridina glucoronil-transferasa

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

WB: Western Blot

Contenido

Agradecimientos	II
Dedicatoria.....	III
Abreviaturas	IV
Contenido	VII
Índice de tablas	IX
Índice de figuras.....	IX
Resumen	XI
1. Introducción.....	1
1.1 Cáncer de mama.....	1
1.1.1 Fisiopatología	1
1.1.2 Epidemiología del cáncer de mama.....	3
1.1.3 Subtipos moleculares	3
1.2 Tratamiento con tamoxifeno.....	7
1.2.1 Mecanismo de acción	7
1.2.2 Generación de los metabolitos activos y características	8
1.3 Quimiorresistencia	11
1.3.1 Concepto general	11
1.3.2 Resistencia a la terapia con tamoxifeno	12
1.4 Dislipidemias, su asociación con el cáncer de mama y el tratamiento con tamoxifeno	15
1.4.1 Lipoproteínas	15
1.4.2 Dislipidemias y asociación con cáncer de mama.....	17
1.4.3 Tamoxifeno y lípidos	20

2. Planteamiento del problema.....	21
3. Hipótesis	21
3.1 Hipótesis nula.....	21
3.2 Hipótesis alterna	21
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
5. Metodología.....	23
6. Resultados	28
7. Discusión de resultados	49
8. Conclusiones	58
9. Bibliografía.....	60
10. Anexos	70
10.1 Capítulo de libro	70
10.2 Borrador de artículo	104

Índice de tablas

Tabla 1.....	10
--------------	----

Índice de figuras

Figura 1.....	1
Figura 2.....	5
Figura 3.....	6
Figura 4.....	9
Figura 5.....	12
Figura 6.....	19
Figura 7.....	29
Figura 8.....	30
Figura 9.....	31
Figura 10.....	32
Figura 11.....	34
Figura 12	35
Figura 13	36
Figura 14	37
Figura 15	39
Figura 16	40

Figura 17	42
Figura 18	43
Figura 19	44
Figura 20	46
Figura 21.....	47
Figura 22.....	48

Resumen

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia en mujeres alrededor del mundo. 80% de los casos son positivos para receptor de estrógenos (RE), tumores que, aunque resultan menos agresivos que aquellos con subtipo HER2 positivo o triple negativo, suelen presentar una elevada tasa de recurrencia. El tratamiento coadyuvante de elección para pacientes premenopáusicas con cáncer de mama RE+ es el tamoxifeno, un profármaco cuyos principales metabolitos son el 4-hidroxi-tamoxifeno y el endoxifeno, los cuales actúan como inhibidores competitivos del RE. Hasta un tercio de las pacientes desarrolla resistencia a dicha terapia endocrina o quimiorresistencia, se han descrito diversos mecanismos que pueden encontrarse implicados. Aunque el desarrollo de quimiorresistencia es multifactorial, se ha relacionado ampliamente en la literatura a las concentraciones elevadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en plasma con un mayor riesgo de fallo en la terapia. Los mecanismos moleculares por los cuales las LDL favorecen la quimiorresistencia en células tumorales no han sido completamente dilucidados. Durante la realización de este proyecto se generaron 2 variantes celulares resistentes a los principales metabolitos activos del tamoxifeno a partir de la línea celular MCF-7 que presenta expresión del RE. Una de estas variantes se generó bajo condiciones de altas concentraciones de LDL en el medio de cultivo. Las variantes se caracterizaron a través de la técnica de MTT y Western Blot (WB) para determinar la expresión de blancos de interés relacionados a la quimiorresistencia. También se evaluó la capacidad de migración a través de la técnica de cierre de herida y marcadores relacionados a este proceso en las variantes generadas a través de WB y zimografía. Se obtuvo que aquella variante que no fue generada con una mayor concentración de LDL en el medio de cultivo adquirió una mayor quimiorresistencia y una mayor capacidad de migración, contrario a lo esperado. Los resultados obtenidos son preliminares y hace falta ampliar la estrategia experimental para comprobarlo.

1. Introducción

1.1 Cáncer de mama

1.1.1 Fisiopatología

La mama es un órgano exocrino que se encarga de la producción de leche durante la lactancia. En la mujer se encuentra conformada por el sistema ductal lobular y el estroma, compuesto principalmente por tejido adiposo y fibroso. Los elementos morfofuncionales de la mama son las unidades ducto-lobulilares terminales y el sistema de ductos principales (Wong, 2018). Los ductos y lóbulos están conformados por dos tipos de células epiteliales: las células epiteliales luminales polarizadas que se encargan de la producción de leche y las células mioepiteliales contráctiles que ayudan a su eyección (Aranda-Gutierrez, 2021). Estas células se encuentran rodeadas por una membrana basal conformada principalmente por colágeno de tipo IV y laminina (Wong, 2018) (Figura 1). Las células de las unidades ducto lobulares se encuentran en constante recambio, en respuesta a las fluctuaciones hormonales a lo largo del ciclo menstrual y de la vida de la mujer (Gruber, Christian J.; Tschugguel, Walter; Schneeberger, Christian; Huber, 2002) lo que las predispone al desarrollo de cáncer.

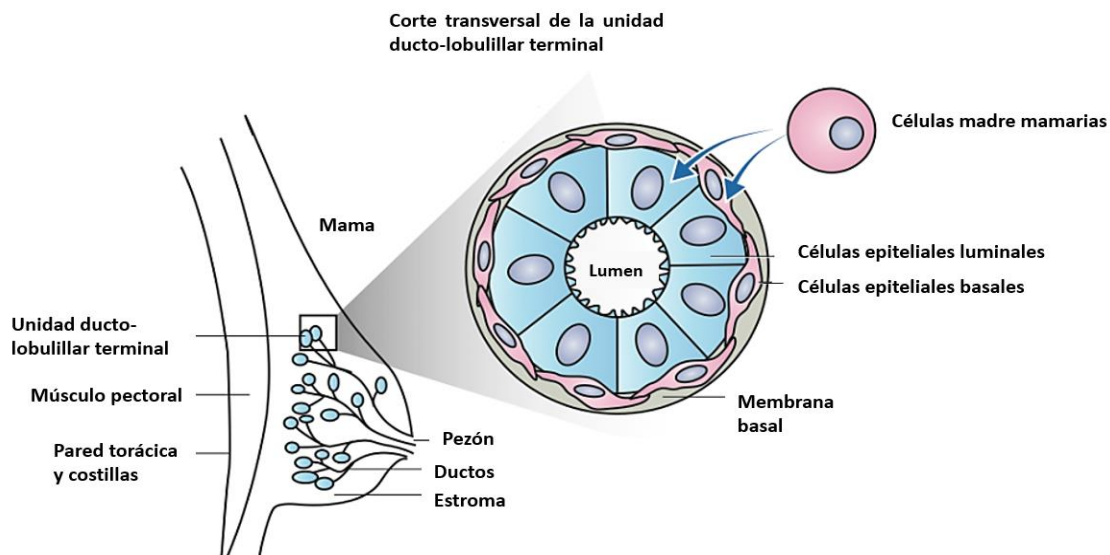


Figura 1. Anatomía de la mama, descripción de sus elementos morfofuncionales. Tomada de Wong, 2018.

El cáncer de mama tiene como característica principal el crecimiento rápido y desordenado de células anormales en la mama que da como resultado el desarrollo de un tumor maligno. El tumor puede ser de tipo invasivo o no invasivo dependiendo de la capacidad de las células neoplásicas de atravesar la membrana basal y llegar a órganos y tejidos distantes. El cáncer de mama presenta pocos signos y síntomas, lo que remarca la importancia de los estudios de detección temprana como las mamografías. Dentro de los signos y síntomas se encuentran la presencia de una masa en la mama, descarga anormal por el pezón y mastalgia. En los casos más avanzados puede presentarse dolor óseo e hipercalcemia, distensión abdominal, ictericia y alteraciones cognitivas, todos ellos como consecuencia de la metástasis (Meisner, Houman Fekrazad, & Royce, 2008). Es importante mencionar que la metástasis a órganos y/o tejidos vitales es la principal causa de fallecimiento en pacientes con cáncer de mama.

Aunque no se conoce una causa determinante para el desarrollo de cáncer de mama, existen diversos factores de riesgo modificables y no modificables implicados. Entre los no modificables se encuentran la edad, el sexo, antecedentes familiares y los tratamientos con radioterapia. Entre los modificables se encuentran el sedentarismo, el sobrepeso, el consumo de alcohol y tabaco (CDC, 2018). Otros factores de riesgo relacionados, que pueden ser modificables o no modificables, son las situaciones que generen una exposición prolongada a estrógenos. Los estrógenos son hormonas sexuales que ejercen distintas funciones dependiendo del órgano o tejido, particularmente en la mama estimulan el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales (Gruber, Christian J.; Tschugguel, Walter; Schneeberger, Christian; Huber, 2002). Los estrógenos pueden ser de origen endógeno como en los casos de la menstruación temprana (antes de los 12 años), la menopausia tardía (después de los 52 años) y el haber tenido hijos después de los 30 años o no haber tenido hijos. También pueden ser exógenos por el uso de tratamientos anticonceptivos (World Health Organization; Meisner, Houman Fekrazad, & Royce, 2008).

1.1.2 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres alrededor del mundo, sin embargo, no es un padecimiento exclusivamente femenino ya que también se reporta en alrededor del 1 % en hombres (Breastcancer.org, 2021). El riesgo de cáncer de mamá aumenta conforme a la edad al igual que su mortalidad, siendo considerablemente mayor a partir de los 45 años (INEGI, 2021). En 2020 se presentó una incidencia de 2 261 419 casos de cáncer de mama en la población femenina a nivel mundial y 684,996 muertes por este padecimiento. Se estima que la incidencia aumente a 3,025,471 casos para el año 2040 (aumento del 33.8%) y la mortalidad a 1,037,723 (aumento del 51.5 %) (Global Cancer Observatory, 2020).

En México, en 2019 se reportaron 15 119 nuevos casos en la población femenina de 20 años o más (35.24 por cada 100,000 mujeres). 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 del 53% aproximadamente (INEGI, 2021). Con respecto a la mortalidad, en el año 2020 fallecieron 7 821 mujeres (35.24 por cada 100,000 mujeres de 20 años o más) a causa de este padecimiento (INEGI, 2021). Para Baja California se reporta una incidencia de entre 60.71-151.94 casos por cada 100 mil mujeres de 20 años o más, mucho mayor que la media nacional, siendo una de las más altas en el país. Además, Baja California presenta una tasa de mortalidad que va de 17.68 a 24.78 casos por cada 100,000 mujeres de 20 años o más (INEGI, 2021). Aunque estadísticamente todos los casos de cáncer de mama se contabilicen en conjunto, es importante mencionar que este es un padecimiento heterogéneo, con características que varían de paciente a paciente.

1.1.3 Subtipos moleculares

Existen diversas formas de clasificar a los tumores mamarios. Una forma de clasificarlos es a partir de su invasividad, es decir, su capacidad de hacer metástasis a sitios distantes. Otra forma es a través de su subtipo histológico. Los tipos histológicos más comunes son el cáncer ductal y el carcinoma lobular. También puede clasificarse

mediante subtipos moleculares, dependiendo de la expresión de receptores hormonales (Meisner et al., 2008).

Con respecto a esta última clasificación, se utilizan técnicas como la inmunohistoquímica y el perfil de expresión genética para caracterizar el subtipo molecular presente en cada caso particular, dependiendo de los receptores hormonales que presente el tumor. La determinación del subtipo permite orientar el tratamiento y llevar a cabo un pronóstico de la enfermedad. Actualmente existen 3 subtipos principales: el positivo al receptor 2 del factor de crecimiento epidermal (HER2+/Neu), el triple negativo (TNBC) y el positivo a receptores de estrógeno (RE+). (Fragomeni, Sciallis, & Jeruss, 2018). Este último puede subdividirse en luminal A y luminal B y su diferenciación se lleva a cabo mediante la tinción histoquímica de la proteína marcadora de proliferación KI67 (Loibl, Poortmans, Morrow, Denkert, & Curigliano, 2021). Una gran mayoría de los tumores RE+ (55-65%) son positivos también para el receptor de progesterona (RP+). El RP tiene un papel en la señalización por RE (Fragomeni et al., 2018). Para todos los casos la cirugía es altamente efectiva. El uso de terapia neoadyuvante (antes de la cirugía) con fármacos quimioterapéuticos, especialmente en tumores HER2+ y TNBC, en casos tempranos convierte a 40% de las pacientes que inicialmente requerían mastectomía en candidatas a cirugía conservativa (Loibl et al., 2021).

Ahondando en los receptores hormonales, el receptor de HER2/Neu se expresa en alrededor del 15-30 % de los cánceres de mama. El HER2 es un receptor transmembranal tirosina cinasa que regula el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia. Se ha observado que su presencia es predictora de un cáncer con un curso clínico agresivo de rápido crecimiento. En pacientes se asocia con una corta supervivencia, crecimiento tumoral rápido y una pobre respuesta a los tratamientos quimioterapéuticos convencionales. Los tumores HER2+ son tratados primordialmente con anticuerpos monoclonales anti-HER2 (Fragomeni et al., 2018). Por otro lado, los tumores triple negativo (TNBC) representan de un 15-20% de los cánceres de mama invasivos y se definen por la ausencia de expresión de receptores RE, RP y HER2 (Fragomeni et al., 2018). Actualmente se utilizan fármacos citotóxicos como las antraciclinas para su tratamiento (Loibl et al., 2021). Por último, el RE se expresa en 80

% de los casos de cáncer de mama (Fragomeni et al., 2018). Dentro de las características comunes de los tumores RE+ se encuentra una elevada recurrencia, pero una menor agresividad comparado con otros tipos de tumores, así como la falta de respuesta a los tratamientos citotóxicos convencionales. El RE tiene implicaciones importantes en la proliferación y en la supervivencia de las células tumorales que los expresan, sus características se describirán más a detalle en el siguiente apartado.

1.1.4 Receptor de estrógenos (RE)

Los estrógenos, un conjunto de hormonas esteroideas de 18 carbonos, juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo, reproducción y mantenimiento de un amplio rango de tejidos (Lipovka & Konhilas, 2016). Entre ellos se encuentra la estrona (E1), el 17- β -estradiol (E2) y el estriol (E3) (Figura 2). En las mujeres, el E2 se produce principalmente en los ovarios, mientras que la E1 y el E3 son producidos en el hígado a partir del estradiol (Gruber, Christian J.; Tschugguel, Walter; Schneeberger, Christian; Huber, 2002). Sus acciones se encuentran mediadas por su unión con los receptores de estrógenos (RE): el RE α y el RE β , miembros de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción activados por hormonas (Hewitt & Korach, 2018).

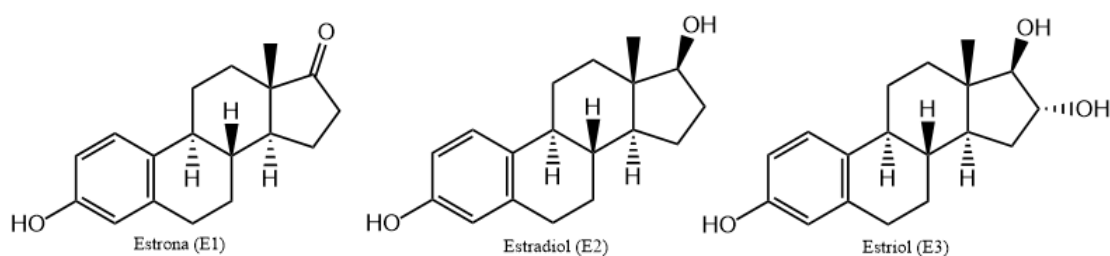


Figura 2. Estructura química de los principales estrógenos: Estrona (E1), Estradiol (E2) y Estriol (E3). Realizada con ChemDraw Professional.

El RE α y el RE β son codificados por distintos genes en los cromosomas 6 y 14 respectivamente. El RE α tiene un peso molecular de 66 kDa y es codificado por el gen

ESR1 y el RE β tiene un peso molecular de 54 kDa y es codificado por el gen ESR2. Los RE al unirse a los estrógenos, principalmente al E2, sufren un cambio conformacional que los lleva a su dimerización y translocación al núcleo donde modulan la transcripción de genes que presentan elementos de respuesta a estrógenos (EREs), una secuencia invertida de 13 pares de bases (GGTCAnnnTGACC), cercano a regiones promotoras o potenciadoras (Hewitt & Korach, 2018). Ambos receptores presentan 6 dominios estructurales nombrados de la A-F y los siguientes dominios funcionales: un dominio N terminal que contiene la región de activación transcripcional independiente de ligando (AF-1); un dominio de unión a DNA (DBD) que presenta dedos de zinc que se unen con gran afinidad y especificidad a los EREs y un dominio de unión a ligando (LBD) en el que se encuentra la región de activación transcripcional dependiente de ligandos (AF-2). (Hevener, Ribas, Moore, & Zhou, 2020; Lee, Kim, & Choi, 2012; Xu, Jiang, Zhou, Li, & Huang, 2013) (Figura 3a). Los RE participa en la transcripción a través de la interacción de sus regiones AFs con la maquinaria transcripcional mediada por co-reguladores (co-activadores), que permiten la formación del complejo de iniciación, favoreciendo la transcripción de sus genes blanco (Hevener et al., 2020; Hewitt & Korach, 2018) (Figura 3 b).

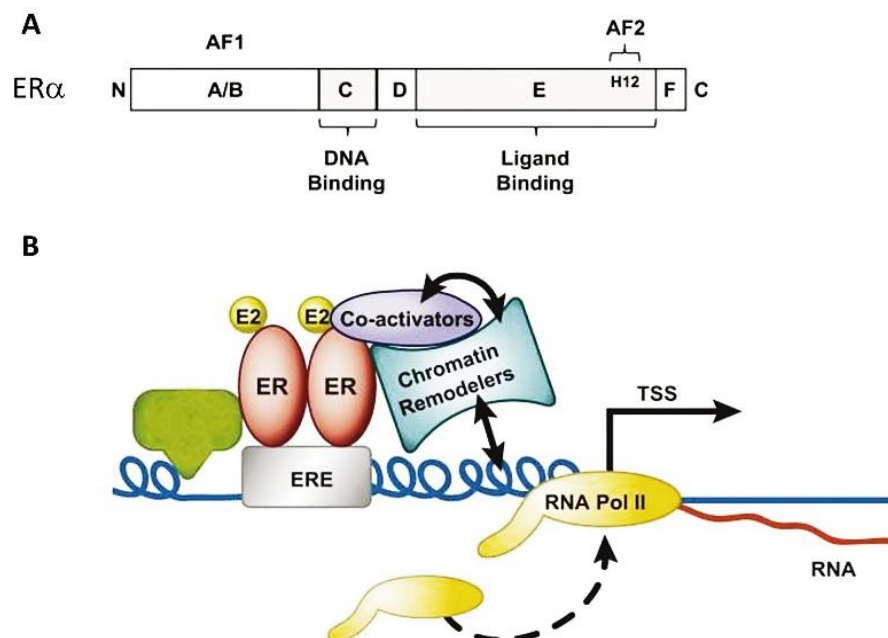


Figura 3. Estructura y función de los RE. A) Dominios estructurales (A-F) y funcionales del RE α . B) Unión del complejo RE-E2 en forma dimérica al DNA en ERE, interacción con la maquinaria

transcripcional y activación de la transcripción de los genes blanco. TSS: Sitio de inicio de la traducción (Por sus siglas en inglés: Transcription start site), RNA pol II: RNA polimerasa II. Tomado de Hevener et al., 2020.

El RE α y el RE β presentan diferente distribución en los tejidos. En el tejido mamario normal, así como en los tumores mamarios se encuentra principalmente expresado el RE α . El término RE+ hace referencia a la presencia del RE α en estos tumores.

Para el tratamiento de los tumores RE+ por lo general se hace uso de la terapia endocrina. En la actualidad, el tratamiento hormonal coadyuvante de elección para mujeres premenopausicas que presentan este tipo de tumores es el tamoxifeno. Para mujeres postmenopáusicas o en etapas avanzadas también suelen utilizarse inhibidores de la aromatasa como el letrozol y el anastrozol (Loibl et al., 2021).

1.2 Tratamiento con tamoxifeno

1.2.1 Mecanismo de acción

El tamoxifeno fue aprobado en 1998 y en la actualidad está indicado para el tratamiento de la forma temprana y avanzada del cáncer de mama RE+. De igual forma, su uso ha sido aprobado para la prevención primaria del cáncer de mama en mujeres expuestas a riesgo elevado (Brunton, Lazo, & Parker, 2007). Este fármaco forma parte de los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs), los cuales presentan diferente respuesta, agonista o antagonista, dependiendo del sitio de acción. En las células de la mama el efecto del tamoxifeno es anti-estrogénico, su unión con el bolsillo de unión a ligando en el RE impide la generación del cambio conformacional requerido para el reclutamiento de coactivadores y en cambio genera el reclutamiento de correpresores (Helland et al., 2021). A través de su acción como inhibidor competitivo impide que el receptor participe en la transcripción de genes relacionados con la supervivencia y proliferación, evitando de esta forma el crecimiento de los tumores mamarios (Brunton, Lazo, & Parker, 2007; Johnson et al., 2004). Cabe señalar que este

efecto no es llevado a cabo únicamente por la molécula intacta de tamoxifeno, sino también, y con una contribución mucho mayor, por sus metabolitos. Por dicha razón se hace referencia al tamoxifeno como un profármaco (Helland et al., 2021).

1.2.2 Generación de los metabolitos activos y características

El tamoxifeno es administrado por vía oral y sus metabolitos farmacológicamente activos son generados a partir del metabolismo hepático de fase I, en el que están involucradas la familia de enzimas del citocromo P450. Los metabolitos generados directamente a partir del tamoxifeno son conocidos como metabolitos primarios. Uno de ellos es el N-desmetiltamoxifeno (NMD), generado mediante N-desmetilación por la isoenzima CYP3A4 (Figura 4). Su concentración plasmática es mayor a la del tamoxifeno, pero presenta una potencia comparable por lo que su contribución al efecto anti-estrogénico no es tan significativa. Por otro lado, el 4-hidroxitamoxifeno (4-OH-Tam), otro metabolito primario formado mediante 4-hidroxilación por la CYP2D6, es 30-100 veces más potente que el tamoxifeno (tabla 1). Un metabolito secundario farmacológicamente activo es el 4-hidroxi-N-desmetil-tamoxifeno (Endoxifeno), originado a partir del NMD mediante la acción de la CYP2D6 predominantemente y por la desmetilación del 4-OH-Tam por la CYP3A4/5 (Figura 4). El endoxifeno posee la misma potencia que el 4-OH-Tam pero se encuentra en una concentración 6 veces mayor en plasma, por lo que su contribución al efecto farmacológico es mayor (Lim, Desta, Flockhart, & Skaar, 2005).

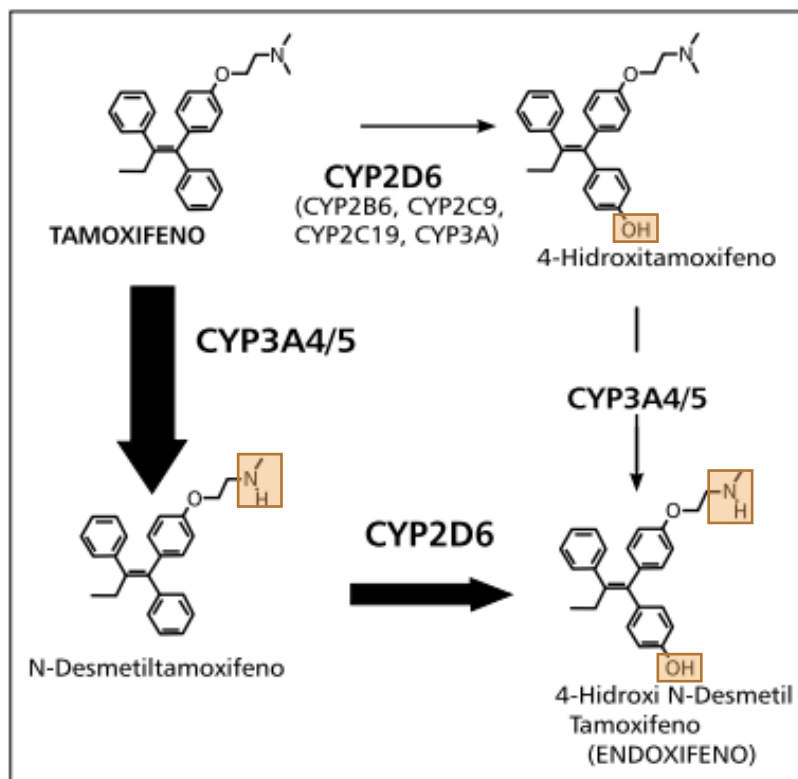


Figura 4. Metabolismo del tamoxifeno a partir de la familia de isoenzimas del citocromo P450. Se señalan en los metabolitos los grupos químicos que presentan diferencia en relación con el tamoxifeno. Los grupos funcionales modificados se indican con un cuadro naranja. Tomado de Irarrazaval, 2011

La mayor potencia anti-estrogénica del endoxifeno y el 4-OH-tamoxifeno comparado con el tamoxifeno se atribuye principalmente al hidroxilo fenólico en sus estructuras (Figura 4) (Helland et al., 2021). Además, se ha postulado que el endoxifeno podría generar la degradación proteasomal del RE (Wu et al., 2009). Estudios *in vitro* demuestran que las concentraciones de endoxifeno están directamente relacionadas con el efecto anti-estrogénico en células tumorales mamarias, independientemente de las concentraciones de tamoxifeno (Wu et al., 2009), y en estudios *in vivo* con ratones se ha demostrado que la inhibición del crecimiento tumoral también está estrechamente relacionada con la concentración plasmática de este metabolito (Gong et al., 2013).

Tabla 1. Abundancia y afinidad relativa de los metabolitos en plasma en relación con el tamoxifeno.

Metabolito	Afinidad relativa	Abundancia relativa (Cp)
Tamoxifeno	1	1 (362 nM)
NMD	0.85	1.78-2.01 (654.9 nM)
4-OHTam	100	0.01-0.02 (9 nM)
Endoxifeno	100	0.07-0.09 (63.2 nM)

Adaptado de Helland et al., 2021. Cp = Concentración plasmática despues de la administración de 20mg/día vía oral despues de 4 meses (Jin et al., 2005).

Los factores genéticos influyen en el efecto terapéutico y la respuesta a la terapia con tamoxifeno. El CYP2D6 presenta polimorfismos que afectan las concentraciones de los metabolitos activos, obteniéndose concentraciones distintas en pacientes con el mismo régimen farmacológico. Los fármacos que poseen efecto inhibidor o inductor enzimático también afectan el tratamiento (Aldaz Pastor & Porta Oltra, 2012). El CYP2D6 es inducible por rifampicina y dexametasona. Por otro lado, algunos de sus inhibidores son los antidepresivos inhibidores de la recaptación de la serotonina como paroxetina y fluoxetina (Jin et al., 2005), además de fármacos como bupropion, quinidina, duloxetina, amiodarona, cimetidina, entra otros (María Elisa Irarrazaval, 2011).

Los metabolitos activos generados en la fase I del metabolismo son posteriormente inactivados por el metabolismo de fase II, volviéndose más polares e incrementando su excreción por vía biliar u por orina. Su metabolismo de fase II incluye principalmente su conjugación con ácido glucurónico por las enzimas uridina glucoronil-transferasas (UGTs) o con un grupo sulfato por las sulfotransferasas (SULTs), especialmente la SULT1A1 (Helland et al., 2021).

La terapia adyuvante con tamoxifeno durante 5 años en pacientes de cáncer de mama RE+ se ha asociado con una disminución de las tasas de recurrencia en un 41 % y una

reducción de la tasa de mortalidad de hasta 31 % (Jordan, 2014). Además se ha demostrado una reducción considerable en la incidencia de cáncer de mama contralateral (Ekholm et al., 2019). Sin embargo, aun siguiendo el tratamiento durante 5 años de la forma establecida, un tercio de las pacientes recaen en un lapso de 15 años. Estas recaídas se atribuyen principalmente al desarrollo de resistencia al tratamiento por parte de las células tumorales. Estas pacientes que presentan resistencia a la terapia endocrina podrían representar hasta un cuarto de todos los pacientes con cáncer de mamá (Zhu et al., 2018).

1.3 Quimiorresistencia

1.3.1 Concepto general

La quimiorresistencia involucra a los procesos que generan la falta de sensibilidad de las células cancerígenas a la terapia, siendo uno de los factores clave en el fracaso de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer de mama. También está implicada en la recurrencia y es de las principales causas de muerte en los pacientes.

La resistencia a los agentes terapéuticos puede ser intrínseca, con falta de respuesta desde un inicio, o adquirida, debida a la pérdida de eficacia terapéutica después de un tiempo de tratamiento. Haciendo énfasis en la resistencia adquirida, los mecanismos incluyen: cambios en la absorción, transporte y eflujo de los fármacos en la membrana celular; aumento en el metabolismo enzimático de los fármacos que lleva a la inactivación de los mismos; alteración en la cantidad y en la afinidad de los receptores o moléculas blanco; la expresión de genes relacionados al cáncer debido a mutaciones o cambios epigenéticos y por aumento en los mecanismos de reparación del ADN (Ji et al., 2019; Palliyage, Ghosh, & Rojanasakul, 2020) (Figura 5).

El desarrollo de resistencia está estrechamente relacionado con el microambiente tumoral, término que hace referencia a las condiciones metabólicas altamente fluctuantes a las que están expuestas las células tumorales, en las que se incluyen elementos de

señalización, biomoléculas del estroma y los mismos agentes quimioterapéuticos. Estas condiciones en conjunto son capaces de inducir cambios en el fenotipo de las células tumorales y derivar en el desarrollo de quimiorresistencia (Galindo-Hernandez, Gonzales-Vazquez, & Cortes-Reynosa, 2015; Palliyage et al., 2020). De igual forma, este microambiente puede contribuir a que en las células tumorales se desencadene el fenómeno de transiciones epitelio-mesénquima (EMT) que está asociado a la pérdida de las interacciones célula-célula en células inicialmente epiteliales, la ganancia de movilidad y la adquisición de características mesenquimales. Este fenómeno le permite a las células tumorales generar metástasis a tejidos secundarios (Bouris et al., 2015; Palliyage et al., 2020; Yuan et al., 2015) (Figura 5).

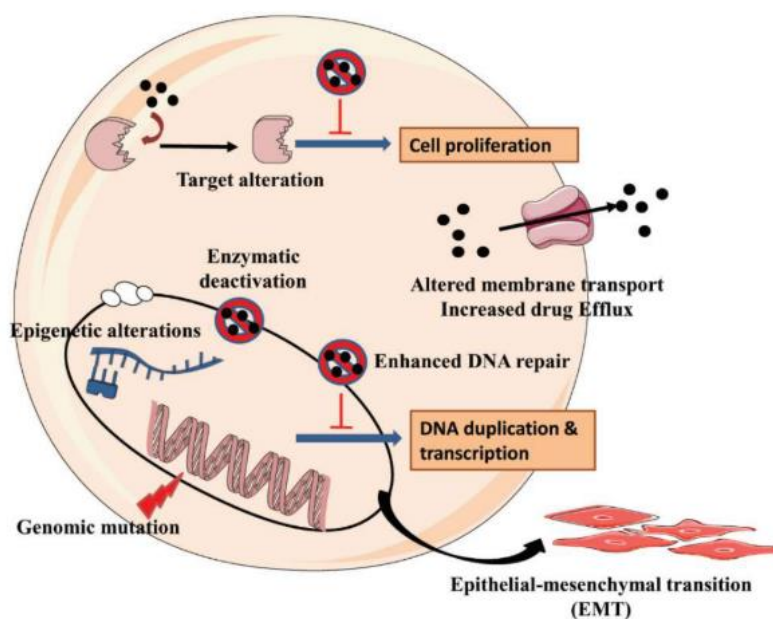


Figura 5. Ejemplos de mecanismos de resistencia adquirida que pueden desarrollarse en las células tumorales. Tomada de Palliyage, Ghosh, & Rojanasakul, 2020.

1.3.2 Resistencia a la terapia con tamoxifeno

En el caso de la resistencia a la terapia con tamoxifeno, se ha descrito de forma importante que el endoxifeno puede ser un sustrato del miembro 1 de la subfamilia B de

transportadores con cassette de unión a ATP (ABCB1) (Teff, Mansell, & Kim, 2011), favoreciendo su eflujo y limitando su disponibilidad en el sitio tumoral (Iusuf et al., 2011). Otras proteínas de la familia ABC podrían estar participando dado la alta homología que existe entre los miembros.

Otros mecanismos de resistencia descritos involucran al RE α , por ejemplo, la regulación epigenética de la expresión del gen que lo codifica (ESR1). Así mismo se han descrito mutaciones en ESR1, modificaciones post-traduccionales, reclutamiento diferencial de co-reguladores, rutas de retroalimentación entre los genes blanco del RE y la expresión y actividad del mismo, acciones río abajo de sus genes diana sobre rutas de factores de crecimiento, entre otros (Mills, Rutkovsky, & Giordano, 2018).

Se ha relacionado a la pérdida de la expresión del RE α con el desarrollo de EMT (Bouris et al., 2015; Sahoo et al., 2021). En el estudio de Bouris y colaboradores la regulación a la baja del RE α con un RNA pequeño en horquilla (shRNA, por sus siglas en inglés: Short Hairpin RNA) en células MCF-7 llevó a estas a perder la capacidad de generar sus colonias características, que presentan células íntimamente unidas, para adquirir una organización más individual y alargada. Además, las células tratadas mostraron una tasa de crecimiento 3 veces mayor, reducción significativa de marcadores epiteliales y un aumento considerable de marcadores mesenquimales en comparación con las células no tratadas. De forma interesante, se encontró una disminución de aproximadamente el 50% en el mRNA de HER2 en las células con RE α depletado (Bouris et al., 2015). Es muy probable que las EMT se encuentran asociadas a lo descrito en diversos estudios clínicos referente al cambio de fenotipo observado entre los tumores metastásicos o recurrentes y los tumores primarios en pacientes con cáncer de mama (Y. Lu, Tong, Chen, & Shen, 2021; Nguyen, Nguyen, Nguyen, Qiuyin, & Phung, 2019).

Por otro lado, también se ha relacionado el aumento en la expresión en la sulfotransferasa 1A1 (SULT1A1) con el desarrollo de resistencia. Las sulfotransferasas forman parte de las enzimas del metabolismo de fase II y catalizan la sulfatación de compuestos hidroxilados endógenos y exógenos, utilizando al 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) como donador de grupos sulfato. Por lo general la sulfatación genera la inactivación de las moléculas bioactivas y las vuelve más polares, facilitando su

excreción renal (Barbosa et al., 2019). La SULT1A1 promueve la sulfatación e inactivación de diversos xenobióticos entre los que se encuentran los metabolitos 4-OH Tamoxifeno y Endoxifeno. Por lo general la expresión de esta sulfotransferasa es muy baja en el tejido epitelial mamario normal, sin embargo, presenta una abundante expresión en la mayoría de los tumores mamarios (Yao-Borengasser et al., 2014). Un aumento en la expresión de la SULT1A1 se traduce en una disminución de la cantidad de metabolitos activos disponibles en el sitio tumoral para llevar a cabo su efecto terapéutico (Gjerde et al., 2008; Yao-Borengasser et al., 2014).

Otra sulfotransferasa involucrada en el desarrollo de quimiorresistencia es la SULT1E1 que se encarga de la sulfatación de los estrógenos, presentando una mayor afinidad (nanomolar) por el 17- β estradiol (E2) (Barbosa et al., 2019). La sulfatación del estradiol impide su unión con el RE (Jiang, Dai, & Chen, 2019). Se ha demostrado que un aumento en la expresión de SULT1E1 inhibe significativamente el crecimiento de las células tumorales de cáncer de mama en un medio con concentraciones fisiológicas de estradiol (Falany, Macrina, & Falany, 2002). Además, se ha determinado que la mayoría de las líneas celulares tumorales mamarias expresan niveles muy bajos comparado con las células normales epiteliales mamarias (Jiang et al., 2019). Una disminución de la expresión de esta sulfotransferasa aumenta la cantidad de estrógenos disponibles en el sitio tumoral.

Con la aparición de los fenómenos de quimiorresistencia, el tratamiento del cáncer de mama se ha vuelto más complejo (Zahreddine & Borden, 2013). De forma importante, la metástasis de los tumores epiteliales que son resistentes a la terapia se ha considerado una de las principales causas de muerte por cáncer en adultos (Gupta, Pastushenko, Skibinski, Blanpain, & Kuperwasser, 2019). Entre los factores que se sugiere pueden ser desencadenantes del desarrollo de resistencia al tratamiento destacan el F metabólico y/o las dislipidemias. El síndrome metabólico es una condición patológica que se caracteriza por la presencia de por lo menos tres de las siguientes cinco condiciones médicas: obesidad abdominal, presión sanguínea elevada, glucosa elevada, una concentración elevada de triglicéridos séricos o disminución del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Huang, 2009; Yamagishi & Iso, 2017). Estas

últimas dos alteraciones se engloban en el término de dislipidemia. En definición la palabra dislipidemia hace referencia a niveles alterados de lípidos en plasma, principalmente de colesterol y triglicéridos, y de las lipoproteínas que los transportan.

1.4 Dislipidemias, su asociación con el cáncer de mama y el tratamiento con tamoxifeno

La obesidad es un factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer de mama y se correlaciona fuertemente con una baja supervivencia en pacientes que la padecen, en especial en aquellas postmenopáusicas (C. W. Lu et al., 2017). Además, diversos estudios señalan un aumento en el riesgo de recurrencia en pacientes obesas en comparación con mujeres en normo-peso que padecieron cáncer de mama (León-Pedroza et al., 2015). La obesidad va comúnmente de la mano con la presencia de dislipidemias (C. W. Lu et al., 2017), aunque también se encuentran implicadas otras alteraciones metabólicas.

1.4.1 Lipoproteínas

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares que llevan a cabo el transporte de los lípidos en circulación sanguínea. Presentan un núcleo hidrofóbico de triglicéridos, esteres de colesterol y otras moléculas lipídicas rodeado por una monocapa de fosfolípidos, colesterol no esterificado (que presenta grupos polares) y apolipoproteínas (Gomaraschi, 2020). Las apolipoproteínas además de formar una interfaz entre el medio lipídico y el acuoso, poseen funciones críticas en el transporte y metabolismo de los lípidos (Gomaraschi, 2020). Diferentes combinaciones de lípidos y proteínas dan lugar a partículas con diferentes densidades, que pueden separarse mediante procedimientos de ultracentrifugación (Nelson & Cox, 2009).

Quilomicrones. Son las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad (<1.006 g/mL), contienen una elevada proporción de triglicéridos (85% en peso). Son sintetizadas en el

retículo endoplásmico de las células epiteliales que recubren el intestino delgado y son trasladados por la linfa hasta entrar a circulación sanguínea. Su principal función es el transporte de los triglicéridos y colesterol de la dieta a los tejidos donde serán utilizados y/o almacenados, es decir, se encargan del transporte exógeno de lípidos (Nelson & Cox, 2009). El hígado endocita el remanente a través de la interacción de miembros de la familia del receptor de LDL con la apolipoproteína E (ApoE) presente en estas partículas (Gomaraschi, 2020).

VLDL. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), (densidad 0.95-1.006 g/mL), transportan al igual que los quilomicrones, una mayor proporción de triglicéridos (50% en peso). Se encargan de la distribución de los triglicéridos y el colesterol desde el hígado hacia otros tejidos del cuerpo, es decir, del transporte endógeno (Mahley, Inneraritu, Rall, & Weisgraber, 1984). En dichos tejidos la apolipoproteína CII presente en las VLDL es reconocida por la lipoproteína lipasa, lo que genera la des-esterificación de los ácidos grasos de los triglicéridos. Posterior a la pérdida del contenido en triglicéridos las VLDL se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y subsiguientemente en lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Nelson & Cox, 2009).

LDL. Las LDL con una densidad de 1.019-1.063 g/mL, contienen una elevada proporción de colesterol (8% en peso) y ésteres de colesterol (37% en peso). Su principal función es el transporte de colesterol a los tejidos extrahepáticos que expresan receptores de LDL (LDLR) que reconoce a la apolipoproteína B-100 presente en estas partículas. Relacionada a esta lipoproteína, los niveles aumentados de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) plasmática, la cual se encarga de transportar los ésteres de colesterol de las HDL hacia las VLDL y las LDL realizando un transporte complementario de cantidades equivalentes de triglicéridos desde las LDL y VLDL a las HDL, se asocian con un aumento del riesgo de desarrollar aterosclerosis (Nelson & Cox, 2009; Chirasani & Senapati, 2017).

HDL. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) con una densidad 1.063-1.210 g/mL, cuando son sintetizadas en el hígado, contienen una proporción mayoritaria de proteínas (55 % en peso) y una cantidad residual de colesterol y sus ésteres, presentándose como partículas discoidales (Nelson & Cox, 2009). Su principal función es la de eliminar el

colesterol excedente de los tejidos extrahepáticos y regresarlo al hígado, incluido el contenido en los quilomicrones y las VLDL residuales, a este proceso se le denomina transporte reverso de colesterol (Mahley, Innerarity, Rall, & Weisgraber, 1984). Las HDL están asociadas a la enzima lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT) que cataliza la formación de ésteres de colesterol a partir de fosfatidilcolina y colesterol. En los tejidos con un exceso en colesterol y en células espumosas que forman parte de la placa aterosclerótica, el transportador ABCA1 interacciona con la apoA-1 presente en las HDL permitiendo el transporte de colesterol hacia las HDL. Las HDL, una vez que se encuentran llenas de colesterol, adquieren una forma esférica y se unen a receptores proteicos de membrana en el hígado, tales como el SR-B1 y HDL-R, que actúan mediante la internalización parcial y selectiva del colesterol y no mediante endocitosis (Nelson & Cox, 2009).

Las concentraciones elevadas de colesterol- LDL (>190 mg/dL) y concentraciones disminuidas de colesterol-HDL en plasma están asociados con un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (World Health Organization, 2007). Recientemente se ha relacionado a las dislipidemias con el riesgo de desarrollar cáncer de mama o de recaer una vez finalizado el tratamiento (Gomaraschi, 2020; C. W. Lu et al., 2017).

1.4.2 Dislipidemias y asociación con cáncer de mama

En el estudio pionero AMORIS que evaluó el riesgo de mortalidad asociado a apolipoproteínas, se comparó los perfiles lipídicos de 812 073 pacientes con cáncer de mama durante 8 años previo al diagnóstico, encontrando una ligera asociación entre el diagnóstico y concentraciones alteradas de triglicéridos (Melvin et al., 2012). Otro estudio en 208 pacientes con cáncer de mama y 176 mujeres sanas reportó alteraciones de parámetros bioquímicos como glucosa, triglicéridos, elevación de LDL y bajos niveles de HDL en aquellas personas que presentaban metástasis (Raza, Asif, Rehman, & Sheikh, 2018).

La alteración de los mecanismos relacionados con el colesterol, tales como la síntesis de *nov*o, la internalización celular y el transporte de colesterol mediado por lipoproteínas podrían modular diversas rutas que llevan al desarrollo del cáncer de mama y de resistencia al tratamiento (Samadi et al., 2019). Las VLDL, LDL y HDL podrían desempeñar un papel crítico en varios mecanismos de progresión tumoral (C. W. Lu et al., 2017). Por ejemplo, la estimulación por VLDL y LDL en células tumorales promueve procesos como proliferación, crecimiento independiente de anclaje, transiciones epiteliales-mesenchimales (EMTs), angiogénesis y metástasis, exhibiendo características pro-tumorales, aunque no se han descrito los mecanismos que conducen a estos fenómenos. Por el contrario, las HDL inhiben la formación de mamosferas y aumentan la sensibilidad de las células tumorales mamarias a la radiación (Wolfe et al, 2015).

Más enfocado en las implicaciones del colesterol asociado a las LDL, en el estudio *in vivo* en ratones de Rodrigues Dos Santos, aquellos que presentaban niveles elevados en plasma de LDL, inducidos mediante una dieta rica en grasas, desarrollaron tumores con una tasa proliferativa más alta y mayor frecuencia de metástasis que los ratones con dieta regular (Rodrigues dos Santos, Fonseca, Dias, & de Almeida, 2014). La relación entre el colesterol -LDL y la progresión tumoral también se ha demostrado en estudios clínicos, por ejemplo, en el estudio de Rodrigues dos Santos se observó una asociación entre niveles de colesterol-LDL mayores a 117 mg/dL y tumores de mayor grado histológico, mayor tasa de proliferación y mayor estadio clínico (II-III). Las pacientes con niveles mayores a 144 mg/dL de colesterol-LDL presentaron una tendencia mayor a desarrollar metástasis en nódulos linfáticos (Rodrigues dos Santos et al., 2014). Además, en una cohorte de mujeres que habían sido tratadas con tamoxifeno, Gallagher y colaboradores determinaron una asociación entre una mayor expresión del receptor de LDL en células mamarias cancerosas y una menor supervivencia libre de recaída (Gallagher et al., 2018). Un aumento en el LDLR favorece una mayor captación de colesterol-LDL en las células tumorales.

Se han descrito en diversos modelos celulares tumorales alteraciones en el metabolismo lipídico. En estas células la demanda de colesterol es mayor por lo que es común que se

presente un aumento en la expresión de los genes regulados por la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP) que favorece la síntesis y captación de colesterol y una disminución de los genes regulados por el receptor X del hígado (LXR) algunos de ellos implicados en el eflujo de colesterol (Gomaraschi, 2020). En las células no tumorales, existe un balance entre ambos factores de transcripción que permite mantener la homeostasis lipídica (Figura 6).

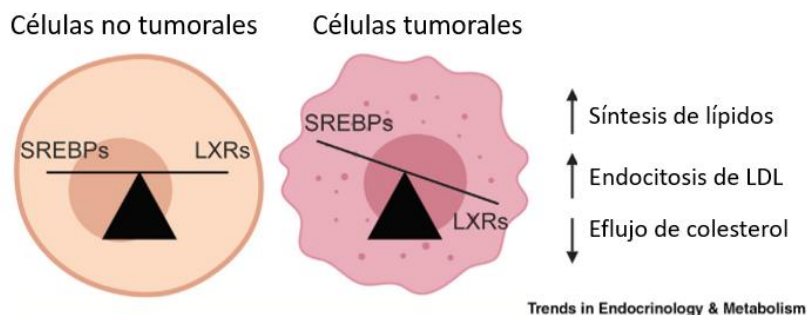


Figura 6. Homeostasis lipídica en las células tumorales. En las células tumorales se pierde el equilibrio entre la actividad regulatoria de los factores SREBP y LXR lo que favorece la acumulación de colesterol intracelular. Tomada de Gomaraschi, 2020.

Es habitual la acumulación de colesterol en forma de gotas lipídicas en las células tumorales. El aumento de colesterol citoplasmático favorece la generación de oxiesteroles, moléculas generadas por la oxidación del colesterol, muchas de ellas capaces de favorecer procesos pro-tumorales como el 27-hidroxicolesterol (Gomaraschi, 2020). Se ha descrito que este metabolito es capaz de activar al $RE\alpha$ en células tumorales mamarias y favorecer su proliferación, así como de promover las EMT (Gonzalez-Ortiz, Galindo-Hernandez, Hernandez-Acevedo, Hurtado-Ureta, & Garcia-Gonzalez, 2021).

Por otro lado, es conocido que la terapia con tamoxifeno tiene efectos directos e indirectos sobre el metabolismo lipídico celular y que puede generar alteraciones en los niveles de lípidos en sangre (Hultsch et al., 2018).

1.4.3 Tamoxifeno y lípidos

El tamoxifeno posee efectos en el metabolismo atribuibles a la combinación de su acción estrogénica en algunos tejidos en conjunto con su acción anti-estrogénica en otros. (Isobe et al., 2021). Se ha descrito que la terapia con tamoxifeno puede generar una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol total y colesterol-LDL, además de un aumento en las concentraciones de colesterol-HDL en las pacientes bajo este régimen de tratamiento, lo que tiene como consecuencia una reducción del riesgo cardiovascular (Arnone, Cline, Soto-Pantoja, & Cook, 2021; Cheung, Ramchand, Yeo, & Grossmann, 2019; Isobe et al., 2021). Sin embargo, se han reportado casos aislados de pancreatitis asociada a hipertrigliceridemia. (Isobe et al., 2021; Singh, Prasad, Kandasamy, & Dharanipragada, 2016).

El efecto estrogénico del tamoxifeno en las células hepáticas, principalmente en mujeres postmenopáusicas, se encuentra relacionado con estos cambios en el perfil de lípidos (Cheung et al., 2019). Se ha descrito que el tamoxifeno es un potente inhibidor de la Coenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT), que cataliza la formación de ésteres de colesterol, abundantes en las VLDL, a partir de acil-CoA y colesterol libre. Este hecho podría explicar la disminución en la síntesis de VLDL y el aumento de las HDL (Poirot, Silvente-Poirot, & Weichselbaum, 2012).

El tamoxifeno también induce cambios en el metabolismo lipídico en las células tumorales, los cuales podrían favorecer el desarrollo de resistencia al tratamiento (Hultsch et al., 2018). Se ha descrito que los SERMS son capaces de alterar la expresión del LDLR y la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCoAR) en células tumorales al promover la activación y bloquear la retroalimentación negativa del factor de transcripción SREBP (Fernández-Suárez et al., 2021).

Clarificar la asociación entre los metabolitos del tamoxifeno, el metabolismo lipídico y la generación de quimiorresistencia nos permitirá determinar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de casos de cáncer de mama en los que tratamiento farmacológico convencional ya no es efectivo.

2. 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. Aproximadamente el 80 % de los casos de cáncer de mama son RE+, cuyo tratamiento coadyuvante de elección es el tamoxifeno. Sin embargo, aproximadamente un tercio de las pacientes desarrollan resistencia a dicho tratamiento. Diversos estudios sugieren la existencia de una relación entre los niveles altos de colesterol- LDL (dislipidemias) y el desarrollo y progresión del cáncer de mama, así como con la resistencia al tratamiento. Dilucidar la forma en que las LDL participan en la progresión y el desarrollo de resistencia al tratamiento endocrino con tamoxifeno en el cáncer de mama RE+ es clave para la búsqueda de nuevas terapias y/o tratamientos farmacológicos.

3. Hipótesis

El tratamiento con LDL aumenta la resistencia de las células tumorales RE+ al tratamiento con los metabolitos derivados del tamoxifeno (4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno).

3.1 Hipótesis nula

El tratamiento con LDL no aumenta la resistencia de las células tumorales RE+ al tratamiento con los metabolitos derivados del tamoxifeno (4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno).

3.2 Hipótesis alterna

El tratamiento con los metabolitos derivados del tamoxifeno (4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno) en conjunto con LDL entorpece el desarrollo de resistencia de las células tumorales RE+.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la resistencia de las células RE+ a los metabolitos derivados del tamoxifeno (4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno), bajo condiciones de altas concentraciones de LDL.

4.2 Objetivos específicos

1. Generar una variante celular tumoral RE+ que sea resistente al tratamiento de 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno.
2. Generar una variante celular tumoral RE+ que sea resistente al tratamiento de 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno, en un medio con altas concentraciones de LDL.
3. Caracterizar el fenómeno de resistencia a 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno, mediante ensayos de viabilidad celular en las variantes generadas comparándolo con las células parentales.
4. Caracterizar la expresión de moléculas que contribuyen a la resistencia: transportadores de la familia de los ABC y la sulfotransferasa 1A1, en las variantes resistentes comparándolo con las células parentales.
5. Evaluar los fenómenos relacionados a las EMT en las variantes resistentes comparándolo con las células parentales.

5. Metodología

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

5.1 Cultivo de células MCF-7 (RE+).

Se partió de la línea celular MCF7, la cual es RE+ y sensible a anti-estrógenos adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC). La línea MCF7 se va proliferó en medio Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM). El medio fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina e insulina.

5.2 Aislamiento de lipoproteínas.

A partir de plasma humano de un donante sano (con previa autorización a través de una carta de consentimiento informado) con ayuno mayor a 12 h, se aisló la fracción correspondiente a las LDL (Garcia-Gonzalez and Mas-Oliva, 2017). En la primera fase, la densidad del plasma se va a ajustó a una densidad de 1.0055 g/mL con KBr y se centrifugó a 345000g por 160 min usando un rotor S140-AT 2555. Se recuperó la fracción inferior. Posteriormente, se ajustó la densidad a 1.053 g/mL y se centrifugó a 377,000 g por 200 min y se recuperó la fracción superior correspondiente a las LDL. La fracción recuperada se dializó contra NaCl 150 mM/EDTA 0.024 mM. Para evaluar la calidad de los aislamientos, se determinaron las apolipoproteínas distintivas apoB-100 y apoA1 mediante western-blot.

5.3 Cuantificación de LDL-colesterol

Se llevó a cabo la cuantificación de LDL colesterol de las fracciones enriquecidas de LDL mediante colorimetría haciendo uso de un kit comercial de Spinreact. Las lecturas se realizaron a 600 nm utilizando el espectrofotómetro SmartSpec Plus de BioRad.

5.4 Marcaje de lipoproteínas.

Las LDL recuperadas previamente fueron marcadas con la sonda fluorescente dilC₁₈, la cual se intercala en la monocapa de fosfolípidos. Las dil-LDL se generaron incubando 15 µg de la sonda por cada 1 mg de proteína-LDL durante un periodo de 8h. Posteriormente la solución se ajustó a una densidad de 1.053 y se centrifugó a 377000g durante 3 h. La fracción correspondiente a las dil-LDL se recuperó y se dializó contra PBS.

5.5 Experimentos de internalización de lipoproteínas.

La internalización de lipoproteínas se evaluó a través de citometría de flujo. Las células se incubaron con dil-LDL a una concentración de 7.5µg/mL o 75 µg/mL en medio DMEM durante 24h, y posteriormente se fijaron con formaldehído. Se utilizó el citómetro Beckman-Coulter, se registraron 20 000 eventos haciendo uso del filtro PC7-A.

5.6 Protocolo de resistencia. Se generaron dos variantes, denominadas H e I, siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- Variante-H: se trató con concentraciones de 1 µM de 4-OH-tamoxifeno y endoxifeno durante 30 días y posteriormente con concentraciones de 2 µM de ambos metabolitos durante 15 días, con un total de 45 días de tratamiento.
- Variante-I: se trató con concentraciones de 1 µM de 4-OH-tamoxifeno y endoxifeno durante 30 días y posteriormente con concentraciones de 2 µM de ambos metabolitos durante 15 días. Lo anterior sumado a una concentración constante de 75 µg/mL de LDL.

Pasado el periodo de tratamiento, las variantes se mantuvieron con concentraciones de 50 nM de 4-OH-tamoxifeno y endoxifeno y para la variante-I una concentración de 7.5 µg/mL de LDL.

5.7 Evaluación de la resistencia.

La resistencia a los metabolitos derivados del tamoxifeno se evaluó a través de dos métodos:

5.7.1 Ensayos de viabilidad celular (Ensayo de reducción de MTT). Se sembraron 20,000 células/pozo en placas de 96 pozos y se dejaron proliferar hasta una confluencia del 80% en medio DMEM suplementado. Posteriormente, células se ayunaron en medio OptiMEM por dos horas. Después se adicionaron los tratamientos (concentraciones de 0.25-16 μ M de 4-OHTam o de endoxifeno) en medio OptiMEM y se mantuvieron por un periodo de 72h a 37 °C. Transcurrido este periodo se adicionaron 30 μ L de una solución de MTT (2.1 g/mL) y se incubó por 4 h. Los cristales de formazan generados se disolvieron adicionando buffer de lisis (20% SDS, 50% N,N-dimetil-formamida, pH 3.7) e incubando a 37 °C por 12h. Por último, se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a 590nm.

5.7.2 Caracterización de moléculas que participan en la resistencia mediante Western Blot. Se sembraron células de las variantes en cajas de 6 pozos con una densidad de 400, 000 células/pozo y se dejaron proliferar hasta alcanzar un 90-95 % de confluencia en DMEM suplementado. Se reemplazo el medio por DMEM experimental y se incubó a 37 °C por dos horas. Posteriormente se adicionaron los tratamientos correspondientes: Control, 8 μ M de 4-OH tamoxifeno (4-OH); 8 μ M de Endoxifeno (Endoxi) y se incubaron durante 24h. Transcurrido el tiempo células se lavaron con PBS y se lisaron (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.5 % NP40, EDTA, 0.2 mM ortovanadato de sodio, 0.3 μ M aprotinin, 130 μ M bestatina, 14 μ M E-64 y 1 μ M leupeptina) para obtener el extracto proteico, seguido de la cuantificación con ácido bicinconínico. Las muestras (25 μ g/carril) de la fracción proteica se analizaron mediante SDS-PAGE sobre geles al 10 %, que posteriormente se transfirió a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon durante 1 h a 37°C en una solución TBS, 0.1 % tween-20 y 5 % de leche sin grasa. Para la detección se van a utilizaron los anticuerpos primarios: anti-RE α , anti-SULT1A1, Anti-ABCC12, Anti-p-FAK, Anti- FAK, Anti-RP, Anti- Nrf2 y Anti-HER2 (Neu) de Sants Cruz Biotechnology. La β -actina 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).

5.8 Tinción con eosina/hematoxilina.

Los cultivos celulares de las variantes se sembraron en cajas de 20 mm y se dejaron proliferar hasta alcanzar un 95-100 % de confluencia. Las células fueron fijadas con para-formaldehído al 4% y teñidas con hematoxilina durante 2h en agitación a 4 °C y posteriormente con eosina al 1% durante 30s. Células se fotografiaron utilizando la cámara Motic Images Plus 3.0 acoplada al microscopio óptico invertido.

5.9 Zimografía.

Se sembraron células de las variantes en cajas de 6 pozos con una densidad de 400,000 células/pozo y se dejaron proliferar hasta alcanzar un 90-95 % de confluencia en DMEM suplementado. Se reemplazo el medio por DMEM experimental y se incubó a las células por dos horas a 37 °C. Posteriormente se adicionaron los tratamientos correspondientes: Control (DMEM experimental), 8µM de 4-OH tamoxifeno (4-OH); 8µM de Endoxifeno (Endo) y se incubaron durante 24h. Se recolectó el medio extracelular y se centrifugo a 5,000 rpm por 10 minutos. Se colecto el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su uso. Se cargaron volúmenes iguales de cada muestra, previamente preparadas con buffer de zimografía, en geles de poliacrilamida co-polimerizada con gelatina al 1% y se corrieron en cámaras de electroforesis a 90V. Posteriormente los geles se lavaron con Tritón X-100 al 2.5% y se incubaron con buffer de activación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7.4) a 37°C durante 62-65h. Transcurrido ese tiempo, los geles se tiñeron con azul de Coomasie y se destiñeron para aumentar el contraste con una solución de ácido acético/metanol. La actividad proteolítica se aprecia como un bandeo blanco. Por último, los geles se fotodocumentaron.

5.10 Ensayo de migración (cierre de herida).

Los cultivos celulares de las variantes se sembraron en cajas de 6 pozos con una densidad de 400, 000 células/pozo y se dejaron proliferar hasta alcanzar un 95-100 % de confluencia formando una monocapa. Se incubaron por 2h en DMEM experimental a 37 °C.. Posteriormente las células fueron tratadas con mitomicina C por dos horas para evitar su proliferación. Se realizó la rayadura haciendo uso de una punta de micropipeta, después se lavó con PBS para remover las células flotantes y se adicionaron los

tratamientos disueltos en DMEM experimental. El experimento se mantuvo en incubación por 72h a 37 °C. Cada pozo se fijó con para- formaldehído al 4%, se tiñó con Azul de Coomasie y se fotografió usando la cámara Motic Images Plus 3.0 acoplada al microscopio óptico invertido.

5.11 Extracción de RNA total y electroforesis de RNA

Se sembraron 400,000 células de las variantes en cajas de 6 pozos y se dejaron proliferar hasta alcanzar un 95-100 % de confluencia formando una monocapa. Se incubaron por 2h en DMEM experimental a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el medio fue retirado y se colocaron los tratamientos, los cuales fueron mantenidos por un periodo de 24h. Posteriormente, se retiró el medio extracelular, se lavó a las células con PBS frío y se adicionaron 200 µL de TRIzol por pozo. Las células se lisaron, homogenizaron y se recolectaron en tubos eppendorf. Los lisados celulares se dejaron en reposo 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se adicionaron 100µL de cloroformo a cada muestra, se agitaron de manera manual durante 20 segundos y se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C y se obtuvieron 3 fases. Se recuperó la fase superior (acuosa) y se adicionaron 0.250 mL de isopropanol para precipitar al RNA total, mezclando por inversión de manera suave y dejando en incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Nuevamente se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó por decantación. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75% resuspendiendo con vortex y centrifugando a 7,500 g a 4°C durante 5 minutos. Se decantó el etanol y se dejó secar la muestra al aire por 10 min. El ARN se disolvió en 20 µL de agua libre de RNAsas. Finalmente, el RNA total obtenido se cuantificó con la ayuda del NanoDrop y se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100V por aproximadamente 1h 20 min, cargando la misma cantidad de RNA de todas las muestras. Los resultados fueron documentados haciendo uso del fotodocumentador marca BioRad.

5.12 Análisis estadístico.

Para la determinación del IC50 en los ensayos de viabilidad celular se utilizó el programa GraphPad Prism 8. El análisis de la expresión proteica y de la actividad de metaloproteinasas se procesó de forma semi-cuantitativa de acuerdo con la intensidad de bandeo haciendo uso del programa ImageJ, tomando como referencia a la β -actina. Se utilizó la prueba ANOVA para evaluar si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en el programa GraphPad Prism 8.

6. Resultados

6.1 Caracterización e internalización de lipoproteínas aisladas a través del proceso de ultracentrifugación.

A partir de plasma total de un donador sano, cumpliendo con lo establecido en la declaración de Helsinki, se aislaron fracciones enriquecidas con las lipoproteínas VLDL/IDL (0.95-1.006 g/mL), LDL (1.019-1.063 g/mL) y HDL (1.063-1.210 g/mL) a través de un proceso de ultracentrifugación diferencial, en el cual la densidad del plasma se ajustó dependiendo de la fracción deseada adicionando bromuro de potasio (KBr). El plasma remanente de la obtención de las fracciones enriquecidas se denominó plasma libre de lipoproteínas y se utilizó como control negativo. Las fracciones junto con el plasma total, utilizado como control positivo, fueron caracterizadas a través de la técnica de western blot. Como era de esperarse, las fracciones enriquecidas de VLDL/IDL y LDL y en plasma total fue posible detectar la presencia de la Apolipoproteína B (Apo B) (Figura 7a), proteína con un peso molecular aproximado de 512 kDa característica de las LDL que permite su reconocimiento por el receptor de LDLs (LDLR) y su posterior endocitosis. Por otro lado, la Apolipoproteína A-1 (Apo A1) se detectó en la fracción enriquecida con HDL, observándose una banda con intensidad notable, en el suero total y el suero libre de lipoproteínas se observó una banda de menor intensidad (Figura 7b).

Durante la realización del proyecto se llevaron a cabo varios aislamientos de fracciones enriquecidas de LDL, se muestra de forma representativa la concentración de proteínas totales, determinada con la técnica del ácido bicinconinico, y la concentración de LDL

colesterol, determinada a través de un método colorimétrico, de tres aislamientos. El promedio de la concentración de proteínas totales fue de los $0.759 \pm 0.135 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que las concentraciones de LDL-colesterol se encontraban alrededor de los $1.198 \pm 0.397 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

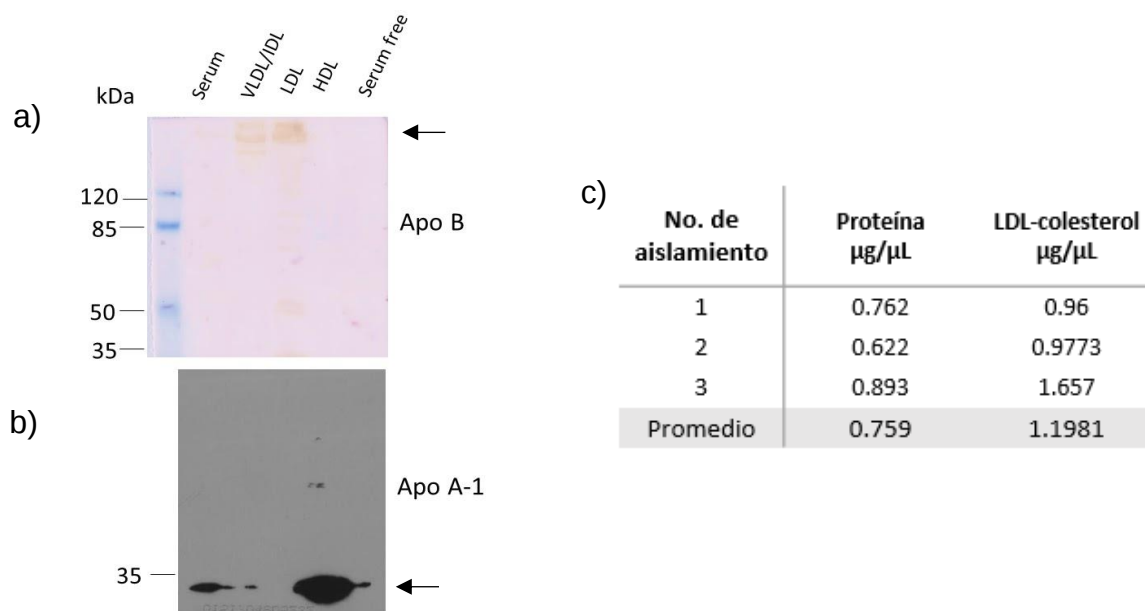


Figura 7. Caracterización de fracciones aisladas a partir de plasma total. a) Identificación de la Apolipoproteína B (Apo B) en la fracción correspondiente a las VLDL/IDL y LDL mediante Western Blot. Se detecta de forma mínima en plasma total. b) Identificación de la apolipoproteína A-1 en la fracción correspondiente a las HDL y mínimamente en el plasma total. c) Cuantificación de proteína y LDL-colesterol en las fracciones enriquecidas de LDL.

Con la finalidad de evaluar la internalización de LDL en la línea celular MCF-7, se incubó a las células con lipoproteínas previamente marcadas con la sonda fluorescente DilC18 (Dil-LDL) durante 24h y posteriormente se evaluaron en el citómetro Beckman-Coulter utilizando el filtro PC7-A. Se evaluó la internalización de las Dil-LDL a las concentraciones de $7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $75 \mu\text{g}/\text{mL}$. Los datos obtenidos a través de citometría indican la presencia de internalización. Como puede identificarse en la figura 7 no se observó una diferencia evidente entre la fluorescencia de las células tratadas con la

concentración de 7.5 $\mu\text{g/mL}$ y la fluorescencia de las que se trataron con una concentración 10 veces mayor (75 $\mu\text{g/mL}$).

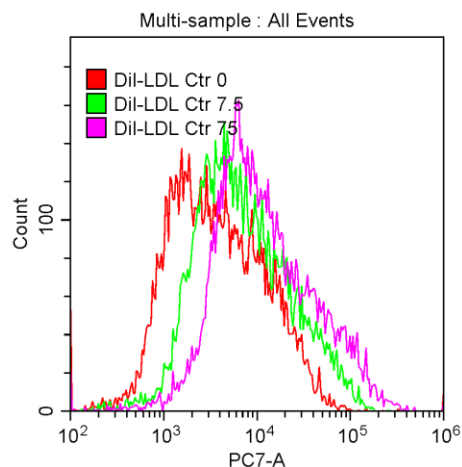


Figura 8. Evaluación de la internalización de Dil-LDL en las células MCF-7 utilizando el filtro PC7-A. El color rojo representa el control con células no tratadas. El color verde representa a las células tratadas con una concentración de 7.5 $\mu\text{g/mL}$. El color rosa representa a las células tratadas con 75 $\mu\text{g/mL}$.

6.2 Desarrollo y evaluación de quimiorresistencia

Para generar la quimiorresistencia se llevó a cabo el tratamiento en células MCF-7 con dos moléculas que se han descrito como los principales metabolitos activos del tamoxifeno que son generadas *in vivo* por la familia de isoenzimas del citocromo P450, el 4-hidoxi-tamoxifeno (4-OHTam) y el endoxifeno (Endoxi). Se generaron dos variantes celulares haciendo uso de cultivos confluentes (90-95%), una generada únicamente con el tratamiento con los metabolitos y la otra con los metabolitos en conjunto con concentraciones elevadas de LDL, con la finalidad de evaluar el efecto estas lipoproteínas sobre la generación de resistencia:

- Variante-H: para su generación las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con una concentración de 1 μM de 4-OH-tamoxifeno y 1 μM endoxifeno durante un periodo de 30 días. Posteriormente la concentración de

ambos metabolitos se aumentó a 2 μM y el tratamiento se mantuvo por 15 días adicionales. Transcurrido el período de tratamiento, las células se mantuvieron en un periodo de recuperación y proliferación de 45 días con concentraciones de 50nM de 4-OHTam y Endoxi (Figura 9a).

- Variante-I: para su generación las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con una concentración de 1 μM de 4-OH-tamoxifeno, 1 μM endoxifeno y 75 $\mu\text{g/mL}$ de LDL durante un periodo de 30 días. Se estableció la concentración de 75 $\mu\text{g/mL}$ de las LDL porque era la concentración más alta que era posible alcanzar en el volumen de medio de cultivo utilizado a partir de la fracción obtenidas a través de ultracentrifugación. La concentración de ambos metabolitos se aumentó durante 15 días adicionales a 2 μM , mientras que la concentración de LDL se mantuvo sin cambios. Pasado el periodo de tratamiento, las células se mantuvieron en un periodo de recuperación y proliferación de 45 días con concentraciones de 50nM de 4-OHTam y Endoxi, además de una concentración de 7.5 $\mu\text{g/mL}$ de LDL (Figura 9b).

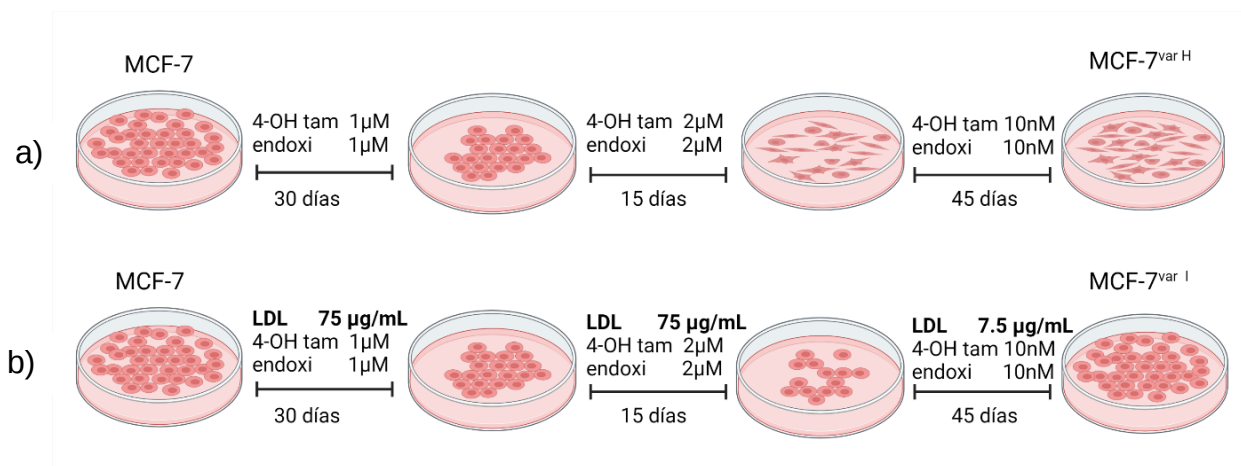


Figura 9. Generación de variantes celulares derivadas de MCF-7. a) Generación de MCF-7^{var H}, periodo de tratamiento de 45 días y periodo de recuperación y mantenimiento de 45 días. b) Generación de MCF-7^{var I}, periodo de tratamiento de 45 días y periodo de recuperación y mantenimiento de 45 días.

Se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de las variantes generadas y la variante nativa a partir de ensayos de viabilidad celular utilizando la técnica de MTT, un ensayo colorimétrico basado en la reducción, debida a la actividad metabólica de las células viables, de la sal amarilla de tetrazolium: Bromuro(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a cristales morados de formazan. Se sembraron 20, 000 células por pozo en una placa de 96 pozos para cada variante y se dejó que alcanzaran aproximadamente un 70% de confluencia, durante un periodo de 1- 3 días dependiendo de su ritmo de crecimiento. Se utilizó un rango de concentraciones de 0.25 -16 μ M de los metabolitos por separado, el tratamiento se mantuvo por un periodo de 72 h (3 días). Transcurrido este periodo se adicionó la misma cantidad de MTT a cada pozo para alcanzar una concentración de 0.5mg/mL y se mantuvo en incubación por 4 h. Posteriormente se adiciono buffer de lisis (50% SDS/20% dimetilformamida, pH 4.2) y se incubo nuevamente por alrededor de 12h (ON). Se realizó la lectura espectrofotométrica de la placa de 96 pozos a 595nm. Las concentraciones a las cuales se reduce la viabilidad celular a un 50% (CI_{50}) fueron calculadas utilizando GraphPad Prism 8 y las gráficas se generaron en el mismo programa. El CI_{50} obtenido para variante H con 4-OHTam fue de 7.64 μ M y con Endoxifeno fue de 7.85 μ M, valores mayores a los obtenidos para la variante nativa (6.16 μ M y 5.33 μ M respectivamente), lo que sugiere el desarrollo de resistencia (Figura 10). Por otro lado, para la variante I se obtuvo un CI_{50} para 4-OHTam de 12.36 μ M, valor notablemente mayor que el de la variante nativa, mientras que para el metabolito Endoxi se obtuvo un valor de 5.7 μ M muy cercano al de la variante nativa.

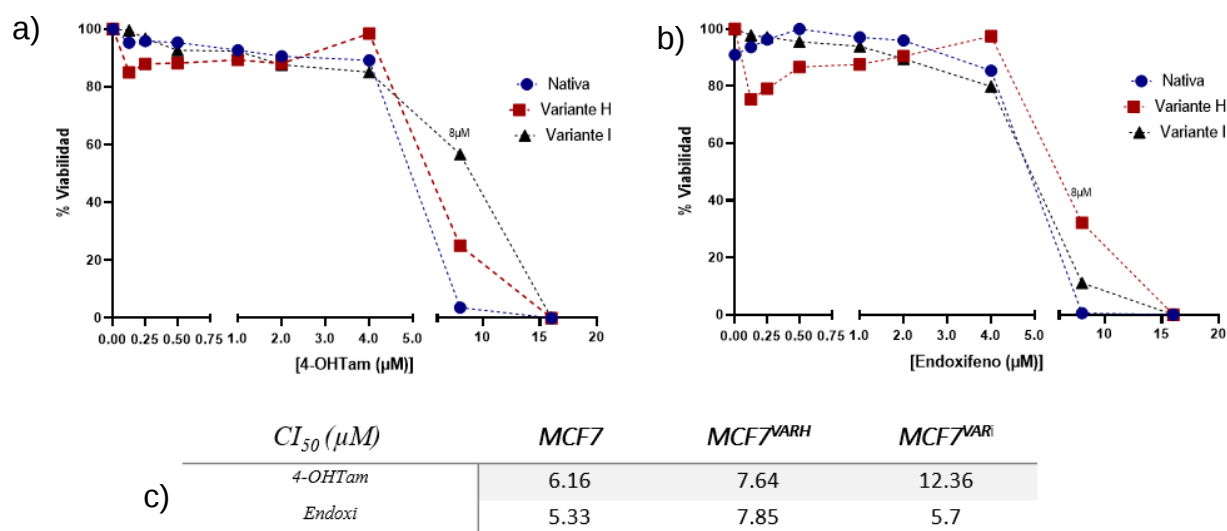


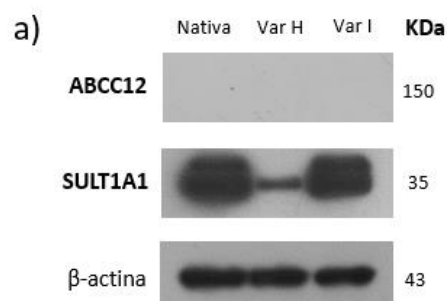
Figura 10. Resultados de los ensayos de viabilidad celular a partir de la técnica de MTT. a) Gráficas obtenidas a partir de ensayos de viabilidad celular tras 72 h de tratamiento con el metabolito 4-OHTam. b) Gráficas obtenidas a partir de ensayos de viabilidad celular tras 72h de tratamiento con el metabolito Endoxifeno. c) Tabla con las CI_{50} obtenidas para cada variante celular con ambos metabolitos. Gráficas e CI_{50} se obtuvieron con GraphPad Prism 8.

Con la finalidad de describir los marcadores proteicos que podrían estar implicados en la resistencia, se evaluó la expresión, a través de la técnica de Western Blot, del miembro 12 de la subfamilia C de transportadores con cassette de unión a ATP (ABCC12) y de la sulfotransferasa SULT1A1 en las variantes H e I, así como en las células nativas o parentales. Se utilizó β -actina como control de carga (Figura 11 a).

Los transportadores con cassette de unión a ATP se han relacionado con el eflujo de numerosos fármacos y el desarrollo de quimiorresistencia. Con respecto al transportador ABCC12, no fue posible detectar su expresión en nuestros modelos celulares (Figura 11a), aun cuando su expresión había sido documentada en otro modelo de resistencia desarrollado por Hernández-Acevedo et al 2022, publicado por miembros del equipo de trabajo.

Por otro lado, se ha descrito que la SULT1A1 participa en la inactivación de los principales metabolitos biológicamente activos del tamoxifeno. Se observó una notable

disminución en la expresión de SULT1A1 en la variante H con respecto a la variante nativa, mientras que su expresión en la variante I se mantuvo sin cambios en relación con las células parentales. Se amplió el panel experimental para evaluar el efecto del tratamiento con los metabolitos 4-OH Tam y Endoxi a una concentración de 8 μ M por 24h sobre la expresión de SULT1A1 en las variantes. Se eligió la concentración de 8 μ M por ser cercana a los CI50 de la variante H. Los niveles de expresión de SULT1A1 fueron normalizados con los niveles expresión de β -actina y se realizaron 3 repeticiones biológicas para poder llevar a cabo el análisis estadístico. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en la expresión de SULT1A1 entre la variante H y la variante nativa bajo las mismas condiciones de tratamiento, disminuyendo 7.2 veces en la condición control, 9.7 veces en la condición con tratamiento con 4-OHTam y 11.1 veces en la condición con tratamiento con Endoxi en la variante H en relación con la variante nativa (figura 11 c). La expresión de SULT1A1 no cambia de forma estadísticamente significativa entre los grupos de la misma variante bajo distintas condiciones de tratamiento para el caso de las variantes nativa e I (figura 11 b y c). La variante I no presenta diferencias estadísticamente significativas en la expresión de SULT1A1 en relación con la variante nativa (no indicado en la gráfica) ni por efecto de los tratamientos con los metabolitos entre los grupos de la misma variante, aunque si es posible apreciar de forma visual un ligero aumento en la intensidad de bandeo en las condiciones con tratamiento en relación con la condición control. Para los análisis estadísticos se llevó a cabo un ANOVA de una vía ($F(8,18) = 15.56$, $p < 0.0001$) seguido de un análisis Post-Hoc utilizando la prueba de Tukey en el programa GraphPad Prism 8.



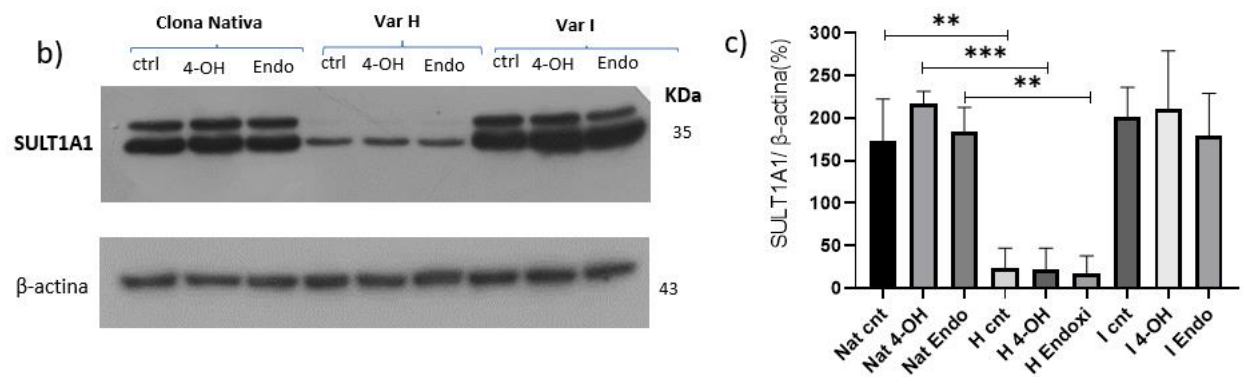


Figura 11. Marcadores proteicos implicados en la quimiorresistencia. a) Determinación de la expresión ABCC12 y SULT1A1 en las 3 variantes a través de la técnica de WB. b) Imagen representativa de la evaluación de la expresión de SULT1A1 bajo la influencia de tratamiento de 8μM 4-OH tamoxifeno (4-OH) o Endoxifeno (Endo) por 24 h y una condición control. c) Gráfica normalizada de SULT1A1 con la expresión de actina, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. Gráfica generada con GraphPad Prism 8.

Se ha reportado en la literatura que la adquisición de resistencia puede estar asociada a cambios fenotípicos relacionados al desarrollo de transiciones epitelio-mesénquima (EMT). Las células tumorales que atraviesan las EMT presentan características similares a las células troncales que tienen la capacidad de diferenciarse en distintas estirpes (J. Lu et al., 2009). Es muy probable que las EMT se encuentren asociadas al cambio en la expresión de receptores hormonales reportado en diversos estudios clínicos que se observa en tumores metastásicos (Y. Lu et al., 2021; Nguyen et al., 2019).

De forma interesante, la variante H sufrió un cambio considerable con respecto a su morfología original, pasando de ser epitelial a presentar una morfología muy similar a la de células mesenquimales. Lo anterior sugiere que deben existir cambios fenotípicos importantes en la mencionada variante por lo que se decidió evaluar la expresión de receptores hormonales.

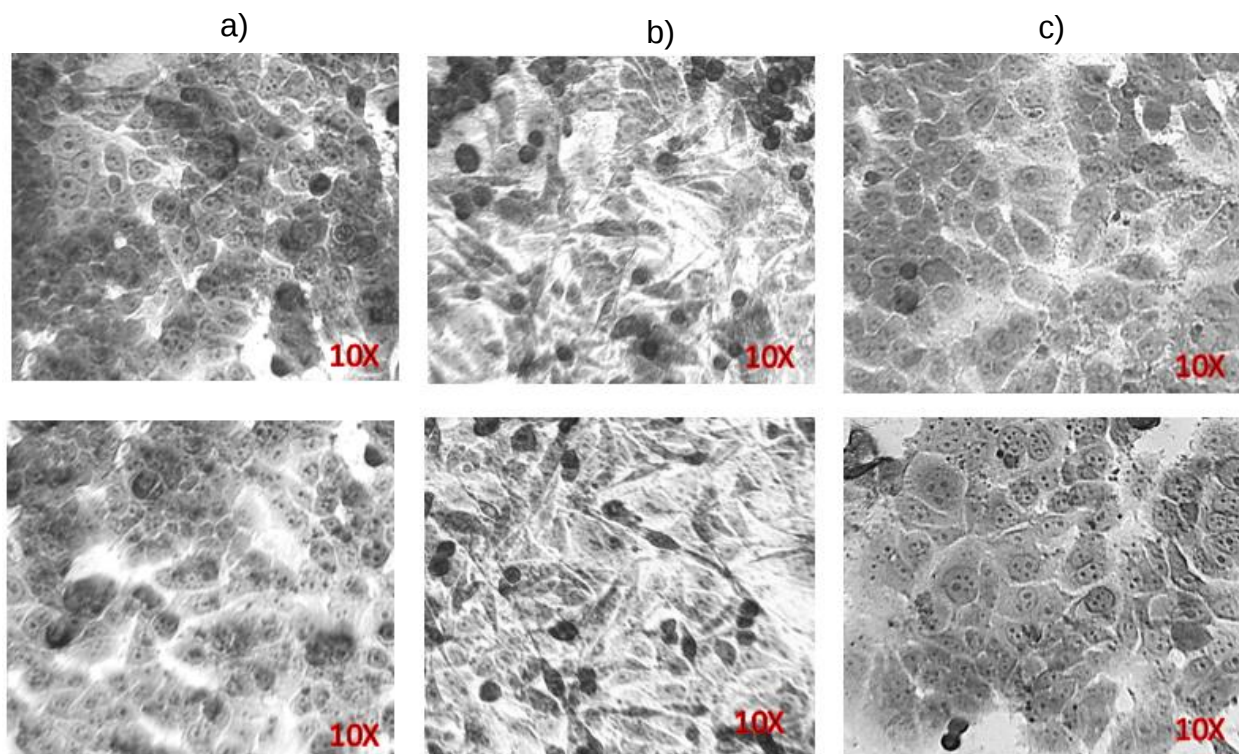


Figura 12. Morfología de las variantes teñidas con hematoxilina-eosina vistas al microscopio óptico de luz con objetivo 10X. a) Variante nativa que expresa el fenotipo epitelial característico, b) Variante H que sugiere la expresión de un fenotipo mesenquimal, c) Variante I con fenotipo epitelial.

6.3 Evaluación de la expresión de receptores hormonales

Se evaluó la expresión basal de receptores hormonales: el RE α , el HER2 y PR en las variantes resistentes y se comparó con la variante nativa (Figura 13). Los resultados indican una importante disminución en los niveles de expresión de los 3 receptores hormonales en la variante H, fenotipo similar al observado en células tumorales mamarias triple negativas, con alta capacidad invasiva y metastásica. Con respecto a la variante I, se observó un ligero aumento en la expresión del RE α y HER2, así como una disminución en la expresión de PR.

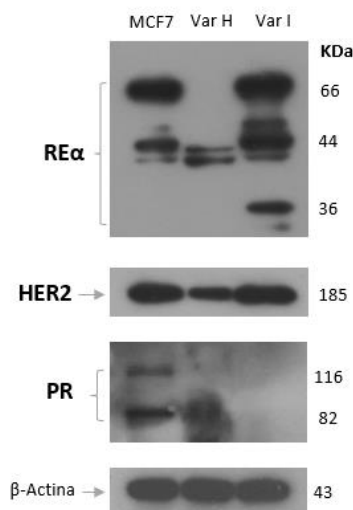


Figura 13. Evaluación de la expresión de receptores hormonales. Receptor de estrógenos (RE); Factor de crecimiento epidermal 2 (HER2); Receptor de progesterona (PR); β -actina como control de carga.

Al ser el RE α el blanco de los metabolitos, se evaluó el efecto de los tratamientos con 4-OH Tam y Endoxi a una concentración de 8 μ M sobre su expresión en las variantes (Figura 14 a y b). Los niveles de expresión de RE α fueron normalizados con los niveles de expresión de β -actina y se realizaron 3 repeticiones biológicas para poder llevar a cabo los análisis estadísticos pertinentes. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en la expresión de RE α entre la variante nativa y la variante H bajo las mismas condiciones de tratamiento, disminuyendo 21.72 veces en la condición control, 41.43 veces en la condición con tratamiento con 4-OHTam y 74.68 veces en la condición con tratamiento con Endoxi en la variante H en relación con la variante nativa (figura 14 b). Con respecto a la variante I no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación con la variante nativa (no indicado en la gráfica). La expresión del RE α no cambia de forma estadísticamente significativa por la influencia de los tratamientos entre los grupos de la variante nativa y la variante H, sin embargo, si se observa un cambio estadísticamente significativo en la variante I entre la condición control y el tratamiento con endoxifeno. Los resultados se obtuvieron a través de ANOVA de una vía ($F(8,18) = 32.14$, $p < 0.0001$) seguido de un análisis Post-Hoc utilizando la prueba de Tukey en el programa GraphPad Prism 8.

Debido a la similitud en la expresión de receptores hormonales entre la variante H y células triple negativas, que presentan una mayor capacidad de migración e invasión, se decidió evaluar estos procesos en la variante H.

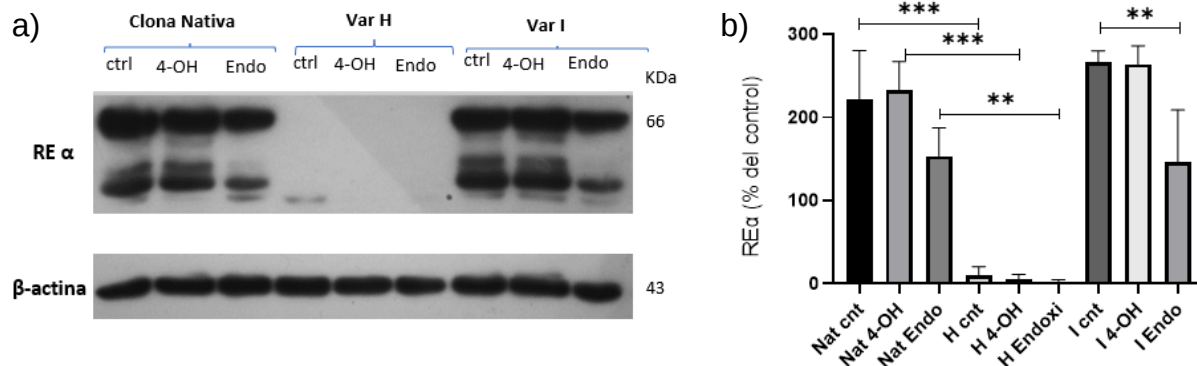


Figura 14. Evaluación de la expresión de REα bajo la influencia de los tratamientos de 8μM de 4-OH tamoxifeno (4-OH) o Endoxifeno (Endo) y una condición control. β-actina como control de carga. a) Imagen representativa del Western-Blot de REα, b) Gráfica normalizada de REα con la expresión de actina, *** p<0.0001, ** p<0.01. Gráfica generada con GraphPad Prism 8.

6.4 Evaluación de capacidad de migración e invasión

En primera instancia, se determinó a través de la técnica de zimografía la secreción y actividad de metaloproteinasas. La secreción de estas moléculas por parte de las células tumorales *in vivo* permite la remodelación de la matriz extracelular favoreciendo la invasión local e intravasación y con ello su llegada a órganos y tejidos distantes. Para el ensayo se utilizó el medio extracelular colectado de cultivos de las tres variantes después de 24h de tratamiento con los metabolitos y una condición control con DMEM experimental (Figura 15 a). Se utilizó como control positivo en el primer carril (izquierda a derecha) medio extracelular de células tumorales de cáncer de próstata PC3 que se conoce presentan una considerable secreción de metaloproteinasas, predominante de metaloproteinasas 9 (MMP-9) con un peso molecular de 90 kDa. Como puede apreciarse en la figura 15, únicamente se detectó actividad de metaloproteinasas en los carriles correspondientes a variante H, apreciable como un bandeo en el mismo peso molecular que la banda control de PC3. Se llevaron a cabo 3 repeticiones biológicas y

posteriormente los análisis estadísticos correspondientes. Como era de esperarse, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre la variante nativa y la variante H bajo las mismas condiciones de tratamiento. Los tratamientos con los metabolitos no generaron una variación estadísticamente significativa en la actividad/secreción de metaloproteinasas en las variantes (figura 15 b). Los resultados se obtuvieron a través de una prueba ANOVA de una vía ($F(8, 27) = 12, p < 0.0001$) seguido de un análisis Post-Hoc utilizando la prueba de Tukey en el programa GraphPad Prism 8.

Por otro lado, se determinó la expresión total y la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) en el residuo de tirosina 397 (Y397). p-FAK^(Y397) se encuentra relacionada con las EMT y procesos de migración e invasión. Como puede apreciarse en la figura 15 c) se encontraron niveles ligeramente mayores de expresión de FAK y un incremento en la fosforilación en la variante H, resultado esperado considerando los hallazgos previos.

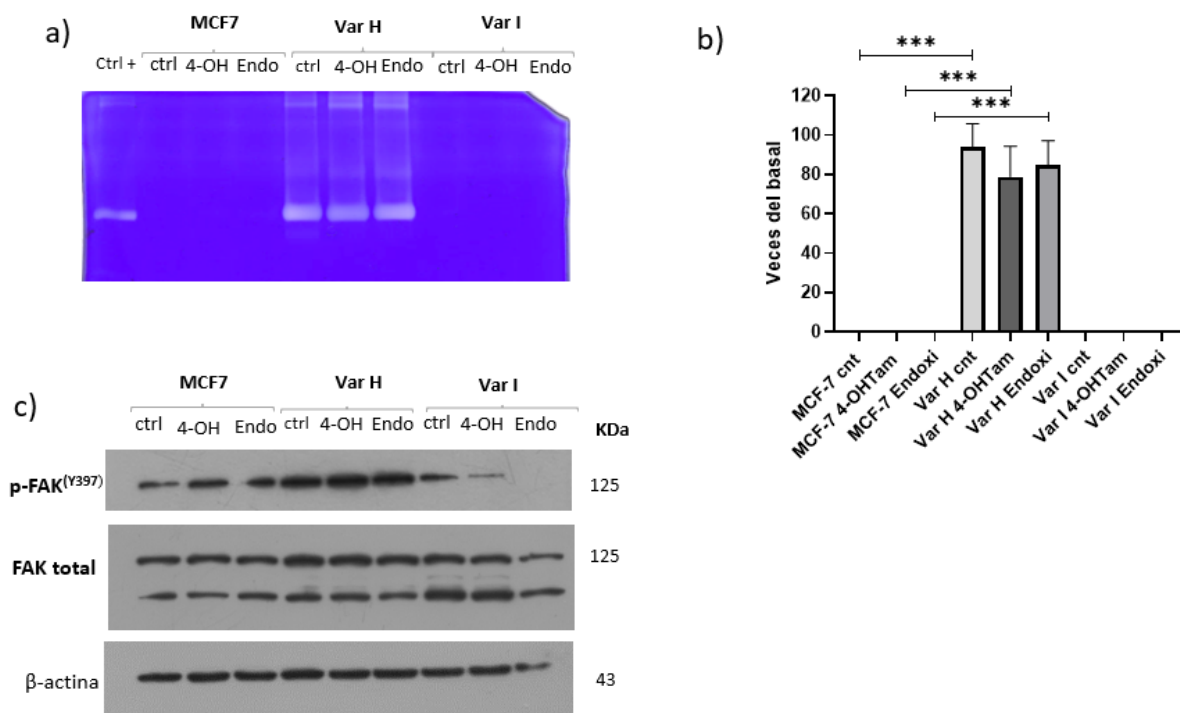


Figura 15. Marcadores de migración e invasión. a) Zimografía del medio extracelular de las variantes tras un tratamiento de 24h a una concentración 8μM de los metabolitos y una condición control, se utilizó medio extracelular de PC3 como control positivo de la actividad de metaloproteinasas. b) Gráfica comparativa de la secreción de metaloproteinasas en las tres

variantes, *** $p < 0.0001$. c) Western Blot representativos de los niveles de FAK total y p-FAK^(Y397) tras un tratamiento de 24h a una concentración 8 μ M de los metabolitos y una condición control.

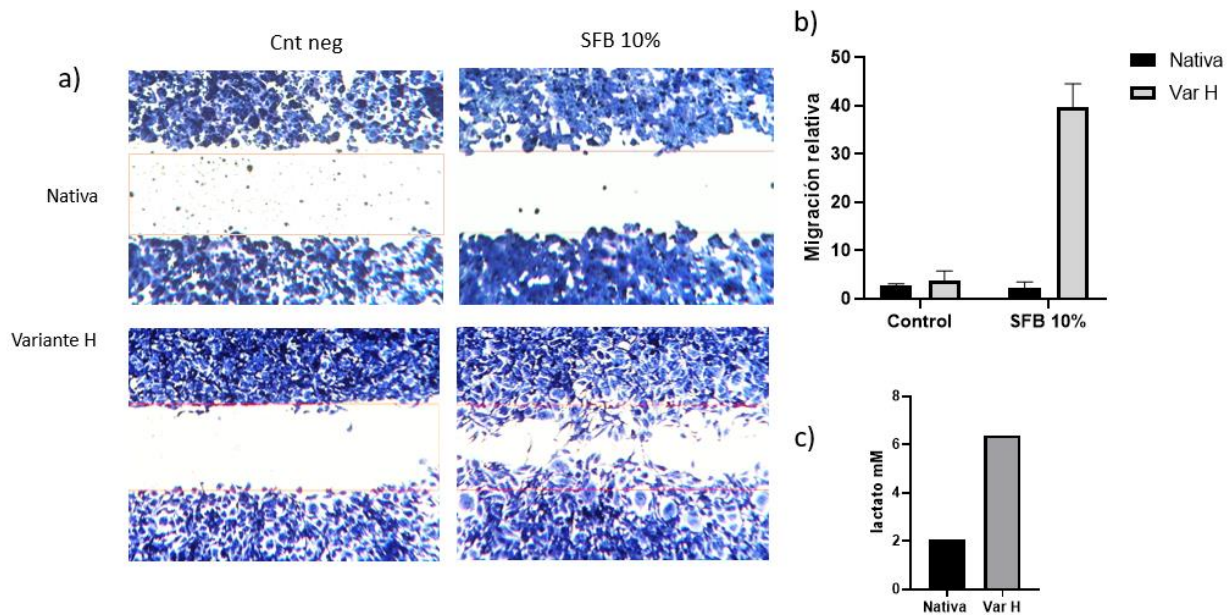


Figura 16. Evaluación de la capacidad migratoria y la actividad metabólica. a) Ensayo de cierre de herida de la variante H vs la variante nativa. b) Gráfica representativa del ensayo de cierre de herida. c) Determinación de lactato en el medio extracelular de la variante H vs la variante Nativa.

De manera complementaria se llevó a cabo un ensayo de cierre de herida para evaluar la capacidad migratoria de la variante H en comparación con las células MCF-7 nativas. Se utilizaron cajas con 95-100% de confluencia tratadas con mitomicina-C durante 2h, posteriormente la rayadura se realizó con una punta de micropipeta. Para el control negativo las células se mantuvieron en medio DMEM experimental y como inductor de la migración se utilizó DMEM suplementado con SFB al 10%. Las células se incubaron por un periodo de 60-65 h, posterior al cual se fijaron con paraformaldehído al 4% y tiñeron con azul de Coomassie. Se obtuvieron fotografías utilizando la cámara acoplada a microscopio invertido. Como puede apreciarse en la figura 16 a) y 16 b) fue evidente la migración de la variante H en el sitio de la rayadura bajo el estímulo de SFB al 10%, fenómeno que no se observa en la variante nativa.

Por otro lado, se llevó a cabo la determinación de la cantidad de lactato liberado al medio extracelular durante un periodo de 24h en cultivos de las variantes con la misma confluencia. Aunque inicialmente se identificó al lactato como producto de desecho del metabolismo anaerobio, se ha descrito que un aumento de la producción de este metabolito por parte de las células tumorales se relaciona con un aumento en su agresividad, ya que la acidificación microambiente promueve los procesos de migración y metástasis, así como la evasión de la respuesta inmune (de la Cruz-López, Castro-Muñoz, Reyes-Hernández, García-Carrancá, & Manzo-Merino, 2019). De forma coincidente con los resultados previos, se determinó de forma aproximada una cantidad 3 veces mayor de lactato en el medio correspondiente a la variante H en comparación con el medio correspondiente a la variante nativa (Figura 16 c).

Los mecanismos moleculares implicados en la transformación fenotípica de la variante H podrían ser numerosos. Se ha descrito en diversos estudios que la función del factor nuclear eritroide 2 similar al factor 2 (Nrf2) podría estar relacionada con el desarrollo de resistencia al tratamiento, reprogramación metabólica, adquisición de características de células troncales, así como aumento de migración e invasión (Gao, Morine, Yamada, Saito, & Ikemoto, 2021), por lo que se decidió evaluar su participación en los modelos celulares.

6.5 Determinación del papel de Nrf2 sobre los cambios fenotípicos

Nrf2, conocido como el regulador maestro de la homeostasis redox y cuya actividad es inducida en respuesta al estrés oxidativo, es una proteína de 605 aminoácidos (66 kDa) codificada por el gen *NEFL2* que actúa como factor de transcripción de un conjunto de genes que aumentan la capacidad antioxidante celular (Robertson, Dinkova-Kostova, & Hayes, 2020). Estos genes presentan elementos de respuesta antioxidante (por sus siglas en inglés ARE: 5'-TGACNNNGC-3') en su región promotora (Lin, Cantley, & DeNicola, 2016). Se ha descrito en numerosos estudios la participación de Nrf2 y los genes con elementos ARE en el desarrollo y la progresión tumoral (Sánchez-Ortega, Carrera, & Garrido, 2021).

Se evaluaron los niveles citosolicos de Nrf2 en las tres variantes bajo el tratamiento con los metabolitos a una concentración de 8 μ M y una condición control haciendo uso de la técnica de WB (Figura 17). Como puede apreciarse, para las tres variantes se detectó la presencia de 2 bandas, una en el peso molecular esperado (aprox 66 kDa) y otra con un peso molecular menor de aproximadamente 45 kDa. La banda de 66 kDa aumenta su expresión en la variantes resistentes en comparación con la variante nativa. La banda de 45 kDa presenta una expresión mucho mayor en la variante H en comparación con las otras variantes. En la literatura se han reportado isoformas más cortas de Nrf2 en diversos tipos de cáncer, que se generan a través de splicing alternativo, que pierden su regulación negativa (Goldstein et al., 2016; Mikac et al., 2021). Lo anterior nos lleva a proponer que esta isoforma mas corta de Nrf2 podría estar participando en la generacion del fenotipo observado en la variante H, generando la transcripción constante de genes con elementos ARE.

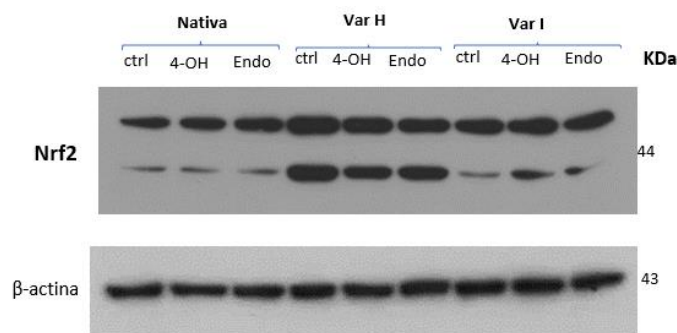


Figura 17. Evaluación de la expresión de Nrf2 a través de la técnica de Western Blot. Tratamiento de 24h. Concentraciones de 8 μ M de 4-OH tamoxifeno (4-OH); 8 μ M de Endoxifeno (Endo). β -actina como control de carga.

Para continuar la evaluación del papel de Nrf2, se llevaron a cabo experimentos sobre la variante H, variante I y células nativas bajo tratamiento con tunicamicina y los resultados se obtuvieron bajo el mismo tiempo de exposición y se compararon. La tunicamicina inhibe el proceso de glucosilación en el retículo endoplásmico, generando estrés del retículo endoplásmico y ROS, induciendo la activación de Nrf2. Para el primer acercamiento se utilizaron concentraciones crecientes de tunicamicina de 0.25-4 μ g/mL.

En la variante nativa puede observarse un aumento proporcional de la intensidad de la banda de 66 kDa de Nrf2 en relación con la concentración de tunicamicina, mientras que en la variante H se observa un aumento de intensidad en las concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ en adelante. Las bandas en la variante I se aprecian con una intensidad similar a la variante H, aumentando su intensidad a partir de la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a la banda de 45 kDa, se observó una disminución de su intensidad en las concentraciones de 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ en la variante nativa, mientras que en la variante H la intensidad de la banda aumento desde la concentración de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ y se mantuvo sin cambios independientemente de la concentración de tunicamicina. En la variante I su expresión aumentó a partir de la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ pero su aumento no fue tan significativo como lo que se observa con la variante H.

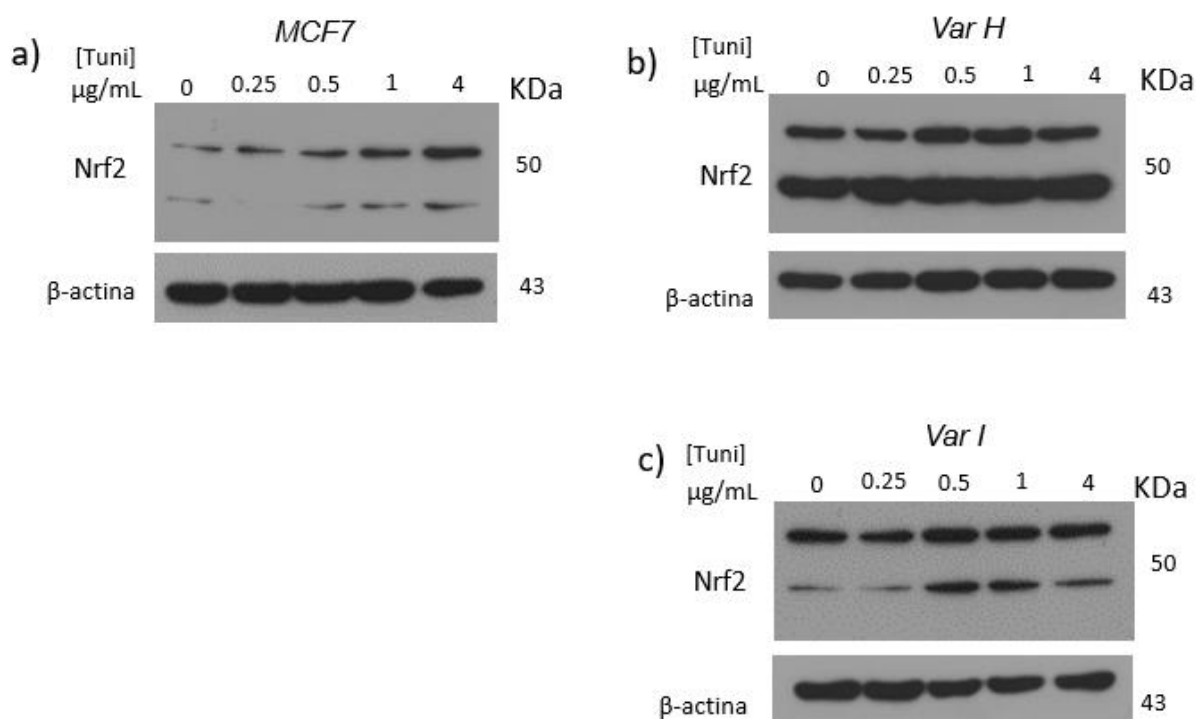


Figura 18. Efecto de concentraciones crecientes de tunicamicina sobre la expresión de Nrf2 después de un tratamiento de 24h. a) Variante Nativa. b) Variante H. c) Variante I. β -actina como control de carga.

También se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de tunicamicina durante un periodo de 24h sobre la expresión de los receptores hormonales $\text{RE}\alpha$ y HER2 (Figura

19). En la variante nativa se observó un aumento gradual de la expresión del RE α de la concentración de 0.25 a la de 1 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, en la concentración mayor, de 4 $\mu\text{g/mL}$, se observó una disminución de la expresión del receptor a niveles incluso menores que en la condición basal. Para la variante H, se observó una disminución de la expresión del RE α en concentración de 0.25 $\mu\text{g/mL}$, la expresión aumenta a niveles de la condición control con una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y disminuye en las concentraciones de 1 y 4 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a HER2, su expresión se mantiene sin cambios en la variante nativa de la concentración de 0.25 a la de 1 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamicina. No obstante, en la concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ se observa una considerable disminución en su expresión. Para la variante H, se observa una notable disminución de su expresión desde la concentración de 0.25 hasta la de 1 $\mu\text{g/mL}$. En la concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ se observa un ligero aumento de su expresión.

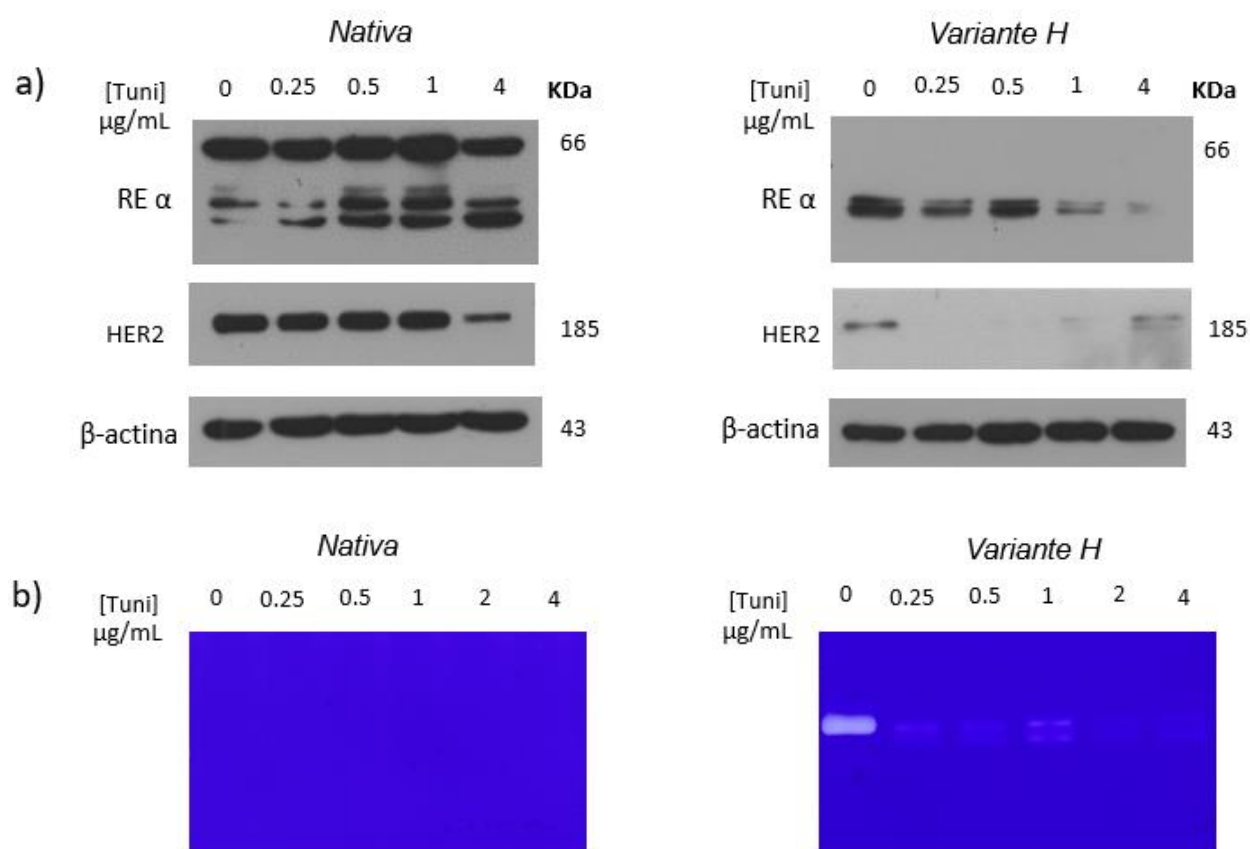
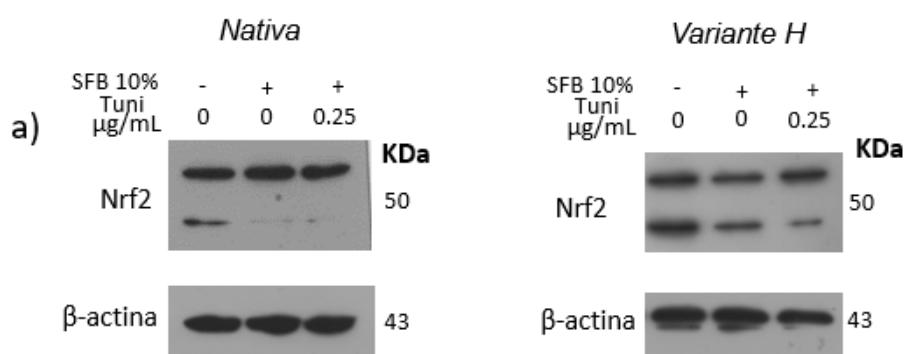


Figura 19. Efecto del tratamiento por 24h de concentraciones crecientes de tunicamicina sobre la expresión de receptores hormonales en la variante nativa y variante H. b) Efecto de

concentraciones crecientes de tunicamicina sobre la secreción de metaloproteinasas al medio extracelular en la variante nativa y la variante H.

Se recolectó medio extracelular del experimento anterior de la variante H y se evaluó la actividad de metaloproteinasas. Como puede apreciarse, los tratamientos con tunicamicina, independientemente de la concentración, disminuyen considerablemente la actividad de las metaloproteinasas y generan la aparición de una segunda banda por debajo de la banda habitualmente observada correspondiente a la MMP-9. La presencia de la banda inferior probablemente se debe a una modificación en la glucosilación de MMP-9 que aún conserva la 3actividad gelatinasa.

Se evaluó el efecto de la combinación de suero fetal bovino al 10% y la concentración más baja de tunicamicina (0.25 µg/mL) evaluada en los experimentos previos, esto considerando la inducción de una condición baja de estrés del retículo endoplásmico que no induzca citotoxicidad. Como puede apreciarse en la figura 20, la banda de menor peso molecular de Nrf2 disminuyó en presencia de SFB al 10% y aún más en combinación con 0.25µg/ mL de tunicamicina tanto en la variante nativa como en la variante H. El comportamiento de la expresión de los receptores hormonales fue similar, disminuyo en presencia de SFB al 10% y aún más en combinación con 0.25 µg/mL de tunicamicina para ambas variantes, pero de forma notablemente mayor en la variante H.



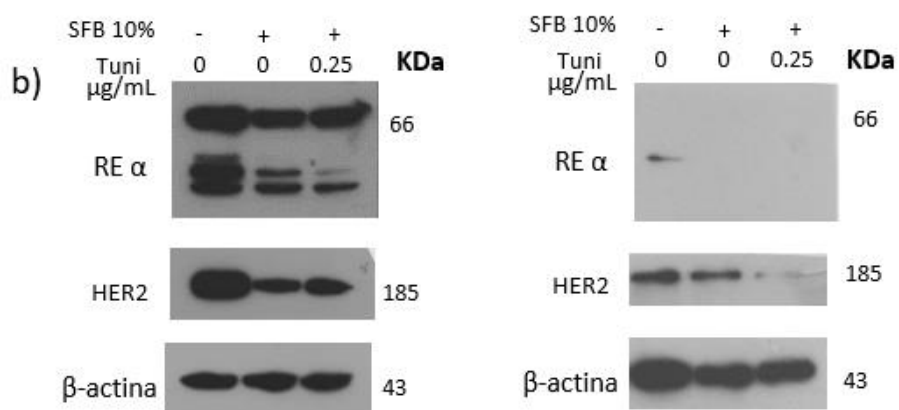


Figura 20. Evaluación del efecto de tunicamicina a una concentración 0.25 μM en conjunto con SFB 10% sobre la expresión a) de Nrf2 y b) sobre la expresión de receptores hormonales.

De igual forma, se evaluó el efecto de la combinación del suero fetal bovino al 10% y 0.25 $\mu\text{g/ mL}$ de tunicamicina sobre la capacidad migratoria y secreción de metaloproteinasas en la variante H durante un periodo de 60-65h. Estimuladas con SFB al 10% en combinación con 0.25 $\mu\text{g/ mL}$ de tunicamicina las células de la variante H aumentaron su capacidad migratoria notablemente, lo que no sucedió con las células nativas (figura 21 a y b). La secreción de metaloproteinasas en la variante H también aumento de forma considerable con SFB al 10% y mucho más en combinación con tunicamicina.

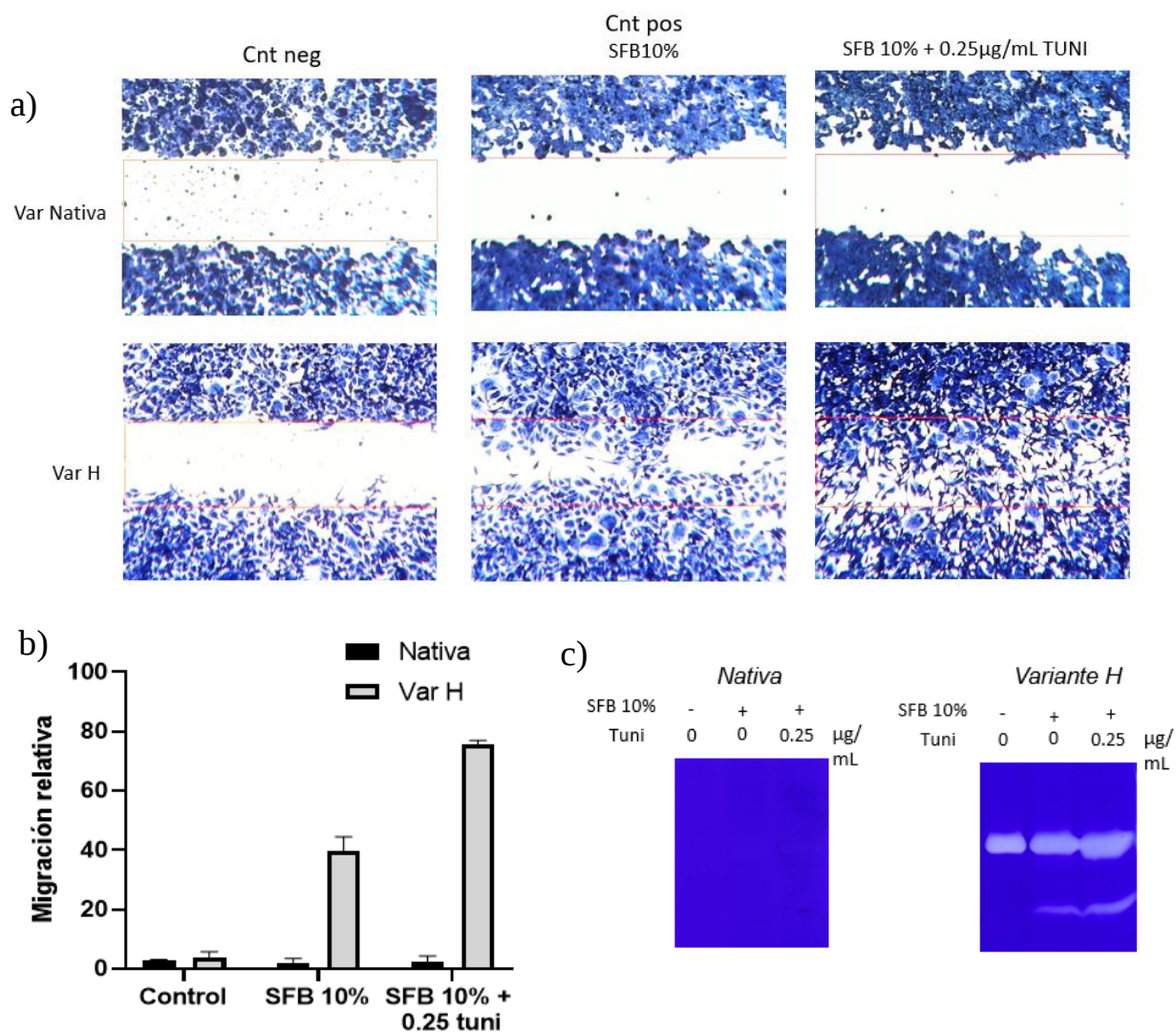


Figura 21. Evaluación del efecto de tunicamicina a una concentración 0.25 μM en conjunto con SFB 10% sobre los procesos de migración e invasión. a) Ensayo de cierre de herida y b) su respectiva gráfica, c) Zimografía del medio extracelular de las células nativas y la variante H.

6.6 Aislamiento de RNA total para la caracterización de la expresión de moléculas relacionadas a la quimiorresistencia a nivel de mRNA

Con la finalidad de determinar la expresión de marcadores de resistencia a nivel de mRNA, se llevó a cabo la extracción de RNA total de las tres variantes utilizando Trizol. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad de los

aislamientos. Como puede apreciarse en la en la electroforesis del RNA total de la variante H (figura 22 a), además de las dos bandas mayoritarias esperadas correspondientes al RNA ribosomal eucariota 28s y 18s, se observó una banda con un peso intermedio entre las dos. Con la finalidad de descartar la contaminación bacteriana como posible causa de la aparición de la banda intermedia, que presentaba un peso aparente coincidente con el del RNA ribosómico bacteriano 23s, se llevó a cabo una electroforesis en la que se incluyó RNA total de la variante H, RNA total de la variante I y RNA total de células bacterianas (figura 22 b). Como puede apreciarse, la banda correspondiente al RNA ribosómico bacteriano 23s se encuentra ligeramente por debajo de la banda intermedia de la variante H, además de que no se observó la presencia de la banda 16s en los carriles de la variante H. Lo anterior indica que es poco probable que la banda intermedia se deba a contaminación bacteriana y nos permite proponer que su presencia posiblemente se encuentra asociada al fenotipo expresado en la variante H.

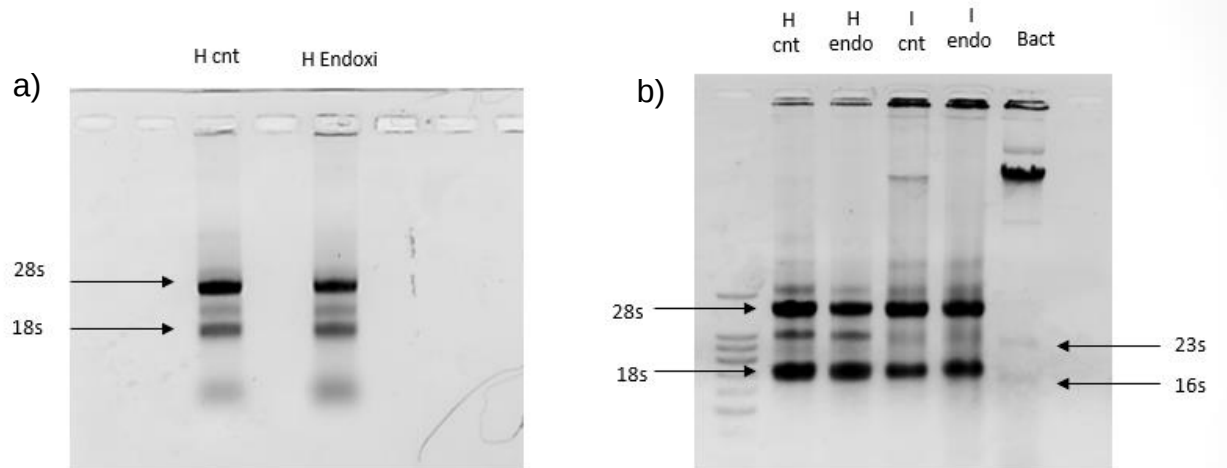


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total. a) RNA total de la variante H. Bandas mayoritarias de RNA ribosomal eucariota se indican con flechas. Es posible apreciar la presencia de una banda intermedia. b) RNA total de las variantes H e I, así como RNA total bacteriano. Bandas mayoritarias de RNA ribosomal eucariota y procariota se indican con flechas.

7. Discusión de resultados

7.1 Desarrollo y evaluación de variantes quimiorresistentes

Se generaron dos variantes celulares, H e I, las cuales son resistentes al tratamiento con los metabolitos del tamoxifeno partiendo de la línea celular tumoral MCF-7, la cual es un modelo biológico del subtipo molecular luminal A. Este subtipo molecular se caracteriza por expresar el RE, por ser poco agresivo y por tener una baja capacidad metastásica (Comşa, Cîmpean, & Raica, 2015).

El esquema de tratamiento utilizado fue adaptado de protocolos de resistencia previamente realizados por el grupo de trabajo que permitieron el desarrollo de diversas variantes quimiorresistentes a uno o a ambos metabolitos derivados del tamoxifeno (Variantes A-G). Se consideraron las condiciones que permitieron la obtención de las variantes con mejores resultados en cuanto a resistencia.

En este trabajo se comparó el protocolo utilizado con lo descrito en la literatura. En el artículo de Guney y colaboradores se comparó la resistencia generada en la línea celular MCF-7 a partir de diversos esquemas de tratamiento con 4-OHTam, en medio DMEM con suero fetal al 5%, que variaban en tiempo y concentración. Los autores obtuvieron los mejores resultados con una concentración continua de 1 μ M del metabolito durante un periodo de 3 meses, dicha variante mostró un aumento en la viabilidad del 137% a las 72 h de tratamiento con una concentración de 1 μ M de 4-OHTam en comparación con células MCF-7 sensibles (Guney Eskiler, Cecener, Tunca, & Egeli, 2016). El comportamiento de nuestras variantes celulares en el ensayo de MTT fue distinto, no se observan diferencias importantes entre la viabilidad de las variantes resistentes y de las células nativas en la concentración de 1 μ M, sin embargo, se observa un ligero aumento de la viabilidad a una concentración de 4 μ M con ambos metabolitos en la variante H, lo que no sucede con las otras variantes. Se observa una disminución importante de la viabilidad en las variantes resistentes y en las células nativas a una concentración de 8 μ M, mas marcada en estas últimas (Figura 10). Jones y colaboradores determinaron las diferencias entre las variantes resistentes generadas mediante el tratamiento con una

concentración de 1 μ M de 4OHTam por 24 meses y el tratamiento con 1 μ M de Endoxifeno por el mismo periodo de tiempo en células MCF7 y T47D. Los autores describen que únicamente en las células resistentes generadas con endoxifeno se presentó la pérdida de la expresión del RE α y del PR, así como la adquisición de características similares a células troncales y la activación de vías relacionadas a las EMT (Jones et al., 2021), similar a lo observado en la variante H que se comentará más adelante. En nuestro protocolo se utilizaron en conjunto 4-OHTam y Endoxi con la finalidad de mimetizar lo que sucede en el microambiente tumoral cuando las pacientes se encuentran bajo tratamiento con tamoxifeno, considerando que el 4-OHTam y Endoxi son los principales metabolitos activos. No se encontraron artículos en los que se utilizaran ambos metabolitos para la generación de resistencia, por lo que nuestro estudio resulta pionero en el área.

Por otro lado, la cantidad de proteína de LDL utilizada para la generación de la variante I (75 μ g/mL, equivalente de forma aproximada a 135 μ g/mL o 13.5 mg/dL de LDL-colesterol) fue la concentración máxima que se pudo alcanzar en 6 mL de medio de cultivo haciendo uso de las fracciones de plasma enriquecidas con LDL, aisladas a partir de plasma humano de un donante con niveles de colesterol-LDL dentro de los rangos normales. Previamente, se evaluó la internalización de Dil- LDL en la línea celular MCF-7 a través de citometría de flujo. Se utilizó una concentración de Dil-LDL de 7.5 μ g/mL y otra 10 veces mayor de 75 μ g/mL, sin embargo, la fluorescencia de las células tratadas con la concentración de 75 μ g/mL no aumentó de forma significativa en relación con la de las células tratadas con la menor concentración. Lo anterior sugiere que la internalización de las LDL en las células MCF-7 es mediada por un proceso saturable. Se ha descrito en la literatura que las MCF-7 tienen una baja capacidad de internalizar LDL en comparación con líneas celulares con fenotipo triple negativo como las MDA-MB-231 y las MDA-MB-436 (Antalis et al., 2010), lo que coincide con resultados de nuestro grupo de trabajo.

Una vez culminado el protocolo de quimiorresistencia, se evaluó la viabilidad de las variantes H e I después de 72 h de tratamiento con ambos metabolitos por separado a través de la técnica de MTT. Se obtuvieron para la variante H valores de CI₅₀ mayores

por alrededor de una unidad que los obtenidos para las células MCF-7 nativas con ambos metabolitos. En la variante I se obtuvo un valor de CI_{50} de aproximadamente el doble que el obtenido para las células nativas con 4-OH Tam, sin embargo, para endoxi el valor de CI_{50} fue apenas mayor al de la variante nativa. Lo anterior nos indica que la presencia de una mayor concentración de LDL en el medio tuvo un efecto sobre la generación de resistencia. Ya se ha descrito con anterioridad en la literatura que el metabolismo lipídico y las concentraciones celulares de colesterol influyen en la generación de resistencia al tamoxifeno (Poirot et al., 2012).

Con la finalidad de determinar los blancos proteicos que podrían estar implicadas en la quimiorresistencia en las variantes generadas, se evaluó, a través de la técnica de Western Blot, la expresión proteica de blancos que se han relacionado previamente en la literatura con el desarrollo de resistencia al tratamiento farmacológico. La familia de transportadores ABC, en especial el ABCB1, se ha relacionado con el eflujo de los metabolitos del tamoxifeno (Teft et al., 2011). Guney y colaboradores determinaron que los transportadores ABCB1, ABCB2 y ABCC1 se encontraban sobre-expresados en células MCF-7 resistentes a 4-OHTam en comparación con células MCF-7 sensibles (Guney Eskiler et al., 2016). Por dificultades en la evaluación de la expresión de los transportadores ABC a través de la técnica de Western Blot, se optó por evaluar al transportador ABCC12, cuya expresión ya había sido caracterizada previamente por el grupo de trabajo, sin embargo, finalmente no fue posible determinar su expresión en las variantes. En un futuro cercano se planea evaluar la expresión de dichos transportadores a través de la técnica de citometría de flujo o haciendo uso del potenciador para WB SuperSignal de la marca Thermo Scientific, que incrementa la señal de quimioluminiscencia.

Se determinó en las variantes celulares la expresión de la Sulfotransferasa 1A1 (SULT1A1), enzima de fase II que participa en la inactivación del 4OHTam y Endoxi al transferirles un grupo sulfonato al hidroxilo fenólico en sus estructuras desde el 3'fosfoadenosin 5'fosfosulfato (PAPS). Se ha descrito la sobreexpresión de SULT1A1 en líneas celulares tumorales mamarias, así como en tumores mamarios en relación a los tejidos circundantes (Yao-Borengasser et al., 2014). Con respecto a los resultados

obtenidos, contrario a lo esperado, se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (ANOVA, prueba de Tukey) de su expresión en la variante H en relación con las células nativas. Por otro lado, su expresión no mostró cambios estadísticamente significativos en la variante I en relación con las MCF-7 nativas. Tomando en cuenta el resultado anterior, se decidió evaluar la expresión del blanco de los metabolitos en las variantes, el receptor de estrógenos α (RE α). De forma interesante, se encontró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en la expresión del RE α en la variante H en relación con las células nativas, lo que no sucedió con la variante I que incluso presentó un ligero aumento en su expresión.

Retomando lo anteriormente descrito en relación a la variante H, aunque la disminución de la expresión de SULT1A1 podría indicar un menor metabolismo del 4-OH tamoxifeno y endoxifeno en estas células, la expresión notablemente a la baja del RE α nos permite deducir que al disminuir su blanco farmacológico se pierde la necesidad de inactivar a los metabolitos. Cabe mencionar que procesos de silenciamiento mediante metilación del promotor de los genes que codifican para RE α (Belachew & Sewasew, 2021) y para SULT1A1 (Kim et al., 2010) podrían participar en su regulación a la baja.

De forma importante, se ha relacionado la pérdida de la expresión del RE α , en células inicialmente RE+, con la falta de sensibilidad al tratamiento hormonal y con el desarrollo EMT (Bouris et al., 2015; Sahoo et al., 2021). En el estudio de Bouris y colaboradores, la regulación a la baja del RE α con un shRNA en células MCF-7 llevó a estas a perder la capacidad de generar sus colonias características y a la adquisición de una organización más individual y alargada, coincidiendo con una marcada reducción de marcadores epiteliales y un aumento considerable de marcadores mesenquimales (Bouris et al., 2015). En relación con lo anterior y haciendo énfasis en la variante H, ésta mostró un cambio importante en su morfología, adquiriendo un aspecto similar al de células mesenquimales y de forma crítica al de células con fenotipo triple negativo. Por su parte, las células de la variante I se mantuvieron con una morfología epitelial. Debido a las observaciones previas, se decidió evaluar la expresión de los receptores hormonales HER2 y PR en las variantes, encontrándose una disminución importante en su expresión en la variante H, al igual que con el RE α , fenómeno que no sucedió con la variante I.

Es muy probable que las EMT se encuentren involucradas en el cambio fenotípico observado en la variante H. Diversas vías de señalización se encuentran implicadas en las EMT como la vía del factor transformante beta (TGF- β), la vía del receptor de tirosina cinasa (RTK), la vía Wnt/ β -catenina, entre otras. Estas vías modifican la expresión de factores de transcripción como Snail, Twist y Zeb generando un cambio fenotípico de células epiteliales a uno similar al de células mesenquimales (Babaei, Aziz, & Jaghi, 2021).

Las EMT favorecen de igual manera los procesos metastásicos en las células tumorales. Se decidió evaluar la capacidad de migración e invasión, procesos relacionados con la metástasis y la presencia de EMT, en las distintas variantes de forma indirecta a través de estudios *in vitro*. Se determinó la secreción de metaloproteinasas, la activación de la cinasa FAK y se llevó a cabo el ensayo de cierre de herida para cumplir con lo anterior. En concordancia con los resultados previos, la variante H fue la única en la cual pudo detectarse la actividad de metaloproteinasas a través de la técnica de zimografía, además se observó una mayor fosforilación de la cinasa FAK y una capacidad migratoria mayor comparada con la variante nativa en el ensayo de cierre de herida (Figuras 15 y 16). Lo anterior sugiere un aumento de la capacidad metastásica de la variante H que probablemente se encuentra asociado a su cambio fenotípico.

Cabe mencionar que células que atraviesan el proceso de EMT adquieren características similares a las células troncales cancerosas (CTC) que presentan un mayor plasticidad celular (Babaei et al., 2021). El fenómeno observado en la variante H podría relacionarse con lo descrito en diversos estudios clínicos con respecto a la discrepancia que puede existir en los marcadores hormonales entre tumores primarios y tumores recurrentes o metastásicos. Por ejemplo, en el estudio retrospectivo de Nguyen y colaboradores, llevado a cabo de 2014-2018 en el Hospital Nacional de Cáncer de Vietnam, se analizó el estatus de RE, PR y HER2 en 67 pacientes con cáncer de mama recurrente, comparándolo con su estatus en el tumor primario. Se encontró un cambio del 26.9% en RE, del 38.8% en PR y de 22.4% en HER2 (Nguyen et al., 2019). De igual forma, en el estudio retrospectivo llevado a cabo del año 2009 -2016 en el Hospital Ruijun en China que incluyó a 156 pacientes, se reportó que 17.9% de las pacientes presentaron

discrepancia en los marcadores hormonales entre los tumores primarios y metastásicos (Y. Lu et al., 2021). En el estudio clínico retrospectivo de Mcanena y colaboradores llevado a cabo del 2001-2014 en los Hospitales Galway, en el que se evaluaron 132 pacientes, se describió que 31 (23.5%) presentaron un cambio de fenotipo en tumores recurrentes y que de estas en 18 el cambio fue de luminal A a TNBC (Mcanena et al., 2018), similar a lo observado en la variante H. En este mismo estudio se describe que el cambio de fenotipo de luminal A a triple negativo se asocia a una menor supervivencia a 5 años (Mcanena et al., 2018).

Con respecto a la variante I, se propone que vías relacionados a la homeostasis lipídica estuvieron implicadas en evitar que desarrollara el mismo fenotipo que la variante H. Se ha descrito que los SERMs, como el tamoxifeno y sus metabolitos, son capaces de alterar el metabolismo lipídico celular de forma independiente a su acción sobre el RE (Gómez-Coronado, Lasunción, Martínez-Botas, & Fernandez-Suárez, 2021). Se ha descrito que los SERMS, de forma similar a las estatinas, inhiben la biosíntesis del colesterol y en consecuencia favorecen la activación de la proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP2) y aumenta la expresión de sus genes diana, incluido el receptor de LDL (LDLR). El SREBP2 tiene un papel importante en la homeostasis lipídica, reside en la membrana del retículo y en respuesta a la disminución de las concentraciones de colesterol celulares, es transportada al aparato de Golgi donde es activada para posteriormente favorecer la transcripción que promueven la biosíntesis de colesterol y la captación de colesterol exógeno (Xue et al., 2020). Cuando se normalizan los niveles de colesterol, la proteína SCAP evita la activación de SREBP2. Se ha descrito que los SERMs también interfieren con el tráfico intracelular de LDL, generando la acumulación de colesterol derivado de las LDL en los endo-lisosomas tardíos (Gómez-Coronado et al., 2021). Este bloqueo hace que el LDL colesterol quede atrapado y no pueda regular negativamente a SREBP2, favoreciendo que las células continúen con la endocitosis desmedida de LDL (Fernández-Suárez et al., 2021). Se ha descrito que la sobreactivación de SREBP2 favorece el crecimiento tumoral (Gonzalez-Ortiz et al., 2021). Se propone que las altas concentraciones de LDL en el medio en el que se mantuvo a la variante I sumado a la probable alta cantidad LDLR en dichas células evitaban que parte del LDL-colesterol quedara atrapado en los endo-lisosomas tardíos y

se llevara a cabo la regulación negativa de SREBP2, evitándose así su efecto pro-tumoral. Con la finalidad de comprobar dicha propuesta, se evaluará en un futuro próximo las moléculas del metabolismo lipídico mencionadas con anterioridad en las variantes generadas.

Únicamente se encontró un estudio clínico que se relaciona con lo observado en nuestros modelos celulares. Se evaluaron los perfiles lipídicos de 4,190 pacientes con cáncer de mama en el estudio prospectivo de Jung y colaboradores llevado a cabo de enero del 2008 a marzo del 2014 en el Centro Médico de Cáncer de Mama en Seoul, Corea. Se encontró que pacientes con niveles de LDL-colesterol > 139 mg/dL presentaban un menor riesgo de recurrencia comparado con aquellas pacientes con niveles más bajos. Una desventaja de dicho estudio es que no se menciona el tratamiento farmacológico seguido por las pacientes para el tratamiento del cáncer (Jung et al., 2020).

Con la finalidad de determinar los mecanismos que, aunado al metabolismo lipídico, podrían estar implicados en las diferencias observadas en las variantes H e I, se propuso como candidato al factor nuclear eritroide 2 similar al factor 2 (Nrf2) porque se ha descrito ampliamente en la literatura que tiene un papel relevante en la progresión del cáncer, además de ser uno de los reguladores de la SULT1A1 (Robertson et al., 2020) y los transportadores ABC (Gao et al., 2021; Robertson et al., 2020). De forma importante, en nuestro grupo de trabajo, hemos establecido que la sobreexpresión de Nrf2 se encuentra asociada con el desarrollo de quimiorresistencia en un modelo celular de TNBC (González-Ortiz et al, 2022).

7.2 Descripción del posible papel de NRF2 en la generación de quimiorresistencia

El Nrf2 presenta un papel dual en el desarrollo de cáncer, se ha descrito que su actividad como factor de transcripción de genes antioxidantes protege a las células no tumorales de la malignidad, evitando los daños a las estructuras moleculares como el ADN mediados por las ROS, lo que disminuye la frecuencia de mutaciones (Sánchez-Ortega et al., 2021). Sin embargo, cuando el cáncer ya está establecido, un aumento en la expresión o estabilidad de Nrf2 favorece la supervivencia de las células tumorales,

facilitando su adaptación a las condiciones prooxidantes del microambiente, la adquisición de características más agresivas y quimiorresistencia (Bovilla et al., 2021), además de favorecer las EMT que promueven procesos de migración e invasión.

Se ha descrito previamente que el tamoxifeno aumenta el estrés oxidativo en células MCF-7 al aumentar la actividad de la Óxido nítrico sintasa (NOS) mitocondrial y por lo tanto la síntesis de óxido nítrico (NO) (Yang, Nowsheen, Aziz, & Georgakilas, 2013). En el artículo de Bekele y colaboradores se describe que el estrés oxidativo generado por tamoxifeno en células MCF-7 puede aumentar la actividad de Nrf2 y en consecuencia aumentar la transcripción de proteínas anti-oxidantes y transportadores de multidrogoresistencia (MDRTs) (Bekele et al., 2016). De forma complementaria utilizando datos del estudio: Determinantes tempranas de recurrencia en cáncer de mama, los autores relacionaron que niveles elevados de Nrf2 y sus genes río abajo en pacientes con cáncer de mama al momento del diagnóstico se asocian a una menor supervivencia después del tratamiento con tamoxifeno (Bekele et al., 2016). De igual forma, en el estudio clínico de Onodera y colaboradores, llevado a cabo de 1991-1999 en el Departamento de cirugía en el hospital universitario de Tohoku en Sendai, Japón, se determinó que la presencia de Nrf2 en tumores mamarios se asocia de forma significativa con una mayor recurrencia y con un menor tiempo de supervivencia libre de recurrencia en pacientes que recibieron tratamiento adyuvante endocrino (Onodera, Motohashi, Takagi, & Miki, 2014). Por otro lado, en el estudio de Wolowczyk y colaboradores, los autores determinaron, utilizaron las bases de datos KM plotter y BreastMark, una asociación entre una mayor expresión de 16 genes relacionados a la actividad de Nrf2 en tumores mamarios y una menor supervivencia libre de recurrencia en estas pacientes. Ellos señalan que la determinación de la sobreexpresión de dichos transcritos dependientes de Nrf2 en tumores mamarios podría fungir como factor pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Wolowczyk et al., 2022).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores, se determinaron, a través de la técnica de Western Blot, los niveles citosólicos de Nrf2 en las variantes después de su estimulación con los metabolitos. Como resultado se obtuvieron dos bandas tanto en las variantes resistentes como en las células nativas, la reportada con un peso molecular

aproximado de 66 kDa y una con menor peso molecular de alrededor de 45 kDa (Figura 17). Puede apreciarse que los niveles de Nrf2 de 66 kDa se encuentran aumentados en las variantes resistentes en relación con las células nativas y que el aumento es mayor en la variante H. Con relación a la banda de 45 kDa, esta presenta una alta expresión en la variante H en relación con las células nativas y la variante I. Se han descrito en la literatura isoformas de Nrf2 más cortas, menores a 66 kDa, en diversos tipos tumorales generadas a través de splicing alternativo que provoca la pérdida del exón 2 y/o 3. Dichas isoformas pierden la capacidad de interactuar con KEAP, su regulador negativo canónico, y activan constantemente la expresión de genes con elementos de respuesta antioxidante (ARE), favoreciendo procesos pro-oncogénicos (Goldstein et al., 2016; Mikac et al., 2021). La banda de menor peso molecular (45 kDa) encontrada de forma predominante en la variante H podría corresponder a una isoforma de Nrf2 que escapa de su regulación negativa canónica. Es necesario llevar a cabo más estudios para comprobar esta propuesta haciendo uso de técnicas de proteómica como la secuenciación proteica por espectrometría de masas. Con respecto a la variante I, probablemente algún mediador de la homeostasis lipídica evita la hiperactivación de la vía de Nrf2, sin embargo, se requieren más estudios para determinar la causa.

Con un enfoque en elucidar las respuestas de la variante H con respecto a las células nativas, se realizaron tratamientos con tunicamicina para generar la activación de Nrf2. La tunicamicina es inhibidor de la glucosilación de proteínas, lo que genera la acumulación de proteínas mal plegadas y en consecuencia estrés de retículo endoplásmico que puede desencadenar la activación de la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Lo anterior aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo favoreciendo la activación de Nrf2 (Lin et al., 2016), así como su activación indirecta a través del eje PERK. En la variante H, el tratamiento con tunicamicina favoreció la disminución de la expresión de los receptores hormonales y la combinación de una concentración baja de tunicamicina (0.25µg/mL) con SFB al 10% aumento su capacidad migratoria en el ensayo de cierre de herida y la secreción de metaloproteinasas en la zimografía. Cabe mencionar que está combinación con SFB y la concentración baja de tunicamicina originan una condición mínima de estrés de

retículo endoplásmico. Recapitulando, la activación de Nrf2 parece favorecer las características relacionadas a la agresividad y capacidad metastásica de la variante H.

La determinación de Nrf2 en los tumores mamarios podría funcionar como factor pronóstico y representar un blanco farmacológico cuya modulación permita contrarrestar o evitar los procesos de quimiorresistencia y las EMT en las pacientes con cáncer de mama en tratamiento coadyuvante con tamoxifeno. Ya se ha descrito en la literatura la modulación de Nrf2 haciendo uso de moléculas provenientes de fuentes naturales y sintéticas. Se ha descrito ampliamente el uso de Brusatol como un inhibidor de Nrf2 *in vitro*, sin embargo, su uso *in vivo* conlleva una serie de efectos adversos como son la toxicidad sistémica y efectos secundarios severos observados en estudios clínicos tempranos (Cai, Liu, Han, & Yang, 2019). La búsqueda de nuevas alternativas y/o estrategias para regular la actividad Nrf2, por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular o a través de la síntesis de moléculas pequeñas, se vuelve necesaria.

8. Conclusiones

Se generó una variante celular RE+ resistente al tratamiento de con los metabolitos del tamoxifeno (variante H) y una variante celular RE+ resistente al tratamiento con los metabolitos del tamoxifeno, en un medio con altas concentraciones de LDL (variante I).

Se evaluó la resistencia de las variantes generadas mediante ensayos de viabilidad celular y a través de la evaluación de la expresión de enzimas y transportadores probablemente implicados en la quimiorresistencia. La variante H desarrolló un fenotipo similar al observado en células triple negativas y una mayor capacidad de migración e invasión, procesos en los que probablemente la sobre-activación de la vía de Nrf2 se encuentra implicada. Por su parte, la variante I mostro únicamente ligeros cambios en relación con las células nativas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se rechaza la hipótesis propuesta debido a que mayores concentraciones de LDL en el medio de cultivo parecen haber evitado la adquisición de una mayor quimiorresistencia y de características más agresivas en la

variante I. Sin embargo, dicho resultado se limita por el momento a los fines de este proyecto. Es necesario llevar a cabo la evaluación del efecto de las LDL sobre la quimiorresistencia en otros modelos celulares, así como en modelos *in vivo*.

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. El donador voluntario del plasma firmó una la declaración de consentimiento informado, de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Fuente de financiamiento

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

9. Bibliografía

- Antalis, C. J., Arnold, T., Rasool, T., Lee, B., Buhman, K. K., & Siddiqui, R. A. (2010). High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(3), 661–670. doi:10.1007/s10549-009-0594-8
- Arnone, A. A., Cline, J. M., Soto-Pantoja, D. R., & Cook, K. L. (2021). Investigating the role of endogenous estrogens, hormone replacement therapy, and blockade of estrogen receptor- α activity on breast metabolic signaling. *Breast Cancer Research and Treatment*, 190(1), 53–67. doi:10.1007/s10549-021-06354-w
- Babaei, G., Aziz, S. G. G., & Jaghi, N. Z. Z. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133(November 2020), 110909. doi:10.1016/j.biopha.2020.110909
- Barbosa, A. C. S., Feng, Y., Yu, C., Huang, M., Xie, W., Disease, M., ... Hospital, A. (2019). Estrogen sulfotransferase in the metabolism of estrogenic drugs and in the pathogenesis of diseases. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 1–24. doi:10.1080/17425255.2019.1588884.Estrogen
- Bekele, R. T., Venkatraman, G., Liu, R. Z., Tang, X., Mi, S., Benesch, M. G. K., ... Brindley, D. N. (2016). Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: Implications for tamoxifen therapy and resistance. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–17. doi:10.1038/srep21164
- Belachew, E. B., & Sewasew, D. T. (2021). Molecular Mechanisms of Endocrine Resistance in Estrogen-Positive Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 12(March), 1–11. doi:10.3389/fendo.2021.599586
- Bouris, P., Skandalis, S. S., Piperigkou, Z., Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A. J., ... Karamanos, N. K. (2015). Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biology*, 43, 42–60. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.008
- Bovilla, V. R., Kuruburu, M. G., Bettada, V. G., Krishnamurthy, J., Sukocheva, O. A., Thimmulappa, R. K., ... Madhunapantula, S. V. (2021). Targeted Inhibition of Anti-Inflammatory Regulator Nrf2 Results in Breast Cancer Retardation In Vitro and In Vivo.

- Biomedicines*, 9(9), 1119. doi:10.3390/biomedicines9091119
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2007). Goodman y Gilman Las Bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill.
- Cai, S. J., Liu, Y., Han, S., & Yang, C. (2019). Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. *Cell and Bioscience*, 9(1), 9–11. doi:10.1186/s13578-019-0309-8
- CDC. (2018). Cáncer de mama.
- Cheung, Y. M., Ramchand, S. K., Yeo, B., & Grossmann, M. (2019). Cardiometabolic effects of endocrine treatment of estrogen receptor-positive early breast cancer. *Journal of the Endocrine Society*, 3(7), 1283–1301. doi:10.1210/js.2019-00096
- Chirasani, V. R., & Senapati, S. (2017). How cholesteryl ester transfer protein can also be a potential triglyceride transporter. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. doi:10.1038/s41598-017-05449-z
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.
- de la Cruz-López, K. G., Castro-Muñoz, L. J., Reyes-Hernández, D. O., García-Carrancá, A., & Manzo-Merino, J. (2019, November 1). Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fonc.2019.01143
- Ekholm, M., Bendahl, P. O., Fernö, M., Nordenskjöld, B., Stål, O., & Rydén, L. (2019). Effects of adjuvant tamoxifen over three decades on breast cancer-free and distant recurrence-free interval among premenopausal women with oestrogen receptor-positive breast cancer randomised in the Swedish SBII:2pre trial. *European Journal of Cancer*, 110, 53–61. doi:10.1016/j.ejca.2018.12.034
- Falany, J. L., Macrina, N., & Falany, C. N. (2002). Regulation of MCF-7 breast cancer cell growth by β -estradiol sulfation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 74(2), 167–176. doi:10.1023/A:1016147004188
- Fernández-Suárez, M. E., Daimiel, L., Villa-Turégano, G., Pavón, M. V., Busto, R., Escolà-Gil, J. C., ... Gómez-Coronado, D. (2021). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) affect cholesterol homeostasis through the master regulators SREBP and LXR. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 141(March). doi:10.1016/j.biopha.2021.111871

- 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. doi:10.1016/j.soc.2017.08.005
- Galindo-Hernandez, O., Gonzales-Vazquez, C., & Cortes-Reynosa, P. (2015). Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. doi:10.1007/s13277-015-3711-9
- Gallagher, E. J., Zelenko, Z., Neel, B. M., Antoniou, I. M., Rajan, L., Kase, N., & LeRoith, D. (2018). Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. *Oncogene*, 36(46), 6462–6471. doi:10.1038/onc.2017.247.Elevated
- Gao, L., Morine, Y., Yamada, S., Saito, Y., & Ikemoto, T. (2021). Nrf2 signaling promotes cancer stemness, migration , and expression of ABC transporter genes in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells. *PLoS ONE*, 16(9), 1–14. doi:|
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256755>
- Gjerde, J., Hauglid, M., Breilid, H., Lundgren, S., Varhaug, J. E., Kisanga, E. R., ... Lien, E. A. (2008). Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism. *Annals of Oncology*, 19(1), 56–61. doi:10.1093/annonc/mdm434
- Global Cancer Observatory. (2018). World Health Organization. Obtenido de Cancer today: <https://gco.iarc.fr/>
- Goldstein, L. D., Lee, J., Gnad, F., Klijn, C., Schaub, A., Reeder, J., ... Stokoe, D. (2016). Recurrent Loss of NFE2L2 Exon 2 Is a Mechanism for Nrf2 Pathway Activation in Human Cancers. *Cell Reports*, 16(10), 2605–2617. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.010
- Gomaraschi, M. (2020). Role of Lipoproteins in the Microenvironment of Hormone-Dependent Cancers. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(3), 256–268. doi:10.1016/j.tem.2019.11.005
- Gómez-Coronado, D., Lasunción, M. A., Martínez-Botas, J., & Fernandez-Suárez, M. (2021). Role of cholesterol metabolism in the anticancer pharmacology of selective estrogen receptor modulators. *Seminars in Cancer Biology*, 73, 101–115. doi:10.1016/j.semcancer.2020.08.015.

- Gong, I. Y., Teft, W. A., Ly, J., Chen, Y. H., Alicke, B., Kim, R. B., & Choo, E. F. (2013). Determination of clinically therapeutic endoxifen concentrations based on efficacy from human MCF7 breast cancer xenografts. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(1), 61–69. doi:10.1007/s10549-013-2530-1
- Gonzalez-Ortiz, A., Galindo-Hernandez, O., Hernandez-Acevedo, G. N., Hurtado-Ureta, G., & Garcia-Gonzalez, V. (2021). Impact of cholesterol-pathways on breast cancer development, a metabolic landscape. *Journal of Cancer*, 12(14), 4307–4321. doi:10.7150/jca.54637
- Gruber, Christian J.; Tschugguel, Walter; Schneeberger, Christian; Huber, J. C. (2002). Production and Actions of Estrogens.pdf. *The New England Journal of Medicine*, 346(5), 340–352.
- Guney Eskiler, G., Cecener, G., Tunca, B., & Egeli, U. (2016). An in vitro model for the development of acquired tamoxifen resistance. *Cell Biology and Toxicology*, 32(6), 563–581. doi:10.1007/s10565-016-9355-8
- 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. doi:10.1016/j.stem.2018.11.011
- Helland, T., Alsomairy, S., Lin, C., S iland, H., Mellgren, G., & Hertz, D. L. (2021). Generating a precision endoxifen prediction algorithm to advance personalized tamoxifen treatment in patients with breast cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 11(3), 1–23. doi:10.3390/jpm11030201
- Hevener, A. L., Ribas, V., Moore, T. M., & Zhou, Z. (2020). The Impact of Skeletal Muscle ER  on Mitochondrial Function and Metabolic Health. *Endocrinology (United States)*, 161(2), 1–16. doi:10.1210/endocr/bqz017
- Hewitt, S. C., & Korach, K. S. (2018). Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocrine Reviews*, 39(5), 664–675. doi:10.1210/er.2018-00087
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 2(5–6), 231–237. doi:10.1242/dmm.001180
- Hultsch, S., Kankainen, M., Paavolainen, L., Kovanen, R. M., Ikonen, E., Kangaspeska, S., ... Kallioniemi, O. (2018). Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in

- breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 1–14. doi:10.1186/s12885-018-4757-z
- INEGI. (15 de Octubre de 2020). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de Octubre). Obtenido de Comunicado de prensa no. 462/20.
- Irarrázaval, M. (2011). Tamoxifeno y antidepresivos: ¿Antagonistas en la prevención del cáncer de mama? *Revista médica de Chile*, 89-99.
- Isobe, H., Shimoda, M., Kan, Y., Tatsumi, F., Katakura, Y., Kimura, T., ... Kaneto, H. (2021). A case of tamoxifen-induced hypertriglyceridemia monitoring the changes in lipoprotein fractions over time. *BMC Endocrine Disorders*, 21(1), 1–8. doi:10.1186/s12902-021-00780-z
- Iusuf, D., Teunissen, S. F., Wagenaar, E., Rosing, H., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2011). P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(3), 710–717. doi:10.1124/jpet.110.178301
- Ji, X., Lu, Y., Tian, H., Meng, X., Wei, M., & Cho, W. C. (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 114(March), 108800. doi:10.1016/j.biopha.2019.108800
- Jiang, W., Dai, Z., & Chen, G. (2019). Estrogen Sulfotransferase Induction Inhibits Breast Cancer Cell Line MCF-7 Proliferation. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 22(5). doi:10.26717/bjstr.2019.22.003812
- Jin, Y., Desta, Z., Stearns, V., Ward, B., Ho, H., Lee, K. H., ... Flockhart, D. A. (2005). CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(1), 30–39. doi:10.1093/jnci/dji005
- Johnson, M. D., Zuo, H., Lee, K. H., Trebley, J. P., Rae, J. M., Weatherman, R. V., ... Skaar, T. C. (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*, 85(2), 151–159. doi:10.1023/B:BREA.0000025406.31193.e8
- Jones, C. J., Subramaniam, M., Emch, M. J., Bruinsma, E. S., Ingle, J. N., Goetz, M. P., & Hawse, J. R. (2021). Development and characterization of novel endoxifen-resistant breast cancer cell lines highlight numerous differences from tamoxifen-resistant models. *Molecular Cancer Research*, 19(6), 1026–1039. doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0872

- Jordan, V. C. (2014). Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), 1–20. doi:10.1530/ERC-14-0092
- Jung, S. M., Kang, D., Guallar, E., Yu, J., Lee, J. E., Kim, S. W., ... Lee, S. K. (2020). Impact of Serum Lipid on Breast Cancer Recurrence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2846), 1–14. doi:10.3390/jcm9092846
- Kim, S. J., Kang, H. S., Jung, S. Y., Min, S. Y., Lee, S., Kim, S. W., ... Ro, J. (2010). Methylation patterns of genes coding for drug-metabolizing enzymes in tamoxifen-resistant breast cancer tissues. *Journal of Molecular Medicine*, 88(11), 1123–1131. doi:10.1007/s00109-010-0652-z
- Lee, H.-R., Kim, T.-H., & Choi, K.-C. (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Laboratory Animal Research*, 28(2), 71. doi:10.5625/lar.2012.28.2.71
- León-Pedroza, J. I., González-Tapia, L. A., Del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., & González-Chávez, A. (2015). Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos*, 83(6), 543–551. doi:10.1016/j.circir.2015.05.041
- 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. doi:10.1007/s00280-004-0926-7
- Lin, T.-Y., Cantley, L. C., & DeNicola, G. M. (2016). NRF2 Rewires Cellular Metabolism to Support the Antioxidant Response. In *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2* (pp. 21–48). InTech. doi:10.5772/65141
- Lipovka, Y., & Konhilas, J. P. (2016). The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: Enemy or ally? *Bioscience Reports*, 36(3), 1–10. doi:10.1042/BSR20160017
- Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C., & Curigliano, G. (2021). Breast cancer. *Lancet (London, England)*, 6736(20), 1–20. doi:10.1016/S0140-6736(20)32381-3
- Lu, C. W., Lo, Y. H., Chen, C. H., Lin, C. Y., Tsai, C. H., Chen, P. J., ... Yuan, S. S. F. (2017). VLDL and LDL, but not HDL, promote breast cancer cell proliferation, metastasis and angiogenesis. *Cancer Letters*, 388(December), 130–138. doi:10.1016/j.canlet.2016.11.033

- Lu, J., Steeg, P. S., Price, J. E., Krishnamurthy, S., Mani, S. A., Reuben, J., ... Yu, D. (2009). Breast Cancer Metastasis : Challenges and Opportunities. *Cancer Research*, 69(12), 4951–4953. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0099
- Lu, Y., Tong, Y., Chen, X., & Shen, K. (2021). Association of Biomarker Discrepancy and Treatment Decision , Disease Outcome in Recurrent / Metastatic Breast Cancer Patients. *Frontiers in Oncology*, 11(July), 1–10. doi:10.3389/fonc.2021.638619
- Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., & Weisgraber, K. H. (1984). Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research*, 25(12), 1277–1294. doi:10.1016/s0022-2275(20)34443-6
- Mcanena, P. F., Mcguire, A., Ramli, A., Curran, C., Malone, C., Mclaughlin, R., ... Kerin, M. J. (2018). Breast cancer subtype discordance : impact on post-recurrence survival and potential treatment options. *BMC Cancer*, 18(203), 1–8.
- Meisner, A. L. W., Houman Fekrazad, M., & Royce, M. E. (2008). Breast Disease: Benign and Malignant. *Medical Clinics of North America*, 92(5), 1115–1141. doi:10.1016/j.mcna.2008.04.003
- Melvin, J. C., Seth, D., Holmberg, L., Garmo, H., Hammar, N., Jungner, I., ... Van Hemelrijck, M. (2012). Lipid profiles and risk of breast and ovarian cancer in the swedish AMORIS study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 21(8), 1381–1384. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0188
- Mikac, S., Rychłowski, M., Dziadosz, A., Szabelska-beresewicz, A., Fahraeus, R., Hupp, T., & Sznarkowska, A. (2021). Identification of a Stable, Non-Canonically Regulated Nrf2 Form in Lung Cancer Cells. *Antioxidants*, 10(786). doi:https://doi.org/10.3390/antiox10050786
- Mills, J., Rutkovsky, A., & Giordano, A. (2018). Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 63(8), 59–65. doi:10.1016/j.coph.2018.04.009
- Nguyen, T. H., Nguyen, V. H., Nguyen, T. L., Qiuyin, C., & Phung, T. (2019). Evaluations of Biomarker Status Changes between Primary and Recurrent Tumor Tissue Samples in Breast Cancer Patients. *BioMed Research International*, 2019. doi:https://doi.org/10.1155/2019/7391237
- Onodera, Y., Motohashi, H., Takagi, K., & Miki, Y. (2014). NRF2 immunolocalization in human

- breast cancer patients as a prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, 21(2), 241–252. doi:10.1530/ERC-13-0234
- Organization, W. H. (2007). *Prevention of Cardiovascular Disease Pocket Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk*. World Health Organization. doi:10.1016/j.pop.2017.11.003
- Palliyage, G. H., Ghosh, R., & Rojanasakul, Y. (2020). Cancer chemoresistance and therapeutic strategies targeting tumor microenvironment. *ScienceAsia*, 46(6), 639–649. doi:10.2306/SCIENCEASIA1513-1874.2020.092
- Poirot, M., Silvente-Poirot, S., & Weichselbaum, R. R. (2012). Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(6), 683–689. doi:10.1016/j.coph.2012.09.007
- Raza, U., Asif, M. R., Rehman, A. Bin, & Sheikh, A. (2018). Hyperlipidemia and hyper glycaemia in Breast Cancer Patients is related to disease stage. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 34(1), 209–214.
- Robertson, H., Dinkova-Kostova, A. T., & Hayes, J. D. (2020). Nrf2 and the ambiguous consequences of its activation during initiation and the subsequent stages of tumourigenesis. *Cancers*, 12(12), 1–48. doi:10.3390/cancers12123609
- Rodrigues dos Santos, C., Fonseca, I., Dias, S., & de Almeida, J. C. M. (2014). Plasma level of LDL-cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor progression. *BMC Cancer*, 14(1), 1–10. doi:10.1186/1471-2407-14-132
- Sahoo, S., Mishra, A., Kaur, H., Hari, K., Muralidharan, S., Mandal, S., & Jolly, M. K. (2021). A mechanistic model captures the emergence and implications of non-genetic heterogeneity and reversible drug resistance in ER+ breast cancer cells. *NAR Cancer*, 3(3), 1–19. doi:10.1093/narcan/zcab027
- Samadi, S., Ghayour-Mobarhan, M., Mohammadpour, A., Farjami, Z., Tabadkani, M., Hosseinnia, M., ... Avan, A. (2019). High-density lipoprotein functionality and breast cancer: A potential therapeutic target. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4), 5756–5765. doi:10.1002/jcb.27862
- Sánchez-Ortega, M., Carrera, A. C., & Garrido, A. (2021). Role of NRF2 in Lung Cancer. *Cells*, 10(8), 1879. doi:10.3390/cells10081879

- Singh, H. K., Prasad, M. S., Kandasamy, A. K., & Dharanipragada, K. (2016). Tamoxifen-induced hypertriglyceridemia causing acute pancreatitis. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 7(1), 38–40. doi:10.4103/0976-500X.179365
- Teft, W. A., Mansell, S. E., & Kim, R. B. (2011). Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metabolism and Disposition*, 39(3), 558–562. doi:10.1124/dmd.110.036160
- Wolfe, A. R., Atkinson, R. L., Reddy, J. P., Debeb, B. G., Larson, R., BS, L. L., ... Woodward, W. A. (2015). High-Density and Very-Low-Density Lipoprotein Have Opposing Roles in Regulating Tumor-Initiating Cells and Sensitivity to Radiation in Inflammatory Breast Cancer. *Physiology & Behavior*, 91(3), 1072–1080. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.12.039.High-Density
- Wolowczyk, C., Neckmann, U., Aure, M., Hall, M., Johannessen, B., Zhao, S., ... Bjorkoy, G. (2022). Free Radical Biology and Medicine NRF2 drives an oxidative stress response predictive of breast cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 184, 170–184. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.029
- Wong, E. (2018). Breast Cancer-Breast Anatomy and Histology. Obtenido de McMaster Pathophysiology Review: <http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastnormal-copy/>
- World Health Organization. (s.f.). Cáncer de mama: prevención y control. Obtenido de <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index4.html>
- Wu, X., Hawse, J. R., Subramaniam, M., Goetz, M. P., Ingle, J. N., & Spelsberg, T. C. (2009). The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor α for degradation in breast cancer cells. *Cancer Research*, 69(5), 1722–1727. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3933
- Xu, C. Y., Jiang, Z. N., Zhou, Y., Li, J. J., & Huang, L. M. (2013). Estrogen receptor α roles in breast cancer chemoresistance. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(7), 4049–4052. doi:10.7314/APJCP.2013.14.7.4049
- Xue, L., Qi, H., Zhang, H., Ding, L., Huang, Q., Zhao, D., ... Li, X. (2020). Targeting SREBP-2-Regulated Mevalonate Metabolism for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. doi:10.3389/fonc.2020.01510
- Yamagishi, K., & Iso, H. (2017). The criteria for metabolic syndrome and the national health

- screening and education system in Japan. *Epidemiology and Health*, 39, 1–4. doi:10.4178/epih.e2017003
- Yang, G., Nowsheen, S., Aziz, K., & Georgakilas, A. G. (2013). Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, 139(3), 392–404. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.05.005
- Yao-Borengasser, A., Rogers, L. J., Edavana, V. K., Penney, R. B., Yu, X., Dhakal, I. B., ... Kadlubar, S. A. (2014). Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) gene expression is regulated by members of the NFI transcription factors in human breast cancer cells. *BMC Clinical Pathology*, 14(1), 1–7. doi:10.1186/1472-6890-14-1
- Yuan, J., Liu, M., Yang, L., Tu, G., Zhu, Q., Chen, M., ... Yang, G. (2015). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype in the tamoxifen-resistant breast cancer cell: A new role for G protein-coupled estrogen receptor in mediating tamoxifen resistance through cancer-associated fibroblast-derived fibronectin and β 1-. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1–18. doi:10.1186/s13058-015-0579-y
- Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4 MAR(March), 1–8. doi:10.3389/fphar.2013.00028
- Zhu, Y., Liu, Y., Zhang, C., Chu, J., Wu, Y., Li, Y., ... Liu, Q. (2018). Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. doi:10.1038/s41467-018-03951-0

10. Anexos

10.1 Capítulo de libro

Disorders of Protein Synthesis de la editorial Elsevier con un factor de impacto de 3.014 (JCR), titulado “Initiation of protein translation, metabolic mechanisms for cancer development, progression and chemoresistance”.

Translation initiation and its relationship with metabolic mechanisms in cancer development, progression and chemoresistance

Andrea Muñoz-Ayala^{a,b}, Brenda Chimal-Vega^{a,b},
and Victor García-González^{a,b,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México

^bLaboratorio Multidisciplinario de Estudios Metabólicos y Cáncer, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México

*Corresponding author: e-mail address: vgarcia62@uabc.edu.mx

Contents

1. Introduction	2
2. Translation initiation and its regulation	3
2.1 The formation of the preinitiation complex (PIC)	3
2.2 mRNA activation by assembly with eIF4F complex and binding to the 43S PIC	4
2.3 Scanning of the mRNA-bound ribosomal complex along with the 5'UTR mRNA	6
2.4 Formation of the 80S ribosome	6
3. The impact of translation initiation in cancer	6
3.1 eIF4E structure and function	7
3.2 eIF4E abundance and regulation by 4E-BP1 and its implications in cancer	8
3.3 eIF4E phosphorylation and its implication in cancer	9
3.4 Impact of eIF4E phosphorylation in tumor microenvironment	13
3.5 Therapeutic strategies on eIF4E	14
3.6 eIF4E and the association with metabolic alterations	15
4. Obesity and cancer	15
4.1 The role of lipid misbalance	16
4.2 Connection with protein translation	18
4.3 eIF4E-lipid overload and their impact on chemoresistance	20
5. Final considerations	22
Acknowledgments	23
References	24

Abstract

Pathways that regulate protein homeostasis (proteostasis) in cells range from mRNA processing to protein degradation; perturbations in regulatory mechanisms of these pathways can lead to oncogenic cellular processes. Protein synthesis modulation failures are common phenomena in cancer cells, wherein specific conditions that promote the translation of protein factors promoting carcinogenesis are present. These specific conditions may be favored by metabolic lipid alterations like those found in metabolic syndrome and obesity. Protein translation modifications have been described in obesity, favoring the translation of protein targets that benefit lipid accumulation; a determining factor is the activity of the cap-binding eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), a crosstalk in protein translation and lipogenesis. Besides, alterations of protein translation initiation steps are critical participants for the development of both pathogenic conditions, cancer, and obesity. This chapter is focused on the regulation of recognition and processing of carcinogenic-mRNA and the connections among lipid metabolism and cell signaling pathways that promote oncogenesis, tumoral microenvironment generation and potentially the development of chemoresistance. We performed an in-depth analysis of events, such as those occurring in obesity and dyslipidemias, that may influence protein translation, driving the recognition of certain mRNAs and favoring cancer development and chemoresistance.



1. Introduction

Several diseases have been described as having a molecular etiology alterations of protein synthesis mechanisms, folding, and shielding of the native structure, phenomena that could lead to an accumulation of misfolded proteins (Díaz-Villanueva, Díaz-Molina, & García-González, 2015).

Therefore, mechanisms that regulate critical steps in the protein lifecycle such as transcription, translation, folding, and degradation are susceptible targets for pharmacologic interventions. Moreover, the human proteome contains approximately 20,000 proteins, and estimations indicate that more than 600 of them could be functionally important for several types of cancers (Dale et al., 2021).

Global translational rates in cancer cells are generally enhanced, but aren't necessarily associated with augmented transcription, suggesting that alterations occur in protein-translation steps. Regulation at the protein translational level allows a rapid response to internal and external signals in the life cycle of cells (Somers, Pöyry, & Willis, 2013). mRNA translation is performed in three steps: initiation, elongation, and termination (Siddiqui & Sonenberg, 2015). In this chapter, we will focus on the initiation step. Evidence suggests that metabolic overload and mainly the lipids-effect

could be a critical factor in deregulation of protein translation; for instance, the modulation on mTOR/pS6K signaling is broadly documented and could regulate lipid metabolism (Rui, 2007), however, other mechanisms are also important. Therefore, the connection between protein initiation and the influence of lipid overload could allow the elucidation of critical mechanisms in cancer development and progression, tumoral microenvironment generation and chemoresistance.



2. Translation initiation and its regulation

The initiation of translation is described as the limiting step in protein synthesis (Jackson, Hellen, & Pestova, 2010; Silvera, Formenti, & Schneider, 2010; Truitt & Ruggero, 2016; Yang, Zhong, & Cao, 2020). This process needs the assembly of the 80S ribosome from the 40S and 60S subunits, an mRNA, and a transfer RNA (Met-tRNA_i). In this initiation step, the Met-tRNA_i and the start codon in the mRNA are positioned in the ribosomal P site (Passmore et al., 2007). Almost every eukaryotic mRNA possesses a 5' methylguanosine cap at the seventh position of the first Guanosine (m7G) and a poly adenine (poly(A)) tail at the 3' end (Bentley, 2014). These modifications allow mRNA interaction with some of the eukaryotic initiation factors (eIFs). There are around 12 known eIFs proteins (Merrick & Pavitt, 2018; Pestova et al., 2001) whose function favors a subtle regulation of protein synthesis, representing a high energy cost for cells. However, their deregulation can lead to the development of different pathological conditions, such as cancer (Biffo, Manfrini, & Ricciardi, 2018; Merrick & Pavitt, 2018; Silvera et al., 2010; Truitt & Ruggero, 2016). The translation initiation process can be described in four major steps (Pestova et al., 2001).

2.1 The formation of the preinitiation complex (PIC)

Initially, the ternary complex (TC) is formed by the eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) bound to GTP and the Met-tRNA_i. Later, TC binds to the 40S subunit of the ribosome along with other eIFs; eIF5, eIF3, eIF1, and eIF1A giving place to 43S PIC (Pestova et al., 2001), whose main function is to allow or prevent mRNA entry and scanning in the latter steps changing into an open or close conformation. Specifically, eIF1 and eIF1A stabilize the 43S complex in an open conformation (Passmore et al., 2007).

Regulation at this stage by several kinases is focused on the phosphorylation of serine 51 of the eIF2 (p-eIF2 α) α subunit, in response to cellular stress conditions (Wek, 2018). Critically, stress conditions can be generated by oncogenic pathways. eIF2 is a GDP/GTP binding protein that has a high affinity to Met-tRNA_i only when bound to GTP. eIF2B is a nucleotide exchange factor (GEF) that switches eIF2 to its active form bound to GTP (Merrick & Pavitt, 2018). Phosphorylation of eIF2 α induces a high affinity to GDP preventing activation by eIF2B, therefore lowering TC concentrations and PIC formation (Weiss, Allen, Kloehn, Abid, & Curran, 2021; Wek, 2018).

2.2 mRNA activation by assembly with eIF4F complex and binding to the 43S PIC

The heterotrimeric complex eIF4F is formed by eIF4A (with helicase activity), eIF4E (which binds to the mRNA 5' 7-methylguanosine cap) (m⁷G cap), and eIF4G (a scaffold protein) (Gross et al., 2003; Hinnebusch, 2014). eIF4F is required to directly recruit the 40S ribosomal subunit in the PIC to mRNAs through a set of protein-protein interactions and to unfold RNA secondary structures located at the 5' untranslated region (5'UTR) of mRNAs, which is the non-coding segment upstream of the main protein coding sequence (Malka-Mahieu, Newman, Désaubry, Robert, & Vagner, 2017). mRNA binds to eIF4E, present in eIF4F complex, and poly (A) binding protein (PABP), thus, forming a circular mRNA. eIF4A, whose activity is enhanced by eIF4B, is responsible to unfold mRNAs secondary structures. eIF4G also activates eIF4A by an allosteric mechanism (Hinnebusch, 2014). eIF3 is crucial for the interaction among eIF4F, containing the activated mRNA and the PIC complex (Jackson et al., 2010; Merrick & Pavitt, 2018).

Regulation in this step primarily depends on eIF4E, which is the limiting factor on the formation of the eIF4F complex. Considered as a proto-oncogene, eIF4E can be overexpressed in around 30% of all human tumors (Weiss et al., 2021). eIF4E is susceptible to regulation through the interaction with eIF4E binding proteins (4E-BPs). When 4E-BPs bind to eIF4E, the interaction with eIF4G to form the eIF4F complex is prevented. In turn, 4E-BPs are regulated by a mechanism of phosphorylation. Interaction with eIF4E is diminished in hyperphosphorylated 4E-BPs. 4E-BPs are mTOR complex 1 (mTORc1) substrates (Richter & Sonenberg, 2005), and mTORc1 is downstream of the PI3K/AKT signaling pathway.

In non-tumoral cells, nutrient-rich conditions generate mTORc1 activation and phosphorylation of 4E-BPs, leading to a protein translation increase. Moreover, PI3K/AKT signaling is commonly overactivated in cancer cells (Biffo et al., 2018). In addition, eIF4E can be phosphorylated at Ser-209 by the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-interacting kinases (MNKs), which first bind eIF4G (Pyronnet et al., 1999; Yang et al., 2020). eIF4G phosphorylation by PKC α at Ser 1186 has been described to modulate its interaction with MNKs (Dobrikov, Dobrikova, Shveygert, & Gromeier, 2011). eIF4G can also be phosphorylated in multiple serine residues by several serine/threonine kinases (Martínez-Alonso et al., 2022).

eIF4A is also susceptible to regulation by programmed cell death 4 (Pdc4) protein, which regulates its activity in a concentration-dependent manner. It has recently been found that in diverse types of tumors Pdc4 is downregulated (Gonzalez-Ortiz, Galindo-Hernandez, Hernandez-Acevedo, Hurtado-Ureta, & Garcia-Gonzalez, 2021; Lankat-Buttgereit & Göke, 2009), a condition that could potentiate a high eIF4A activity, and ultimately, translation initiation.

2.2.1 Formation of mRNA structures in 5' untranslated region (5'UTR)

mRNAs compete for the association to the eIF4F complex (Piserà, Campo, & Campo, 2018). mRNAs have varied 5' and 3'-UTR that directly affect their interaction with translational machinery. Emphasizing on 5'UTR, the human median length is about 218 nucleotides but varies hugely among individual genes (Leppek, Das, & Barna, 2018). Depending on 5'UTR length and composition, it can adopt different secondary structures that can influence translation efficiency (Korneeva, Song, Gram, Edens, & Rhoads, 2016; Pelletier & Sonenberg, 1987). mRNAs with high GC content in 5'UTRs and high negative folding free energy have a lower rate of initiation (Leppek et al., 2018). These mRNAs require high levels of eIF4F complex and therefore of the limiting factor eIF4E to unfold their secondary structure to be effectively translated (Piserà et al., 2018).

Considering their dependence on eIF4E mRNAs can be classified as strong or weak mRNAs. Strong mRNAs have short and unstructured 5'-UTRs, which are typically transcripts of housekeeping genes, and are barely affected by eIF4E levels. In comparison, weak mRNAs have long 5'UTR with high content of GC capable to form stable secondary structures such as RNA-G quadruplex involved in cell cycle progression and cancer (Piserà et al., 2018; Silvera et al., 2010).

2.3 Scanning of the mRNA-bound ribosomal complex along with the 5'UTR mRNA

For traditional CAP dependent translation, in this step, the 5'UTR of the mRNA is scanned in a 5' → 3' direction base by base until complementarity to the Met-tRNA_i anticodon is found. Commonly, the first AUG codon functions as the start codon. The sequence context is important for its recognition (Hinnebusch, 2014) since the initiation complex makes contact with 17 nucleotides upstream and 11 nucleotides downstream the AUG (Elfakess et al., 2011). AUG codons are more effectible recognized when surrounded by the Kozak consensus sequence (GCCACCAUGG) (Sonneveld, Verhagen, & Tanenbaum, 2020).

The 40S ribosomal subunit occasionally skips the first AUG and initiates translation at a downstream AUG, a phenomenon known as leaky scanning (Elfakess et al., 2011; Sonneveld et al., 2020). The scanning and the unwinding of the secondary structure of the RNAs, primarily by eIF4A, and then the eIF4F, requires the expenditure of energy in form of ATP (Hinnebusch, 2014).

2.4 Formation of the 80S ribosome

The AUG recognition generates a change in PIC from an open to a closed conformation to prevent further scanning (Hinnebusch, 2014; Merrick & Pavitt, 2018; Passmore et al., 2007). This conformational change causes eIF2-GTP hydrolysis and the release of eIFs associated with the 40S subunit eIF1, eIF1A, eIF2-GDP, and eIF5. Those events facilitate the recruitment of the 60S subunit to give place to the functional 80S ribosome (Weiss et al., 2021), at the initiation codon poised to begin the elongation stage of translation (Elfakess et al., 2011; Merrick & Pavitt, 2018).

A regulator mechanism is associated with eIF-6, which has been described as an anti-association factor that binds to the 60S ribosomal subunit and prevents its interaction with the 40S subunit (Russell & Spremulli, 1980). In addition, eIF-6 is involved in control of mRNA specific translation. eIF-6 levels are regulated by conditions of demand of ribosome synthesis and translational rate (Brina, Miluzio, Ricciardi, & Biffo, 2015), such as cancer.



3. The impact of translation initiation in cancer

Cancer is a complex disease; tumorigenesis involves a progressive acquisition of changes in the initially normal cells. The traditional hallmarks

of cancer are evading apoptosis, sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, sustained angiogenesis, limitless replicative potential, and activation of invasion and metastasis (Hanahan & Weinberg, 2000). Although these are critical for cancer development, phenomena such as the misbalance of protein translation and lipid metabolism may be critical triggering factors.

Considering of high rate of proliferation, an elevated rate of protein synthesis is required. Cancerous cells generally have enlarged nucleoli, where it takes place ribosomal RNA synthesis and ribosome assembly (Silvera et al., 2010).

Almost every major oncogenic signaling pathways found to be altered in human cancers (Truitt & Ruggero, 2016).

Oncogenes have effects on the cellular proteome, many of them act in the initiation step of translation (Kuzuoglu-Ozturk et al., 2021). Several exert their effects over eIF4E, which is the limiting factor in the formation of the eIF4F complex. Among them, we can mention phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and Myc which increase transcription, Ras activates phosphorylation by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) which in turn interacts with MNK1, regulating the expression and hyperactivity of eIF4E. eIF4E is also regulated through the mTOR pathway by suppressors of eIF4E-binding protein (4EBPs), which inhibits its activity (Kuzuoglu-Ozturk et al., 2021). Critically, p-eIF4E favors translation and promotes metastasis-associated pathways in cancer cells (Siddiqui & Sonenberg, 2015; Xie, Merrett, Jensen, & Proud, 2019; Yang et al., 2020).

3.1 eIF4E structure and function

eIF4E is a single 25-kDa polypeptide in mammals, its primary structure is highly conserved in all eukaryotes. The three-dimensional structure consists of eight antiparallel β strands and three α -helices on the dorsal surface, which shows an invariant hydrophobic-acid portion responsible for the binding of eIF4E to proteins partners such as eIF4G and 4EBPs (Fig. 1). The cap binding site is determined by the formation of cation- π bond stacking between the 7-methylguanine, and the two conserved tryptophan residues located within the cap-binding pocket Trp-56 and Trp-102 (Fig. 1). Critically, the interaction of eIF4E with eIF4G involves Trp-43 and Trp-73 in human eIF4E-1. The eIF4E dorsal surface is responsible for the binding of eIF4E-associated proteins, including eIF4G and 4E-BPs. Therefore, the interaction of eIF4G and 4E-BPs is mutually exclusive because they bind to the same site of eIF4E (Piserà et al., 2018).

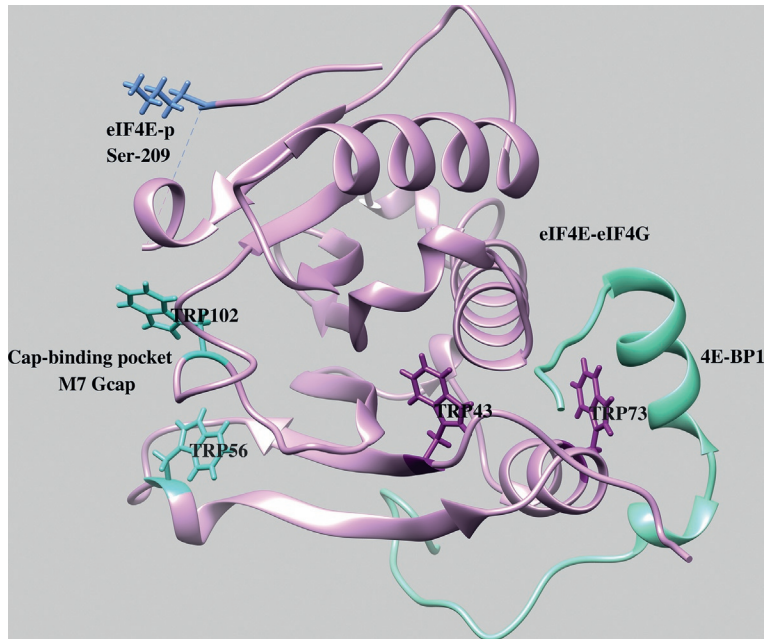


Fig. 1 Human eIF4E/4E-BP1 complex, identifying the critical residues that control the function. The crystallographic structure of eIF4E is characterized by the binding with the protein partners eIF4G and 4E-BPs occurring between the Trp 43 and Trp 73 (green-cyan and purple Trp). Phosphorylation at Ser-209 (blue) and the interaction site in the cap-binding pocket of eIF4E residues located Trp-56 and Trp-102 (Cyan) are identified. Image adapted from [Piserà et al., 2018](#). PDB structure: ID 4UED.

Although eIF4E is mainly localized in the cytoplasm, it has also been found in the nucleus. eIF4E function is involved in the export of specific mRNAs from the nucleus to the cytoplasm ([Culjkovic-Kraljacic & Borden, 2013](#)) On the other hand, it has been shown that it may control translation with the TOP mRNAs (mRNAs with 50 terminal oligopyrimidine tracts), these mRNAs encode elongation factors, ribosomal proteins, and fused proteins. Likewise, eIF4E promotes the translation of histone H4 mRNA without the need for cap structure, which has a paired-stem loop element within its open reading frame similar to the 4E-SE element of several mRNAs ([Piserà et al., 2018](#)).

3.2 eIF4E abundance and regulation by 4E-BP1 and its implications in cancer

Depending on eIF4E abundance, it can favor the translation of proteins related to transformation and tumorigenesis ([Batool, Aashaq, & Andrabi, 2019](#)),

specifically those with long and complex 5'UTR. Decreases in eIF4E expression levels do not affect normal development in eIF4E^{+/-} mice models, whose translational levels remains unchanged. However, normal or increased expression levels of eIF4E are essential for cancer cells to maintain a selective translome that promotes oncogenic transformation (Truitt & Ruggero, 2016).

4E-BP1 hyperphosphorylation by several pathways in cancer cells increases the amount of available eIF4E to form the eIF4F complex and promote translation. Hyper-phosphorylated 4E-BP1 has been associated with metastasis in different types of cancer, such as breast, ovarian, and prostate tumors with poor prognosis and malignant progression independent of other previous oncogenic factors (Castellvi et al., 2006). In breast cancer, it was found that phosphorylated 4E-BP1 was expressed in poorly differentiated tumors showing an increase compared to total 4E-BP1. In addition, tumors express higher levels of eIF4E than 4E-BP1. In ovarian cancer the same effect was observed, a correlation with high levels of p-4E-BP1, regardless of HER2/neu, EGFR, PTEN, or PI3K status, suggesting that it could be a therapeutic target for breast and ovarian cancer screening (Armengol et al., 2007).

Likewise, in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, activation of the Akt/mTOR cascade was detected, wherein the expression of phosphorylated Akt and phosphorylated p70S6K was similar, as well as 4E-BP-p, suggesting that this factor could help identify patients at high risk. On the other hand, in colon carcinoma, high expression of 4EBP-p did not correlate with poorly differentiated tumors, but an association with the presence of lymph node metastases was registered. Although the evidence is not robust, p-4EBP1 is proposed as a biomarker, considering its overexpression is highly related to different types of cancer as it is associated with eIF4E, which plays a key role in the control of protein synthesis, cell survival, and growth (Armengol et al., 2007; Piserà et al., 2018).

3.3 eIF4E phosphorylation and its implication in cancer

It has been demonstrated that inhibition of eIF4E phosphorylation can prevent tumorigenesis in various cancer models (Furic et al., 2010; Wendel et al., 2007; Wheeler, Johnson, & Blaydes, 2010). Determined events upstream ERK/MAPK and p38 cause Thr²⁰⁹ and Thr²¹⁴ phosphorylation in MNK1 and Ser²⁰⁹-eIF4E phosphorylation, under the activation of mitogens, osmotic stress, heat shock, and proinflammatory cytokines

(Wang et al., 2020; Yang et al., 2020). Likewise, certain oncogenes can cause MNK1 phosphorylation, such as in leukemia Friend leukemia integration 1 (FLI1) transcription factor and AML fusion genes (Wang et al., 2020; Yang et al., 2020). It has been proved that substitution of serine 209 residue to alanine in eIF4E (eIF4E^{S209A}), generating a non-phosphorylatable variant, remarkably reduces tumorous processes in multiple cell lines and murine models (Ruan et al., 2020; Xie et al., 2019). p-eIF4E favors the translation of mRNAs involved in tumorigenesis (Yang et al., 2020), mainly those with the characteristic weak mRNAs 5'UTR (Table 1). However, the mechanism in which this phosphorylation promotes specific mRNA translation continues under study (Yang et al., 2020).

p-eIF4E contributes in sustaining proliferative signaling by increasing expression of cyclin D1, c-Myc and β -catenin, key molecules for cell division (Yang et al., 2020). Contributing to the hallmark of cell death resistance, p-eIF4E favors the translation of anti-apoptotic proteins, Mcl-1 (Tailler et al., 2019; Wendel et al., 2007), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and survivin (Wang et al., 2020).

In breast cancer cell line MDA-MB-435 expressing $\alpha_6\beta_4$ integrin, p-eIF4E favored vascular endothelial growth factor (VEGF) translation (Korneeva et al., 2010). VEGF functions as an autocrine signaling molecule, promoting survival and metastasis phenomena (Goel & Mercurio, 2014). Robichaud et al. showed that eIF4E phosphorylation in response to TGF β promotes translation of SNAIL and MMP-3 stimulating epithelial to mesenchymal transitions (EMTs) in normal murine mammary gland cell model (NMuMG). They also proved in a xerograph model, mice with eIF4E^{S209A} mutation displayed a twofold reduction in lung metastases (Robichaud et al., 2014).

Finally, it has been observed that p-eIF4E can favor transcription of molecules involved in chemoresistance in different cancer types (Geter et al., 2017; Khalil & De Benedetti, 2022; Sunavala-Dossabhoy et al., 2005). This point will be addressed later. (Fig. 2).

Inhibition of p-eIF4E for cancer treatment is a strategy that has been proved in several cancer models. For example, Njar workgroup has evaluated in breast and castration resistant prostate cancer (CRPC) cell lines and xerographs compounds called retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) retinamides (RRs), which induce MNKs degradation through the ubiquitin proteasome pathway obtaining promising results (Kwegyir-Affu, Ramalingam, Purushottamachar, Ramamurthy, & Njar, 2015; Ramalingam et al., 2014, 2019; Ramamurthy et al., 2018).

Table 1 Protein targets modulated by eIF4E phosphorylation and/or overexpression.

	Protein	Example of evaluated model	Advantage that confers to tumor cells <i>in vivo</i>	Effects of protein enhanced translation	References
Cell proliferation	Cyclin D1	Castration-resistant prostate cancer cells	Promotes cell division	Allows progression of the cell cycle through the G1 to S phase.	Ramamurthy, Ramalingam, Gediya, & Njar, 2018; Yang et al., 2020
	c-Myc	Colorectal cancer (HCT116, DLD1, RKO, SW480, HT29)	Promotes cell growth, proliferation, and loss of differentiation	Activates transcription of genes involved in those processes by binding to response elements or remodeling chromatin.	van Rikken, Yetil, and Felsher (2010); Ruan et al., 2020; Yang et al., 2020
	β -catenin	Nasopharyngeal Carcinoma (NP69, CNE1, HNE1, HNE2, 5-8F, and 6-10B)	Promotes proliferation and metastasis	Increases nuclear localization and transcriptional upregulation of Ccnd1, c-Myc, MMP-7 and AXIN2 genes as in Wnt pathway	Ruan et al., 2020; Xu et al., 2017)
Apoptosis evasion	MCL1	Leukemia (NALM-6, HL-60, REH, RS4, K562)	Overall resistance to programmed cell death	Prevent activation of BAX and BAK proapoptotic members of the BCL-2 family	Tailler, Lindqvist, Gibson, & Adams, 2019
	B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	Castration-resistant prostate cancer cells	Overall resistance to programmed cell death	Prevent activation of BAX and BAK proapoptotic members of the BCL-2 family	Ramamurthy et al., 2018; Yang et al., 2020
	Survivin	Erythro- leukemia (HEL and K562)	Resistance to programmed cell death	Inhibits caspases	Jaiswal, Goel, and Mittal (2015); Wang et al., 2020

Continued

Table 1 Protein targets modulated by eIF4E phosphorylation and/or overexpression.—cont'd

	Protein	Example of evaluated model	Advantage that confers to tumor cells <i>in vivo</i>	Effects of protein enhanced translation	References
EMT and metastasis	SNAIL	Normal murine mammary gland	Promotes metastasis increasing stem cell like features	Regulates signaling pathways leading to EMT.	Ramamurthy et al., 2018; Robichaud et al., 2014
	MMP-3	Normal murine mammary gland	Promotes tissue invasion and metastasis.	Extracellular matrix remodeling	Ramamurthy et al., 2018; Robichaud et al., 2014; Robichaud et al. (2018)
	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Triple negative breast cancer (MDAMB-435)	Promotes dedifferentiation and an epithelial-mesenchymal transition phenotype	Activates receptor tyrosine kinases (RTKs) and neuropilins in an autocrine way	Goel & Mercurio, 2014; Korneeva et al., 2010
Chemoresistance	Tousled-like kinase 1 isoform B (TLK1B) ^a	Castration-resistant prostate cancer cells	Resistance over DNA damaging chemotherapeutics like anthracyclines (doxorubicin)	Phosphorylates NEK1, activating ATR > Chk1 > DNA damage response	Khalil & De Benedetti, 2022; Sunavala-Dossabhoy, Balakrishnan, Sen, Nuthalapaty, & De Benedetti, 2005
	Runx2	Estrogen receptor positive breast cancer (MCF-7)	Tamoxifen resistance	Functions as a molecular scaffold to recruit chromatin remodeling enzymes and establish a molecular program that opposes Er α signaling.	Geter et al., 2017

^aOverexpression by p-eIF4E is not yet described.

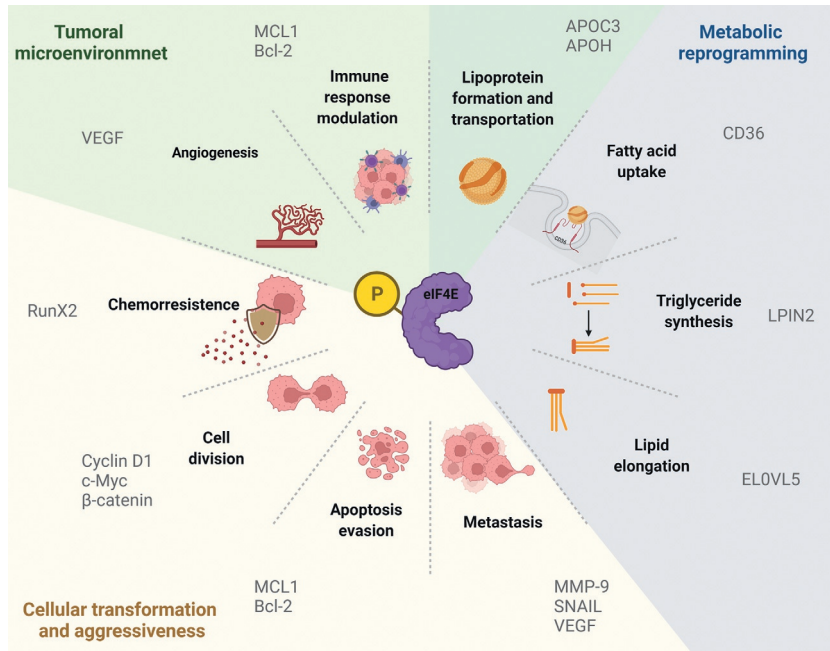


Fig. 2 Relationship between eIF4E phosphorylation cancer development and progression. p-eIF4E favors cellular transformation processes by increasing transcription of proteins involved in metastasis (MMP-9, SNAIL, VEGF, β -catenin), apoptosis evasion (MCL1, Bcl2), cell division (Cyclin D1, c-Myc), and chemoresistance (RunX2). p-eIF4E also can contribute to metabolic reprogramming increasing fatty acid uptake (CD36), triglyceride synthesis (LPIN2), and lipid elongation (ELOVL5) favoring energy accumulation in tumor cells. Moreover, p-eIF4E can increase lipoprotein formation and transportation (APOC3, APOH) by the liver, increasing lipid availability in the tumor microenvironment, in addition, to promote angiogenesis (VEGF) and promoting survival of prometastatic neutrophils (MCL1, Bcl2). Created with BioRender.com

3.4 Impact of eIF4E phosphorylation in tumor microenvironment

Cancer cells are exposed to highly fluctuating metabolic conditions, signaling metabolites, stromal biomolecules, extracellular vesicles and, chemotherapeutic agents, which together generate a microenvironment that contributes to cancer development or changes in phenotype ([Garcia-Gonzalez, Galindo-Hernandez, & Gonzalez-Ortiz, 2020](#)).

In a solid tumor, cancerous cells are surrounded by different resident or recruited non-cancerous cell types that establish collaborative interactions ([Hanahan & Coussens, 2012](#)). Importantly is common to find endothelial cells, fibroblast, and adaptative and innate immune cells that together

contribute to the creation of tumor microenvironment. The impact of translational control in cells in the tumor microenvironment (TME) recently started to be studied (Nathaniel Robichaud et al., 2018).

Robichaud et al. describe that xerograph tumors originated from orthotopic injection with 66cl4 cells (WT eIF4E) in mice eIF4E^{S209A} models almost did not develop lung metastasis in contrast to xerograph tumors in mice eIF4E^{WT} that developed high metastases of up to 50% of the total lung area. These results were attributed to enhanced pro-metastatic neutrophil survival in WT mice. These neutrophils turned out to be apparently more sensitive to levels of BCL2 and MCL1 (Robichaud et al., 2018) whose transcription is enhanced by p-eIF4E.

Potentially eIF4E phosphorylation in endothelial cells can favor VEGF transcription and angiogenesis in consequence. Cercosporamide, a potent MNK inhibitor, impaired hepato-carcinoma endothelial cells angiogenesis compromising capillary network formation, migration proliferation, and survival *in vitro*, and suppressed tumor growth in a xenograft model (Liu, Sun, Su, & Guo, 2016).

3.5 Therapeutic strategies on eIF4E

Therefore, several eIF4E inhibition strategies have been developed (Hsieh & Ruggero, 2010) like the use of antisense oligonucleotide (ASO) therapy. The effect of second-generation ASO against eIF4E was evaluated, in combination with irinotecan in solid tumors and irinotecan-refractory colorectal cancer in phase I/II translational clinical trials (Duffy et al., 2016). On the other hand, evidence suggests that ribavirin, an eIF4E inhibitor, might be successfully used as a cancer treatment. Ribavirin treatment in a phase II clinical trial led to clinical benefit in patients with poor-prognosis of acute myeloid leukemia (Assouline et al., 2009). Critically, a preclinical study reported an effect of ribavirin treatment on breast cancers overexpressing eIF4E (Pettersson et al., 2012).

Evidence of the impact of the mTOR/eIF4E axis is represented by the drug everolimus, an orally administrated inhibitor of mTOR. In a pioneer study, a pharmacodynamic phase I report in patients with advanced solid tumors was performed (Mauthe et al., 2018). A dose- and schedule-dependent inhibition of the mTOR pathway was reported in 55 patients, a correlation was found between everolimus plasma levels and inhibition of p-eIF4G and p4E-BP1 (Tabernero et al., 2008). Moreover, clinical evidence suggests everolimus used in combination with endocrine therapy is

an adequate first-line treatment option for postmenopausal women with ER +, HER2- advanced breast cancer (Royce et al., 2018; Safra et al., 2017).

3.6 eIF4E and the association with metabolic alterations

Metabolic syndrome (MetS) favors the presence of higher levels of lipoproteins, and adipokines in the tumor microenvironment that promote neoplastic progression processes like anchor-independent growth and epithelial-mesenchymal transitions (EMT) (García-Gonzalez et al., 2020). EMT are a determinant hallmark of cellular invasion and metastasis (Fedele, Sgarra, Battista, & Cerchia, 2022). In this sense, metastasis is the process in which cancer cells are dispersed from the site of tumorigenesis and disseminated to specific tissues; metastasis remains the major cause of morbidity and mortality in cancer patients (Chaffer & Weinberg, 2011). During these transitions, metabolic adaptations allow cells to withstand a new tumor microenvironment in the metastatic site.

It is important to denote that eIF4E phosphorylation can favor obesity and hypertriglyceridemia as well metabolic adaptation in cancer cells, promoting cancer development or progression, as will be analyzed later.



4. Obesity and cancer

Obesity is considered a chronic disease that induces functional changes, altering systemic metabolic homeostasis. Specifically, abdominal obesity is associated with insulin resistance and the development of dyslipidemias such as high LDL, low HDL, hypertriglyceridemia, and hyperglycemia (Huang, 2009). Obesity has been related to pathologies such as hypertension, type 2 diabetes, cardiovascular disease, osteoarthritis, kidney failure, liver disease, and the development of different types of cancer including hepatocellular carcinoma, pancreatic cancer, and breast cancer (Chen, Wen, Li, Luo, & Zhang, 2016).

Altered adipokine-concentration, high levels of circulating and local estrogens, disrupted insulin signaling, modifications within the microbiome, and local and systemic effects of inflammation could contribute to the obesity and cancer relationship (Seiler, Chen, Brown, & Fagundes, 2018). Obesity and dyslipidemias have been considered triggering conditions of neoplastic pathology, contributing to the increase of mortality rate. BC has been classified luminal type with estrogen receptor (ER+) expression, HER2-positive, and triple negative (TNBC) (Kolb, Sutterwala, & Zhang, 2016). Diagnosis is performed by immunohistochemical criteria.

It has been shown that postmenopausal obese women have a higher risk of developing ER + luminal BC than women with normal weight (Healy et al., 2010; Kolb et al., 2016). Likewise, reports suggested an increased risk of recurrence in obese *versus* normal weight women with diagnosed BC (Chan et al., 2014). Moreover, several oncogenes drive metabolic and translational changes in cancer cells (Biffo et al., 2018).

In the Apolipoprotein Mortality Risk (AMORIS) study, comprised of 812,073 Swedish individuals, compared lipid profiles from BC patients, measured for 8 years previous to BC diagnosis, results showed weak evidence associated with impaired triglycerides concentrations (Melvin et al., 2012). Likewise, in a report of 208 BC patients *versus* a control group of 176 healthy women, patients with lymph node metastasis showed plasmatic altered metabolites such as glucose, triglycerides, elevated LDL, and low HDL (Raza, Asif, Rehman, & Sheikh, 2018). The presence of obesity before diagnosis, insulin resistance during diagnosis, and hyperinsulinemia after treatment have been associated with an increased risk of mortality and recurrence of BC (Caan et al., 2008; Duggan et al., 2011).

In another report, components of MetS were associated with a modest risk of BC-recurrence and BC-specific mortality (Calip et al., 2014). This study included 4216 women between the period of 1990 and 2008, the presence of ≥ 3 MetS components in 26% of women, was associated with increased risk of a second breast cancer event (SCBE) when compared (Calip et al., 2014). Although, data of the NIH-American Association of Retired Persons Diet and Health Study cohort (NIH-AARP), suggested individual MetS components, such as waist circumference, high cholesterol, and hypertension, were independently associated with an increased risk of BC mortality (Dibaba, Braithwaite, & Akinyemiju, 2018).

In this sense, a role of lipid metabolism alterations as biomarkers of cancer prognosis and survival has been proposed (Garcia-Gonzalez et al., 2018). Changes of expression of lipid-metabolism genes are found in several tumors, considering lipid metabolism modulates cellular processes ranging from plasmatic and organelle membrane organization and plasticity (Zhao et al., 2016), ATP production (Carracedo, Cantley, & Pandolfi, 2013), to intracellular signaling alterations (Röhrig & Schulze, 2016).

4.1 The role of lipid misbalance

In breast cancer malignant transformation lipid metabolism unbalance, especially in fatty acid metabolism represents a key factor (Simeone et al., 2021),

since it is associated with abnormal expression of targets that could dysregulate metabolic pathways. For instance, *de novo* lipogenesis provides the substrates to maintain membrane composition and energetic functions in tumor cells. Critically, genes involved in the metabolism of exogenous-fatty acids, triglyceride, and lipid droplets synthesis, as well as fatty acid oxidation are overexpressed in aggressive basal-like negative receptor subtype (Giudetti et al., 2019; Monaco, 2017).

EMTs could involute rearrangements on lipid metabolism, therefore, lipid profiles could aid distinguishing epithelial cells before and after their transition to mesenchymal cells. Excess fat triggers extensive remodeling of the adipose tissue microenvironment in terms of its size, vascularity, and cellular and matrix composition is accompanied by an exacerbated secretion of adipokines (Ouchi, Parker, Lugus, & Walsh, 2011), which is correlated with a systemic chronic low-grade inflammatory condition and metabolism alterations (Cox, West, & Cripps, 2015). Indeed, inflammation and oxidative stress as central processes of breast cancer development and chemoresistance have been proposed (Pires et al., 2019).

Clinically important apolipoproteins related to lipid metabolism and atherogenesis include apolipoprotein B-100, the major structural component of VLDL, IDL, LDL, and lipoprotein(a) (Mehta et al., 2022). VLDL and LDL modulate intracellular metabolism and have been associated with the development of neoplastic phenomena, such as proliferation, anchorage-independent growth, development of EMTs, angiogenesis, and metastasis in cellular models (Gonzalez-Ortiz et al., 2021; Lu et al., 2017). Specifically, the treatment of L1 and L5 subfractions of LDL and VLDL in BC cells increased the levels of mesenchymal markers Slug, vimentin, and β -catenin, promoting migration and invasion, distinctive events of cells under the EMT process (Lu et al., 2017). Furthermore, secretion of angiogenic factors in BC-cells and formation of new blood vessels were also registered (Lu et al., 2017). Therefore, VLDL and LDL could be critical in several mechanisms of tumor progression.

In addition, a positive correlation of higher VLDL concentrations and lymph node metastasis has been reported in BC patients. It has been proposed that these lipoproteins could transport triglycerides, cholesterol, and metabolites such as oxysterols from the liver to the tumor cells (Flote et al., 2016). Elevated concentrations of VLDL have been associated with enhanced VEGF-signaling, which promotes lymphatic angiogenesis, inflammatory cascades by tumor associated macrophages, are phenomena that contribute to nodal metastasis disease (Flote et al., 2016).

In an analysis of 1054 BC patients compared with 2483 healthy women stratified by age, Li et al. reported that lipid profiles become worsened after chemotherapy, increasing concentrations of total cholesterol, triglycerides, LDL, and apolipoprotein B; while levels of HDL and Apo-A1 decrease compared with pre-chemotherapeutic status (Li et al., 2018). Likewise, in The Malmo Diet and Cancer Study (MDCS), which enrolled 17,035 women (1991–1996), BC risk was inversely associated with Apo-B concentrations (Borgquist et al., 2016), the main protein of VLDL and LDL.

Importantly, in another report, MDCS participants with incident invasive breast cancer diagnosed between 1991 and 2014 were identified, and during the 5 years of follow-up, 90 invasive breast cancer recurrences were diagnosed over 3807 person-years. Harborg et al. reported that high pre-diagnostic levels of Apo-B were associated with an increased risk of recurrence among breast cancer patients (Borgquist et al., 2016; Harborg et al., 2022).

Increased ApoB levels and hypertriglyceridemia reflect a metabolic imbalance originated by obesity, a critical risk factor for cancer. In this sense phosphorylation by mTOR inactivates members of the 4E-BP family, a mechanism of translational repressors of 5' cap-dependent protein synthesis, involving eIF4E and the complex eIF4F. Deletion of 4E-BP1 and 4E-BP2 in mice results in conditions of insulin resistance, energy expenditure decrease, and increased adipogenesis (Bacquer et al., 2007). Therefore, a link between the imbalance of lipid metabolism, the role of cancer progression, and the control of translation initiation could be present. Moreover, in the ob/ob obese mice model, attenuation of obesity induced VLDL hyperlipidemia relates to reduction of tumor volume by 50% (Hussain et al., 2022), this was reached by inhibition of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), key in triglyceride synthesis, then VLDL (Hussain et al., 2022).

4.2 Connection with protein translation

Unexpectedly, protein translation-initiation represents a point of regulation on lipid metabolic targets. For instance, the lipid overload could promote the deregulation of the activity of the eIF4F complex, and specifically, the effect could be on eIF4E-related mechanisms. Anabolic and catabolic hormonal and nutritional signals can control protein synthesis and mRNA translation regulated by mTOR, which plays an important role in body weight regulation through regulation of eIF4-E and S6K-1 (Drake, Alway, Hollander, & Williamson, 2010). Indeed, eIF4E activity

could be a regulatory factor for obesity, since studies in mice with lipid-enriched nutrients induced obesity showed an increase in eIF4E phosphorylation at serine 209. The effect of eIF4E was analyzed in eIF4E^{S209A} mice, where it was observed no lipid-rich diet induced weight gain (Conn et al., 2021). eIF4E phosphorylation causes an increased expression of critical features on lipid metabolism, transport and storage, just like CD36 in fatty acid uptake, Elongation of very long chain fatty acids protein 5 (ELOVL5) in lipid elongation, phosphatidate phosphatase (LPIN2) in triglyceride synthesis, Apolipoprotein C-III (APOC3) in lipoprotein formation, Beta-2-glycoprotein 1 (APOH) in lipoprotein transportation and perilipin 2 (PLIN2) in lipid droplets formation (Conn et al., 2021) (Fig. 2). Potentially, these adaptations could impact liver lipoprotein formation and accumulation of neutral lipids on lipid droplets, contributing to steatosis. On the other hand, they could influence cellular transformation.

Moreover, in specific conditions under protein deprivation in a rat model, a low-protein diet increases the amount of 4E-BP1, leading to triglyceride accumulation in the rat liver. In addition, knockdown of hepatic 4E-BP1 attenuated the TG accumulation concomitantly with an increase of fatty acid oxidation through carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) (Toyoshima et al., 2020).

Other translation factors play a critical role in obesity/metabolic syndrome; for instance, eIF6 is associated with translational control of adipogenic transcription factors such as C/EBP β , C/EBP δ , and ATF4 that have G/C rich regions or uORF sequences in their 5'UTR (Brina et al., 2015; Brina, Miluzio, Ricciardi, & Biffo, 2015). A hub target is the regulation of fatty acid synthase (Fasn) (Brina, Miluzio, Ricciardi, Clarke, et al., 2015). Moreover, through the transcription factor C/EBP β , eIF6 promotes the expression of biomarkers connected with the progression from Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) to hepatocellular carcinoma (Scagliola et al., 2021); specifically, eIF6 depletion is associated with lipid accumulation blunting and fatty acid oxidation stimulation (Scagliola et al., 2021).

This is consistent with hepatocellular carcinoma, which is highly associated with obesity and type II Diabetes (Baidal & Lavine, 2016), due to excess caloric intake promoting the production of triglycerides in the form of lipid droplets, where lipid accumulation leads to increased levels of free fatty acids and other lipid metabolites causing hepatocyte injury, endoplasmic reticulum (ER) stress and inflammation (Kolb et al., 2016).

Therefore, a circuit for homeostatic lipid accumulation mediated by protein translation could be present. Moreover, the discussed evidence has

shown the fundamental role of lipid metabolism in the development of hallmarks of cancer; describing the mechanisms involved will allow the identification of drug-targets and the design of novel therapies in BC patients. However, the lack of sensitivity of cancer cells to therapy is one of the key factors in the failure of chemotherapy during breast cancer treatment. Chemoresistance is also implicated in cancer recurrence and is one of the main causes of death in patients.

4.3 eIF4E-lipid overload and their impact on chemoresistance

Resistance to therapeutic treatments can be intrinsic, with a lack of response from the beginning of treatment, or acquired, due to the loss of therapeutic efficacy after a time of treatment. Emphasizing acquired resistance, the mechanisms include changes in the drug absorption; transport and efflux of drugs on the cell membrane; enzymatic metabolism of drugs leading to their inactivation; alteration in the quantity and affinity of receptors or drug targets; the expression of genes related to cancer and DNA repair (Ji et al., 2019).

eIF4E and the complex eIF4F are critical effectors and rate limiting elements of protein translation and in several cases selective to mRNA targets implicated in cancer development and lipid metabolism misbalances. Moreover, scopes may extend to other cellular phenomena such as chemoresistance. Indeed, chemoresistance development is closely related to the tumor microenvironment, wherein highly fluctuating metabolic conditions are present, including signaling elements, stromal biomolecules, and chemotherapeutic drugs. Together, these conditions are capable of inducing changes in the phenotype of tumor cells (Galindo-Hernandez, Gonzales-Vazquez, & Cortes-Reynosa, 2015) and potentially lead to the development of chemoresistance (Zheng, 2017).

Several reports suggest a connection of overexpression with chemoresistance. For instance, in a prospective study of 103 TNBC patients the eIF4E levels in cancer specimens were quantified as x-fold over benign samples from non-cancer patients. Results suggest that patients with triple-negative neoplasms with a high eIF4E expression (≥ 15 -fold) showed greater rates of cancer recurrence ($P=0.04$) and cancer-related death ($P=0.02$) than the low eIF4E group (Flowers et al., 2009).

For instance, in a metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) model, eIF4E overexpression enhances translation of Tousled-like kinase 1 isoform B (TLK1B), a threonine kinase with a long 5' UTR

mRNA. Increased expression confers cancer cells resistance over DNA damaging chemotherapeutics like anthracyclines (doxorubicin) by activating $NEK1 > ATR > Chk1 > DNA$ damage response (Khalil & De Benedetti, 2022). It was previously known that TLK1 upregulation confers cancer cells resistance to radiotherapy *in vitro* (Sunavala-Dossabhoy et al., 2005) and predicts cancer recurrence in irradiated breast cancer (Wolfort et al., 2006). In a prospective study of 152 stage I to III BC patients treated with a doxorubicin-based chemotherapy adjuvant, tumor expression of eIF4E and TLK1B were characterized. Results indicated TLK1B overexpression was correlated with eIF4E elevation; and high TLK1B was associated with a higher risk for cancer recurrence (Byrnes et al., 2007). In this sense, in a prospective study to detect cancer recurrence in patients who had been treated with adjuvant radiation therapy, 158 patients with stage I to III breast cancer were accrued. Data suggested that patients in the highest TLK1B group had a 3.0-fold increase in relative risk for cancer recurrence after adjuvant radiation therapy ($P=0.036$; 95% CI, 1.0–5.0), compared with the low TLK1B group (Wolfort et al., 2006). Moreover, seventeen locally advanced breast cancer patients were accrued, and tumor specimens were obtained before and after neoadjuvant therapy. Breast cancer patients whose tumors had low eIF4E overexpression after neoadjuvant chemotherapy had lower cancer recurrence compared with those who did not (Hiller et al., 2009).

In stage IV breast cancer patients ($N=200$), eIF4E was highly phosphorylated at serine 209 in response to chemotherapy, which significantly correlated with poorer clinical responses and outcomes (Li et al., 2017). In a complementary way, in breast cancer cells depletion of eIF4E enhanced the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of chemotherapeutic drugs (doxorubicin, cyclophosphamide, and fluorouracil). And the inhibition of events such as eIF4E-p inhibition and β -catenin activation by MNK-inhibitors enhanced the BC cell response to chemotherapy *in vitro* and *in vivo* (Li et al., 2017). Therefore, it is possible that the MNK-eIF4E- β -catenin axis could be involucre in chemoresistance. This proposal has been strengthened by carcinoma squamous cells characterization, wherein the eIF4E/ β -catenin axis plays a positive regulatory role in the resistance of cervical cancer cells to chemotherapy (Xu et al., 2017). Therefore, overexpression of eIF4E and downstream targets could represent biomarkers for breast cancer chemoresistance, however, the cellular biology of tumors is complex, and is necessary more studies to validate this proposal.

The phenomenon of resistance to docetaxel, a chemotherapy drug for BC treatment, could occur in ~50% of patients. In this sense, a cellular chemoresistant BC model, gene regulation through miR-141 has been proposed to play an important role in cancer drug resistance, evidence suggest that downregulation of eIF4E may be a molecular mechanism by which miR-141 exerted its functions of inducer of chemoresistance on human BC cells (Yao et al., 2015). Being more complex the phenomenon and the regulation by the translation initiation complex can be a trigger.

Additionally, eIF4E expression levels and phosphorylation has been implicated in chemoresistance. MCF7 Tamoxifen resistant cells (TamR) appeared to be more sensitive to eIF4E depletion by eIF4E shRNAs, also, silencing eIF4E or inhibiting eIF4E phosphorylation restored tamoxifen sensitivity. p-eIF4E promotes Runx2 transcription which is a transcription factor involved in cell reprogramming known for being an important inhibitor of estrogen signaling, favoring a poorly differentiated state. Association between p-eIF4E and tamoxifen resistance was also evaluated *in vivo*, biopsy specimens from ER+ tamoxifen-resistant tumors showed significantly increased p-eIF4E compared with tamoxifen-sensitive tumors (Geter et al., 2017) (Fig. 2).

Therefore, overcoming intrinsic and acquired drug resistance is a major issue in treating cancer patients considering the effects of chemoresistance. Moreover, the effect of lipid metabolism on chemoresistance phenomena has been little explored; however, considering recent evidence about the impact of eIF4E on control of lipid metabolism, and the broad evidence about dyslipidemias and the risk of breast cancer, it is very possible that dyslipidemias and intracellular metabolism in tumor cells represent a triggering factor in the development of chemoresistance. Even more, the metabolic reprogramming of tumors and the effect in chemoresistance could be controlled by mechanisms such as epigenetic factors that regulate gene expression (Gonzalez-Ortiz et al., 2021), and impact on the oncogenic drivers and potentially in hallmarks of cancers processes.



5. Final considerations

The use of novel strategies for drug development have allow identification of genes whose modulation could inhibit growth of cancer cells, representing suitable therapeutic targets (Tsherniak et al., 2017). Knowing the impact of lipid metabolism on the critical step of translation initiation is required for a better understanding of cancer hallmarks; the

analysis of this interactome with cutting-edge techniques can guide the selection of better therapeutic targets. For instance, since a broad-spectrum perspective, 627 cancer protein targets have been identified, of which 232 are enzymes (37%), being the focus of characterization (Behan et al., 2019). Notwithstanding, 395 non-enzyme targets, including transcription factors and signaling molecules considered oncogenic driver-proteins are described as undruggable targets (Behan et al., 2019), with three-dimensional structures that show restrictions to occupancy-driven small-molecule inhibitors. However, new opportunities could appear; molecular inhibitors on specific translation factors have been on the rise. For instance, inhibitors that block the ability of eIF4E to recruit PIC such as 4E1RCat and 4E2RCat, have shown anti-tumoral effects (L. Chen et al., 2012).

Likewise, several effective treatments are often not durable considering that tumor cells develop chemoresistance (Salami & Crews, 2017). In this sense, the eIF4G- eIF4E interaction represents a major drug target for repressing specific translation. eIF4E is described as an oncogenic driver (Kuzuoglu-Ozturk et al., 2021); and through a genome-wide CRISPRi screen, more than 600 genetic interactions that support eIF4E oncogenic activity has been identified, among these, Bcl-xL and exon-junction complex (EJC) (Kuzuoglu-Ozturk et al., 2021). In addition to the involvement of eIF4E in proteostasis, it plays an important role in the modulation of cellular metabolism by favoring the effective translation of certain lipid metabolic targets, and consequently its deregulation can lead to dyslipidemias. Therefore, a crosstalk mechanism among cancer development and dyslipidemias may be a reality, triggering phenomena such as proliferation, migration, and invasion of cancer cells. Moreover, therapeutic strategies must consider these connecting points to improve their effectiveness.

In conclusion, the regulation of translation initiation, and specifically eIF4F represents a hub that connects specific cellular processes in cancer and obesity which could explain the association between these conditions; moreover, the identification and characterization of new targets with a pharmacological potential are critical.

Acknowledgments

The authors recognize the helpful contribution of Luis Pablo Ávila Barrientos and Roberto León-Gutiérrez, who critically reviewed and edited the manuscript. This study was supported by Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CB 2017-2018 (A1-S-28653/SEP/CONACYT) and Programa Presupuestario F003 (CONACYT) “Programas Nacionales Estratégicos de Ciencia, Tecnología y Vinculación con los Sectores Social, Público y Privado”.

References

- Armengol, G., Rojo, F., Castellví, J., Iglesias, C., Cuatrecasas, M., Pons, B., et al. (2007). 4E-binding protein 1: A key molecular 'funnel factor' in human cancer with clinical implications. *Cancer Research*, 67(16), 7551–7555. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0881>.
- Assouline, S., Culjkovic, B., Cocolakis, E., Rousseau, C., Beslu, N., Amri, A., et al. (2009). Brief report molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): A proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood Advances*, 114(2), 257–260. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205153>.
- Baidal, J. A. W., & Lavine, J. E. (2016). The intersection of nonalcoholic fatty liver disease and obesity. *Science Translational Medicine*, 8(323). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8390>.
- Batool, A., Aashaq, S., & Andrabi, K. I. (2019). Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E): A recap of the cap-binding protein. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 14201–14212. <https://doi.org/10.1002/jcb.28851>.
- Behan, F. M., Iorio, F., Picco, G., Gonçalves, E., Beaver, C. M., Migliardi, G., et al. (2019). Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR – Cas9 screens. *Nature*, 568. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9>.
- Bentley, D. L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics*, 15(3), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nrg3662>.
- Biffo, S., Manfrini, N., & Ricciardi, S. (2018). Crosstalks between translation and metabolism in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 48, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.10.011>.
- Borgquist, S., Butt, T., Almgren, P., Shiffman, D., Stocks, T., Orho-Melander, M., et al. (2016). Apolipoproteins, lipids and risk of cancer. *International Journal of Cancer*, 138(11), 2648–2656. <https://doi.org/10.1002/ijc.30013>.
- Brina, D., Miluzio, A., Ricciardi, S., & Biffo, S. (2015). eIF6 anti-association activity is required for ribosome biogenesis, translational control and tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 830–835. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.09.010>.
- Brina, D., Miluzio, A., Ricciardi, S., Clarke, K., Davidsen, P. K., Viero, G., et al. (2015). eIF6 coordinates insulin sensitivity and lipid metabolism by coupling translation to transcription. *Nature Communications*, 6(8261), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms9261>.
- Byrnes, K. W., DeBenedetti, A., Holm, N. T., Luke, J., Nunez, J., Chu, Q. D., et al. (2007). Correlation of TLK1B in elevation and recurrence in doxorubicin-treated breast Cancer patients with high eIF4E overexpression. *Journal of the American College of Surgeons*, 204(5), 925–933. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.02.027>.
- Caan, B. J., Kwan, M. L., Hartzell, G., Castillo, A., Slattery, M. L., Sternfeld, B., et al. (2008). Pre-diagnosis body mass index, post-diagnosis weight change, and prognosis among women with early stage breast cancer. *Cancer Causes & Control*, 19(10), 1319–1328. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9203-0>.
- Calip, G. S., Malone, K. E., Gralow, J. R., Stergachis, A., Hubbard, R. A., & Boudreau, D. M. (2014). Metabolic syndrome and outcomes following early-stage breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 148(2), 363–377. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3157-6>.
- Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>.
- Castellví, J., Garcia, A., Rojo, F., Ruiz-Marcellan, C., Gil, A., Baselga, J., et al. (2006). Phosphorylated 4E binding protein 1: A hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer*, 107(8), 1801–1811. <https://doi.org/10.1002/cncr.22195>.

- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(2011), 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
- Chan, D. S. M., Vieira, A. R., Aune, D., Bandera, E. V., Greenwood, D. C., McTiernan, A., et al. (2014). Body mass index and survival in women with breast cancer—Systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. *Annals of Oncology*, 25(10), 1901–1914. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl042>.
- Chen, L., Aktas, B. H., Wang, Y., He, X., Sahoo, R., Denoyelle, S., et al. (2012). Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation. *Oncotarget*, 3(8), 869–881.
- Chen, Y., Wen, Y. Y., Li, Z. R., Luo, D. L., & Zhang, X. H. (2016). The molecular mechanisms between metabolic syndrome and breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(4), 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.034>.
- Conn, C. S., Yang, H., Tom, H. J., Ikeda, K., Osés-Prieto, J. A., Vu, H., et al. (2021). The major cap-binding protein eIF4E regulates lipid homeostasis and diet-induced obesity. *Nature Metabolism*, 3(2), 244–257. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00349-z>.
- Cox, A. J., West, N. P., & Cripps, A. W. (2015). Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 3(3), 207–215. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70134-2).
- Culjkovic-Kraljacic, B., & Borden, K. L. B. (2013). Aiding and abetting cancer: MRNA export and the nuclear pore. *Trends in Cell Biology*, 23(7), 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.004>.
- Dale, B., Cheng, M., Park, K. S., Kaniskan, H.Ü., Xiong, Y., & Jin, J. (2021). Advancing targeted protein degradation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(10), 638–654. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00365-x>.
- Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., & García-González, V. (2015). Protein folding and mechanisms of proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 17193–17230. <https://doi.org/10.3390/ijms160817193>.
- Dibaba, D., Braithwaite, D., & Akinyemiju, T. (2018). Metabolic syndrome and the risk of breast Cancer and subtypes by race, Menopause and BMI. *Cancers*, 10(9), 299. <https://doi.org/10.3390/cancers10090299>.
- Dobrikov, M., Dobrikova, E., Shveygert, M., & Gromeier, M. (2011). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C regulates eIF4G1 binding to Mnk1. *Molecular and Cellular Biology*, 31(14), 2947–2959. <https://doi.org/10.1128/mcb.05589-11>.
- Drake, J. C., Alway, S. E., Hollander, J. M., & Williamson, D. L. (2010). AICAR treatment for 14 days normalizes obesity-induced dysregulation of TORC1 signaling and translational capacity in fasted skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 299(6), 1546–1555. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00337.2010>.
- Duffy, A., Makarova-Rusher, O., Ulahannan, V., Rahma, O., Fioravanti, S., Walker, M., et al. (2016). Modulation of tumor eIF4E by antisense inhibition: A phase I/II translational clinical trial of ISIS 183750—An antisense oligonucleotide against eIF4E—In combination with irinotecan in solid tumors and irinotecan-refractory colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 139, 1648–1657. <https://doi.org/10.1002/ijc.30199>.
- Duggan, C., Irwin, M. L., Xiao, L., Henderson, K. D., Smith, A. W., Baumgartner, R. N., et al. (2011). Associations of insulin resistance and adiponectin with mortality in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(1), 32–39. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.4473>.
- Elfakess, R., Sinvani, H., Haimov, O., Svitkin, Y., Sonenberg, N., & Dikstein, R. (2011). Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. *Nucleic Acids Research*, 39(17), 7598–7609. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr484>.

- Fedele, M., Sgarra, R., Battista, S., & Cerchia, L. (2022). The epithelial – Mesenchymal transition at the crossroads between metabolism and tumor progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(800), 2–34. <https://doi.org/10.3390/ijms23020800>.
- Flote, V. G., Vettukattil, R., Bathen, T. F., Egeland, T., McTiernan, A., Frydenberg, H., et al. (2016). Lipoprotein subfractions by nuclear magnetic resonance are associated with tumor characteristics in breast cancer. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0225-4>.
- Flowers, A., Chu, Q. D., Panu, L., Meschonat, C., Caldito, G., Lowery-Nordberg, M., et al. (2009). Eukaryotic initiation factor 4E overexpression in triple-negative breast cancer predicts a worse outcome. *Surgery*, 146(2), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.05.010>.
- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I. H., Yoshida, K., Brueschke, A., et al. (2010). EIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14134–14139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005320107>.
- Galindo-Hernandez, O., Gonzales-Vazquez, C., & Cortes-Reynosa, P. (2015). Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3711-9>.
- Garcia-Gonzalez, V., Diaz-Villanueva, J. F., Galindo-Hernandez, O., Martinez-Navarro, I., Hurtado-Ureta, G., & Perez-Arias, A. A. (2018). Ceramide metabolism balance, a multifaceted factor in critical steps of breast cancer development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092527>.
- Garcia-Gonzalez, V., Galindo-Hernandez, O., & Gonzalez-Ortiz, A. (2020). Impact of cholesterol-pathways on breast cancer development, a metabolic landscape. *J Cancer*, 2, 1–24.
- Geter, P. A., Emlund, A. W., Bakogianni, S., Alard, A., Arju, R., Giashuddin, S., et al. (2017). Hyperactive mTOR and MNK1 phosphorylation of eIF4E confer tamoxifen resistance and estrogen independence through selective mRNA translation reprogramming. *Genes and Development*, 31(22), 2235–2249. <https://doi.org/10.1101/gad.305631.117>.
- Giudetti, A. M., Domenico, S. D., Ragusa, A., Lunetti, P., Gaballo, A., Franck, J., et al. (2019). A specific lipid metabolic profile is associated with the epithelial mesenchymal transition program. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(3), 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.12.011>.
- Goel, H. L., & Mercurio, A. (2014). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>.
- Gonzalez-Ortiz, A., Galindo-Hernandez, O., Hernandez-Acevedo, G. N., Hurtado-Ureta, G., & Garcia-Gonzalez, V. (2021). Impact of cholesterol-pathways on breast cancer development, a metabolic landscape. *Journal of Cancer*, 12(14), 4307–4321. <https://doi.org/10.7150/jca.54637>.
- Gross, J. D., Moerke, N. J., Von Der Haar, T., Lugovskoy, A. A., Sachs, A. B., McCarthy, J. E. G., et al. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell*, 115(6), 739–750. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00975-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00975-9).
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime : Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell Press*, 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Harborg, S., Ahern, T. P., Feldt, M., Rosendahl, A. H., Cronin-Fenton, D., Melander, O., et al. (2022). Circulating lipids and breast cancer prognosis in the Malmö diet and cancer study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 191(3), 611–621. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06462-7>.

- Healy, L. A., Ryan, A. M., Rowley, S., Boyle, T., Connolly, E., Kennedy, M. J., et al. (2010). Obesity increases the risk of postmenopausal breast cancer and is associated with more advanced stage at presentation but no impact on survival. *Breast Journal*, 16(1), 95–97. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2009.00861.x>.
- Hiller, D. J., Chu, Q., Meschonat, C., Panu, L., Burton, G., & Li, B. D. L. (2009). Predictive value of eIF4E reduction after neoadjuvant therapy in breast Cancer. *Journal of Surgical Research*, 156(2), 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.03.060>.
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 779–812. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>.
- Hsieh, A. C., & Ruggero, D. (2010). Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(20), 4914–4920. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0433>.
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 2(5–6), 231–237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>.
- Hussain, A., Lian, J., Watts, R., Gutiérrez, T., Nelson, R., Goping, I. S., et al. (2022). Attenuation of obesity-induced hyperlipidemia reduces tumor growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(4), 159124.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>.
- Jaiswal, P. K., Goel, A., & Mittal, R. D. (2015). Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian Journal of Medical Research*, 141, 389–397.
- Ji, X., Lu, Y., Tian, H., Meng, X., Wei, M., & Cho, W. C. (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 114(March), 108800. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108800>.
- Khalil, M. I., & De Benedetti, A. (2022). Torsion-like kinase 1: A novel factor with multifaceted role in mCRPC progression and development of therapy resistance. *Cancer Drug Resistance*, 93–101. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.109>.
- Kolb, R., Sutterwala, F. S., & Zhang, W. (2016). Obesity and cancer: Inflammation bridges the two. *Current Opinion in Pharmacology*, 29(3), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.005>.
- Korneeva, N. L., Song, A., Gram, H., Edens, M. A., & Rhoads, R. E. (2016). Inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK)-interacting kinase (MNK) preferentially affects translation of mRNAs containing both a 5'-terminal cap and hairpin. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3455–3467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694190>.
- Korneeva, N. L., Soung, Y. H., Kim, H. I., Giordano, A., Rhoads, R. E., Gram, H., et al. (2010). Mnk mediates integrin $\alpha\beta 4$ -dependent eIF4E phosphorylation and translation of VEGF mRNA. *Molecular Cancer Research*, 8(12), 1571–1578. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0091>.
- Kuzuoglu-Ozturk, D., Hu, Z., Rama, M., Devericks, E., Weiss, J., Chiang, G. G., et al. (2021). Revealing molecular pathways for cancer cell fitness through a genetic screen of the cancer transcriptome. *Cell Reports*, 35(13), 109321. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109321>.
- Kwegyir-Affu, A. K., Ramalingam, S., Purushottamachar, P., Ramamurthy, V. P., & Njar, V. C. O. (2015). Galeterone and VNPT55 induce proteasomal degradation of AR/VNPT55, induce significant apoptosis via cytochrome c release and suppress growth of castration resistant prostate cancer xenografts in vivo. *Oncotarget*, 6(29), 27440–27460. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4578>.
- Lankat-Buttgereit, B., & Göke, R. (2009). The tumour suppressor Pdc4: Recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biology of the Cell*, 101(6), 309–317. <https://doi.org/10.1042/bc20080191>.

- Bacquer, O. L., Petroulakis, E., Paglialunga, S., Poulin, F., Richard, D., Cianflone, K., et al. (2007). Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(2). <https://doi.org/10.1172/JCI29528DS1>.
- Leppek, K., Das, R., & Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 158–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>.
- Li, X., Lui, Z.-l., Wu, Y.-T., Wu, H., Dai, W., Arshad, B., et al. (2018). Status of lipid and lipoprotein in female breast cancer patients at initial diagnosis and during chemotherapy. *Lipids in Health and Disease*, 17(91), 1–6.
- Li, Z., Sun, Y., Qu, M., Wan, H., Cai, F., & Zhang, P. (2017). Inhibiting the MNK-eIF4E- β -catenin axis increases the responsiveness of aggressive breast cancer cells to chemotherapy. *Oncotarget*, 8(2), 2906–2915. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13772>.
- Liu, Y., Sun, L., Su, X., & Guo, S. (2016). Inhibition of eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation by cercosporamide selectively suppresses angiogenesis, growth and survival of human hepatocellular carcinoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.038>.
- Lu, C. W., Lo, Y. H., Chen, C. H., Lin, C. Y., Tsai, C. H., Chen, P. J., et al. (2017). VLDL and LDL, but not HDL, promote breast cancer cell proliferation, metastasis and angiogenesis. *Cancer Letters*, 388(December), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.033>.
- Malka-Mahieu, H., Newman, M., Désaubry, L., Robert, C., & Vagner, S. (2017). Molecular pathways: The eIF4F translation initiation complex—new opportunities for cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 23(1), 21–25. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2362>.
- Martínez-Alonso, E., Guerra-Pérez, N., Escobar-Peso, A., Peracho, L., Vera-Lechuga, R., Cruz-Culebras, A., et al. (2022). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4G1 (eIF4G1) at Ser1147 is specific for eIF4G1 bound to eIF4E in delayed neuronal death after ischemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1830. <https://doi.org/10.3390/ijms23031830>.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., & Hijlkema, K. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14(8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
- Mehta, A., Vasquez, N., Ayers, C. R., Patel, J., Hooda, A., Khera, A., et al. (2022). Independent association of lipoprotein(a) and coronary artery calcification with atherosclerotic cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 79(8), 757–768.
- Melvin, J. C., Seth, D., Holmberg, L., Garmo, H., Hammar, N., Jungner, I., et al. (2012). Lipid profiles and risk of breast and ovarian cancer in the swedish AMORIS study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 21(8), 1381–1384. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0188>.
- Merrick, W. C., & Pavitt, G. D. (2018). Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033092>.
- Monaco, M. E. (2017). Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 8(17), 29487–29500.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A. A., et al. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Molecular Cell*, 26(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.018>.

- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1987). The involvement of mRNA secondary structure in protein synthesis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 65(6), 576–581. <https://doi.org/10.1139/o87-074>.
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., et al. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7029–7036. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145798>.
- Pettersson, F., Yau, C., Dobocan, M. C., Culjkovic-Kraljacic, B., Retrouvay, H., Puckett, R., et al. (2012). Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(March). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2334>.
- Pires, B. R. B., Panis, C., Alves, V. D., Herrera, A. C. S. A., Binato, R., Pizzatti, L., et al. (2019). Label-free proteomics revealed oxidative stress and inflammation as factors that enhance Chemoresistance in luminal breast Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/5357649>.
- Piserà, A., Campo, A., & Campo, S. (2018). Structure and functions of the translation initiation factor eIF4E and its role in cancer development and treatment. *Journal of Genetics and Genomics*, 45(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2018.01.003>.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., & Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO Journal*, 18(1), 270–279. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.270>.
- Ramalingam, S., Gediya, L., Kwegyir-Afful, A. K., Ramamurthy, V. P., Purushottamachar, P., Mbatia, H., et al. (2014). First Mnk1 degrading agents block phosphorylation of eIF4E, induce apoptosis, inhibit cell growth, migration and invasion in triple negative and Her2-overexpressing breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 5(2), 530–543. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1528>.
- Ramalingam, S., Ramamurthy, V. P., Gediya, L. K., Murigi, F. N., Purushottamachar, P., Huang, W., et al. (2019). The novel Mnk1/2 degrader and apoptosis inducer VNLG-152 potentially inhibits TNBC tumor growth and metastasis. *Cancers*, 11(3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers11030299>.
- Ramamurthy, V. P., Ramalingam, S., Gediya, L. K., & Njar, V. C. O. (2018). The retinamide VNLG-152 inhibits f-AR/AR-V7 and MNK–eIF4E signaling pathways to suppress EMT and castration-resistant prostate cancer xenograft growth. *FEBS Journal*, 285(6), 1051–1063. <https://doi.org/10.1111/febs.14383>.
- Raza, U., Asif, M. R., Rehman, A. B., & Sheikh, A. (2018). Hyperlipidemia and hyperglycaemia in breast Cancer patients is related to disease stage. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 34(1), 209–214.
- Richter, J. D., & Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433(7025), 477–480. <https://doi.org/10.1038/nature03205>.
- Robichaud, N., Del Rincon, S. V., Huor, B., Alain, T., Petrucci, L. A., Hearnden, J., et al. (2014). Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene*, 34(16), 2032–2042. <https://doi.org/10.1038/ncr.2014.146>.
- Robichaud, N., Hsu, B. E., Istomine, R., Alvarez, F., Blagih, J., Ma, E. H., et al. (2018). Translational control in the tumor microenvironment promotes lung metastasis: Phosphorylation of eIF4E in neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), E2202–E2209. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717439115>.
- Röhrig, F., & Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(11), 732–749. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.89>.

- Royce, M., Bachelot, T., Villanueva, C., Özgüroğlu, M., Azebedo, S., Melo Cruz, F., et al. (2018). everolimus plus endocrine therapy for postmenopausal women with estrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer A Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 4(7), 977–984. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.0060>.
- Ruan, H., Li, X., Xu, X., Leibowitz, B. J., Tong, J., Chen, L., et al. (2020). eIF4E S209 phosphorylation licenses myc- and stress-driven oncogenesis. *eLife*, 9, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.60151>.
- Rui, L. (2007). A link between protein translation and body weight. *Journal of Clinical Investigation*, 117(2), 310–313. <https://doi.org/10.1172/JCI31289>.
- Russell, D. W., & Spremulli, L. L. (1980). Mechanism of action of the wheat germ ribosome dissociation factor: Interaction with the 60 S subunit. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 201(2), 518–526. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(80\)90540-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90540-8).
- Safra, T., Kaufman, B., Kadouri, L., Ben-baruch, N. E., Ryvo, L., Nisenbaum, B., et al. (2017). Everolimus plus letrozole for treatment of patients with HR+, HER2–Advanced breast cancer progressing on endocrine therapy: An open-label, phase 2 trial. *Clinical Breast Cancer*, 18(2), e197–e203. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.09.004>.
- Salami, J., & Crews, C. M. (2017). Waste disposal—An attractive strategy for cancer therapy. *Frontiers in Cancer Therapy*, 1167(March), 1163–1167.
- Scagliola, A., Miluzio, A., Ventura, G., Oliveto, S., Cordiglieri, C., Manfrini, N., et al. (2021). Targeting of eIF6-driven translation induces a metabolic rewiring that reduces NAFLD and the consequent evolution to hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 12, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25195-1>.
- Seiler, A., Chen, M. A., Brown, R. L., & Fagundes, C. P. (2018). Obesity, dietary factors, nutrition, and breast Cancer risk. *Current Breast Cancer Reports*, 10(1), 14–27. <https://doi.org/10.1007/s12609-018-0264-0>.
- Siddiqui, N., & Sonenberg, N. (2015). Signalling to eIF4E in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 43, 763–772. <https://doi.org/10.1042/BST20150126>.
- Silvera, D., Formenti, S. C., & Schneider, R. J. (2010). Translational control in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 254–266. <https://doi.org/10.1038/nrc2824>.
- Simeone, P., Tacconi, S., Longo, S., Lanuti, P., Bravaccini, S., Pirini, F., et al. (2021). Expanding roles of De novo lipogenesis in breast Cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3375), 1–16.
- Somers, J., Pöyry, T., & Willis, A. E. (2013). A perspective on mammalian upstream open reading frame function. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(8), 1690–1700. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.020>.
- Sonneveld, S., Verhagen, B. M. P., & Tanenbaum, M. E. (2020). Heterogeneity in mRNA translation. *Trends in Cell Biology*, 30(8), 606–618. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.04.008>.
- Sunavala-Dossabhoy, G., Balakrishnan, S. K., Sen, S., Nuthalapaty, S., & De Benedetti, A. (2005). The radioresistance kinase TLK1B protects the cells by promoting repair of double strand breaks. *BMC Molecular Biology*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-19>.
- Tabernero, J., Rojo, F., Calvo, E., Burris, H., Judson, I., Hazell, K., et al. (2008). Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: A phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 26(10), 1603–1610. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.5482>.
- Tailler, M., Lindqvist, L. M., Gibson, L., & Adams, J. M. (2019). By reducing global mRNA translation in several ways, 2-deoxyglucose lowers MCL-1 protein and sensitizes hemopoietic tumor cells to BH3 mimetic ABT737. *Cell Death and Differentiation*, 26(9), 1766–1781. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0244-y>.

- Toyoshima, Y., Yoshizawa, F., Tokita, R., Taguchi, Y., Takahashi, S. I., Kato, H., et al. (2020). A translation repressor, 4E-BP1, regulates the triglyceride level in rat liver during protein deprivation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 318(5), E636–E645. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00464.2019>.
- Truitt, M. L., & Ruggero, D. (2016). New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nature Reviews Cancer*, 16(5), 288–304. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.27>.
- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P. G., Golub, T. R., Boehm, J. S., Hahn, W. C., et al. (2017). Defining a cancer dependency map. *Cell Press*, 170(3), 564–576. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.010>.
- van Riggan, J., Yetil, A., & Felsher, D. W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 301–309. <https://doi.org/10.1038/nrc2819>.
- Wang, C., Song, J., Liu, W., Yao, Y., Kapranov, P., Sample, K. M., et al. (2020). FLI1 promotes protein translation via the transcriptional regulation of MKNK1 expression. *International Journal of Oncology*, 56(2), 430–439. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4943>.
- Weiss, B., Allen, G. E., Kloehn, J., Abid, K., & Curran, J. A. (2021). eIF4E3 forms an active eIF4F complex during stresses (eIF4F S) targeting mTOR and re-programs the translome. *Nucleic Acid Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab267>.
- Wek, R. C. (2018). Role of eIF2 α kinases in translational control and adaptation to cellular stress. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032870>.
- Wendel, H. G., Silva, R. L. A., Malina, A., Mills, J. R., Zhu, H., Ueda, T., et al. (2007). Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes and Development*, 21(24), 3232–3237. <https://doi.org/10.1101/gad.1604407>.
- Wheater, M. J., Johnson, P. W. M., & Blaydes, J. P. (2010). The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival. *Cancer Biology and Therapy*, 10(7), 728–735. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.7.12965>.
- Wolford, R., de Benedetti, A., Nuthalapaty, S., Yu, H., Chu, Q. D., & Li, B. D. (2006). Up-regulation of TLK1B by eIF4E overexpression predicts cancer recurrence in irradiated patients with breast cancer. *Surgery*, 140(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.05.001>.
- Xie, J., Merrett, J. E., Jensen, K. B., & Proud, C. G. (2019). The MAP kinase-interacting kinases (MNKs) as targets in oncology. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 23(3), 187–199. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1571043>.
- Xu, H., Wang, Z., Xu, L., Mo, G., Duan, G., Wang, Y., et al. (2017). Targeting the eIF4E/ β -catenin axis sensitizes cervical carcinoma squamous cells to chemotherapy. *American Journal of Translational Research*, 9(3), 1203–1212.
- Yang, X., Zhong, W., & Cao, R. (2020). Phosphorylation of the mRNA cap-binding protein eIF4E and cancer. *Cellular Signalling*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.CELLSIG.2020.109689>.
- Yao, Y. S., Qiu, W. S., Yao, R. Y., Zhang, Q., Zhuang, L. K., Zhou, F., et al. (2015). MiR-141 confers docetaxel chemoresistance of breast cancer cells via regulation of EIF4E expression. *Oncology Reports*, 33(5), 2504–2512. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3866>.
- Zhao, W., Prijic, S., Urban, B. C., Tisza, M. J., Zuo, Y., Li, L., et al. (2016). Candidate antimetastasis drugs suppress the metastatic capacity of breast cancer cells by reducing membrane fluidity. *Cancer Research*, 76(7), 2037–2049. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1970>.
- Zheng, H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>.

10.2 Borrador de artículo

Tamoxifen metabolites treatment promotes MCF-7 transition to triple negative phenotype in a low LDL media

Andrea Munoz-Ayala¹ and Victor G. Garcia-Gonzalez ^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.

* To whom correspondence should be addressed: vgarcia62@uabc.edu.mx.

Simple Summary: Tamoxifen is the election neoadjuvant chemotherapy in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer cases; however, a large percent of patients develops chemoresistance and treatment failure. On the other hand, Low-Density lipoproteins (LDL) plasma concentrations have been associated with a higher chance of cancer development and acquiree chemoresistance. The molecular mechanisms that explain the relationship between higher plasma LDL levels and development of these events are still unclear. Elucidating the metabolic pathways involved allows generation of new prevention strategies or pharmacological approaches against chemoresistance.

Abstract: Estrogen Receptor-Positive (ER-positive) Breast Cancer represents about 80% of all breast cancer cases. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) such as tamoxifen are normally used for its treatment. However, it is common for patients to develop resistance to this therapy, namely chemoresistance, and treatment failure in consequence. In many cases, chemoresistance is associated with changes in hormonal receptor status and metastasis. It has been previously described in literature that low-density lipoproteins (LDL) favor cancer development, chemoresistance, and metastasis processes, but the molecular mechanisms involved have not been fully elucidated. In this study, we analyzed the effect of LDL on tamoxifen-derived metabolites resistance development in the MCF-7 cell line. We generated two resistant cellular variants and evaluated its hormonal receptor expression and its association with chemoresistance. The variant that was only generated with tamoxifen metabolites showed an important decrease in the expression of hormone receptors and a more aggressive behavior compared to the variant generated also with high concentrations of LDL in the culture media. We conclude that tamoxifen in combination with LDL prevents or retard the development of resistance, more studies are needed to confirm this theory.

Keywords: breast cancer, chemoresistance, estrogen receptor, tamoxifen, metastasis.

1. Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women around the world. In 2020 breast cancer had an approximated incidence of 2 million cases and caused 6 thousand deaths (Global Cancer Observatory, 2020) associated with metastatic tumors in vital organs and tissues. Breast tumors can be classified by molecular subtypes, depending on expression of hormonal receptors [1]. Currently the main subtypes are: Luminal A with Estrogen Receptor (ER)/Progesterone Receptor (PR)

expression, and no expression of human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2); Luminal B with ER/PR and HER2 expression; HER2 positive with HER2 overexpression and no expression of ER/PR and; Triple negative with expression of none of the hormonal receptors [2].

80% of breast cancer tumors are ER-positive and the election neoadjuvant treatment nowadays for premenopausal women are Selective estrogen receptor modulators (SERMS), especially tamoxifen. Tamoxifen is a prodrug whose active metabolites 4-hydroxytamoxifen (4OH-Tam) and 4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen (Endoxifen) are generated in vivo mainly by the liver [43]. Tamoxifen metabolites act as ER antago-nist in breast tissue[34], interfering with growth and proliferation signals in cancer cells. Although this treatment has been associated with decrease in recurrence rate by 41% and mortality rate up to 31% [55] nearly one third of the patients relapse in a fif-teen year period, associated with treatment resistance development.

Multiple mechanisms responsible for tamoxifen treatment resistance have been de-scribed, such as the loss or decrease in ER α expression in tumoral cells [66]. Besides, decreased ER α expression levels have been associated with epithelial-mesenchymal transitions (EMT) in vitro in MCF-7 cells [7].7 EMT phenomenon increase tumor cells capacity to spread (metastasize) to secondary tissues in vivo [7,8].7,8

It has been described that secondary tumors can differ in hormonal receptor status in comparison with the primary tumor [9],9 getting it necessary to carry out a reassess-ment and often change the pharmacological strategy, making recovery difficult in these cases. Changes in hormonal receptor status in metastatic tumors are probably associated with the EMT processes in which cells acquire similar characteristics to stem cells.

Moreover, high serum levels of Low-density lipoproteins (LDL) in plasma have been associated with an increased risk of developing cancer and metastasis in vivo, and this association also has been stablshed in clinical studies [10-13]. 10–13However, the molecu-lar mechanism triggered by LDL that favors these malignant processes remains under study.

The objective of the study was to evaluate the effect of LDL on tamoxifen resistance generation in a cellular ER-positive breast cancer model (MCF-7). Elucidating the role of LDL in tamoxifen chemoresistance development and the molecular mechanism in-volved mechanism allows to propose new strategies and to stablsh new pharmaco-logical targets to counteract resistance and reduce mortality associated with ER-positive breast cancer.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Tamoxifen metabolites 4-hydroxy-tamoxifen and endoxifen were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Tunicamycin (Tum) was obtained from Sigma-Aldrich.

2.2 Cell Lines

MCF-7 cells, obtained from American Type Culture Collection (ATCC), were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin and insulin. Cells were maintained at 37 oC with 90% humidity and 5% CO₂ .

2.3 Resistant cell line generation

We generated 2 cell variants:

- Var H: treatment with 1 μ M 4-hydroxytamoxifen and endoxifen for 30 days and 2 μ M of both metabolites for 15 days.
- Var I: treatment with 1 μ M 4-hydroxytamoxifen and endoxifen for 30 days and 2 μ M of both metabolites for 15 days plus 75 μ g/mL of LDL protein.

2.4 LDL isolation

Human low-density lipoproteins (LDL) were obtained from a healthy plasma donor by ultracentrifugation. Briefly, plasma density was initially adjusted to 1.0055 g/mL by adding KBr and then centrifuged at 345000g for 160 minutes at 4 °C. <1.0055 g/mL fraction was discarded, and the remaining plasma was adjusted again to 1.053 g/mL density. It was centrifuged at 377,000 g for 200 minutes. Finally, <1.053 fraction was recovered and dialyzed against 150 mM NaCl/0.024 mM EDTA ON.

2.5 Cell viability assay

Cell viability was assessed by dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. Cells were seeded into 96-well plates with a density of 20,000 cell/well and allowed to grow to 75% confluence. DMEM supplemented medium was replaced with Opti-MEM and incubated at 37 °C for 2h, later treatments were added (0.125-16 mM of 4-OH Tam or Endoxi) and incubated for 72h. The next step was addition of 30 μ L MTT (2.1 g/mL) in Opti-MEM and incubation at 37 °C for 4 h. Formazan crystals generated by mitochondrial cell activity were dissolved with lysis buffer (20% SDS, 50% N,N-dimethyl-formamide, pH 3.7). Lecture of absorbances at 590 nm was made 12h later.

2.6 Wound-healing assay

Cells were placed in a 6 well plate in a density of 400,000 cells/ well and allowed to grow to 90-95% confluence forming a monolayer. DMEM supplemented medium was replaced with DMEM experimental medium, and cells were incubated at 37 °C for 2h. Later, cells were treated with Mitomycin C for 2h for preventing proliferation. The monolayer was scratched with a pipette tip, washed with PBS to remove floating cells and treatments were added. Cells were allowed to migrate for 72h at 37 °C. Each well was fixed with paraformaldehyde, stained with Blue Coomassie, and photographed using Motic Images Plus 3.0 camera coupled to an optical inverted microscope.

2.7 Western Blot analysis

Cells were seeded into 6-well plates with a density of 400,000 cells/well and allowed to grow to 90-95% confluence. DMEM supplemented medium was replaced with DMEM experimental medium and incubated at 37 °C for 2h, later cells were treated and incubated for 24h. Cells were washed with PBS and lysed with lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.5 % NP40, EDTA, 0.2 mM sodium orthovanadate, 0.3 μ M aprotinin, 130 μ M bestatin, 14 μ M E-64, and 1 μ M leupeptin), supernatant was recollected. Proteins were separated by 10% or 8% SDS-PAGE, 25 μ g of protein of each sample were loaded, previously quantified by bicinchoninic acid method. Proteins were transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked at 37°C for 1h in TBS/0.1% tween 5% low fat milk. The used antibodies were: Anti-Estrogen receptor α , Anti-SULT1A1 Anti-p-FAK, Anti- FAK, Anti-Progesterone receptor, Anti- Nrf2, Anti-HER2 (Neu) and Anti-mouse horseradish peroxidase- conjugated secondary antibodies (Sangar Cruz Biotechnology).

2.8 Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. The IC₅₀ and ANOVA probe were calculated in GraphPad Prism 8.

3. Results

3.1. MCF-7 cell line is capable to internalize Dil-LDL

MCF7 cells were treated for 24 h with LDL previously marked with the fluorescent probe DilC18 (LDL-Dil) and evaluated with flow cytometry with PC7-A filter. 7.5 μ g/mL and 75 μ g/mL LDL-Dil concentrations were evaluated. Non an important difference was observed between both concentrations (Figure 1). This could indicate that the internalization of LDL in MCF-7 is carried out in a saturable form.

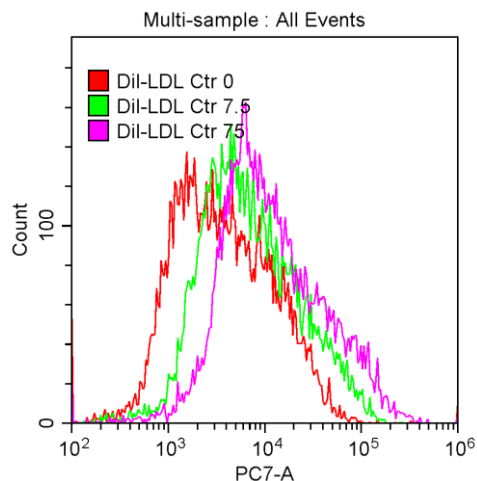


Figure 1. Evaluation of LDL-Dil internalization in MCF-7 cells. Red graph represents fluorescence in non-treated cells, green graph represents fluorescence in 7.5 μ g/mL treated cells, and pink graph represents fluorescence of 75 μ g/mL treated cells.

2. *Tamoxifen metabolites treatment allow generation of chemoresistant variants.*

MCF-7 cells were treated with 4-hidroxy-tamoxifen (4-OH-Tam) and endoxifen (Endo) the main two metabolites of tamoxifen generated in vivo by P450 isoenzymes. We generated two cellular variants, starting from confluent cultures (Figure 2):

- Variant-H: cells were treated with 1 μ M of 4-OH-Tam and 1 μ M Endo for a 30-day period. Metabolites concentration was increased to 2 μ M and treatment was continued for 15 additional days. After treatment was finished, cells remained in a proliferation and recovery period for 45 days with 50nM of metabolites.
- Variante-I: cells were treated with 1 μ M of 4-OH-Tam and 1 μ M Endo for a 30-day period plus 75 μ g/mL of LDL . Metabolites concentration was increased to 2 μ M and treatment was continued for 15 additional days, LDL concentration remained unchanged. After treatment was finished, cells remained in a proliferation and recovery period for 45 days with 50nM of metabolites plus 7.5 μ g/mL of LDL.

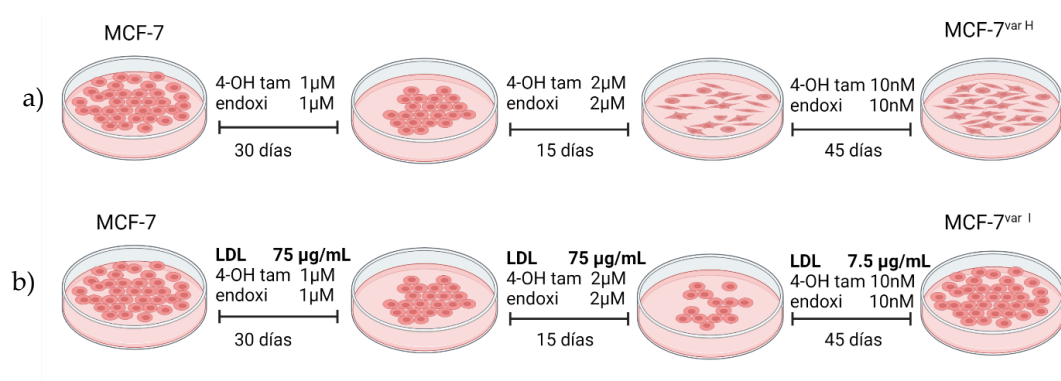


Figure 2. Chemoresistance variant generation. a) Generation of H variant, b) Generation of I variant.

We determinate the half -inhibitory concentration (IC₅₀) for the generated variants and parental cell using the MTT cell viability technic. A range of 0.25 -16 μ M metabolites concentrations were used and treatments were maintained for a 72-hour period. We measure the quantity of formazan reduced salt generated spectrophotometrically at 595 nm. The IC₅₀ were calculated using GraphPad Prism 8. IC₅₀ values of both metabolites were higher for H variant than for the parental cells. On the other hand, I variant had a higher IC₅₀ for 4-OHTam but a lower IC₅₀ value of endoxifen than parental cells (Figure 3).

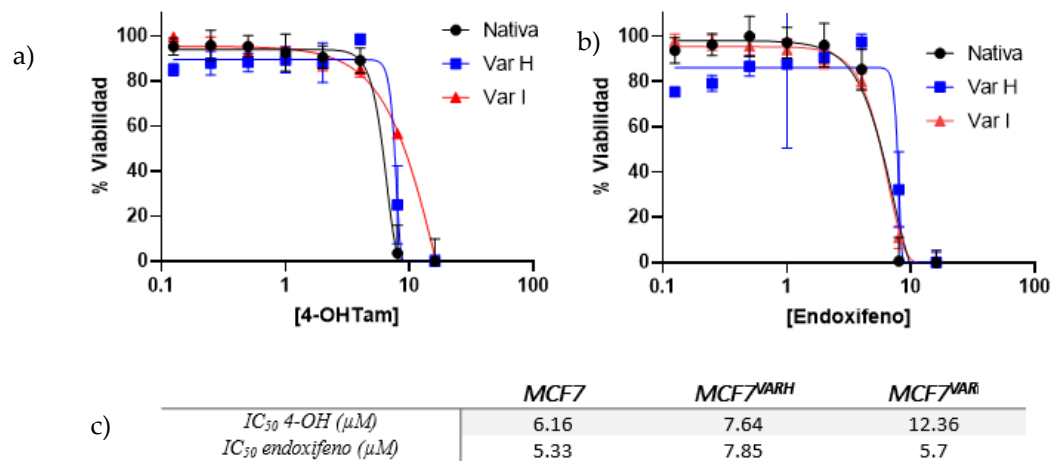


Figure 3. Viability assay with MTT technic. a) Graphs for 4-Oh metabolite made in GraphPad Prism 8. b) Graphs for Endo metabolite made in GraphPad Prism 8. c) Table with all results.

3. *Treatment with tamoxifen metabolites favors changes in hormonal receptor status and LDL can influence these variations.*

Considering the relationship between the development of resistance and the change in the expression of hormonal receptors in breast tumors described in various clinical studies (Nguyen et al., 2019), we decided to evaluate the basal expression of hormone receptors: the Estrogen receptor alpha (ER α), Epidermal growth factor 2 (HER2) and Progesterone receptor (PR) in resistant variants, compared with the parental cells (Figure 4). The results suggest a significant decrease in the expression levels of the 3 hormone receptors in the H variant, showing a TNBC-like phenotype.

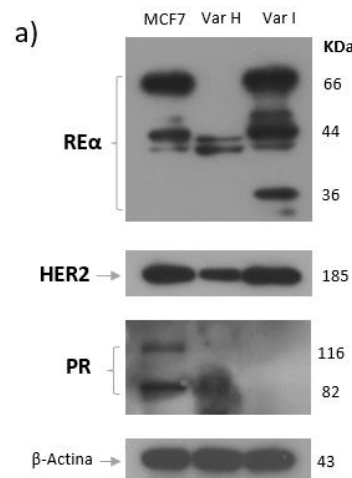


Figure 4. Evaluation of hormonal receptor status. β -actine was used as charge control.

Meanwhile, I variant showed a slight increase in ER α and HER2 expression, as well as a decrease in PR expression.

4. *Treatment with tamoxifen metabolites favors migratory capacity in MCF-7 cells.*

Considering the marked decrease in hormone receptors in the H variant, making it similar to triple negative cell lines that show a greater migratory capacity (such as MDA-MB 231), it was decided to evaluate the migration in this variant from a wound closure assay (Figure 5).

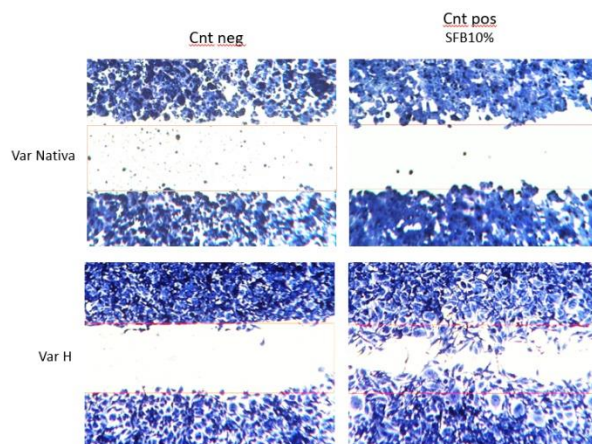


Figure 5. Wound closure assay. Comparison of MCF-7 parental cells and H variant migration capacity *in vitro*.

As can be seen, it was possible to observe a higher migration for the H variant compared to the parental cells when 10% FBS is added to the medium.

4. Discussion

In this study, we evaluated the influence of high concentrations of LDL in the culture media in resistance development to tamoxifen active metabolites, 4OH-Tam and endoxifen, in the breast cancer cell line MCF-7 that is characterized by presenting ER expression and low metastatic capacity.

Flow cytometry showed that the selected cell model is capable of internalizing LDL, so the effects observed in this study can be attributable to the presence of these lipoproteins in the culture media.

According to the results obtained in cell viability assays, a more resistant cell variant was generated in a low concentration LDL media. Apparently, within mechanisms involved in chemoresistance generation in this model were changes in hormonal receptor expression. Presence of high concentrations of LDL in the culture media prevented drastic changes in receptor levels. Subtle changes were observed when resistance was generated in a medium with high concentrations of LDL (I variant), while in a medium with low concentration of LDL the changes in hormonal receptor expression were evident (H variant). In addition, H variant acquired a higher migratory capacity compared to parental cells, probably associated with EMT development.

Taken together, these results are suggestive of a more aggressive behavior and more metastasis capability in variant H. It is required to evaluate in further studies migration and invasion phenomena with

complementary techniques to prove this theory. The phenomenon observed in H variant could be associated with what has been reported in clinical studies related to the change in hormonal receptor status in metastatic tumors [9].

Further studies are needed to determine why the differences observed between H variant and I variant. Targets related to lipid metabolism that could be involved in the observed results are currently being evaluated. It has been described that SERMS, such as tamoxifen, can affect negative regulation of SRBP2 and block the intracellular traffic of LDL-cholesterol, increasing cholesterol accumulation in various cell lines[14]. Cholesterol accumulation can favor generation of oxysterols, some of them have been related to chemoresistance generation [15]. A theory generated so far is that LDL overload achieved in I variant reactivates the negative regulation of SRBP2 in this cells, preventing cholesterol accumulation and resistance development. What was described above could indicate that the use of cholesterol-lowering drugs, like statins, in patients treated with tamoxifen could be contraindicated. More studies are required to prove this hypothesis.

Elucidating the role of LDL in tamoxifen chemoresistance development and the molecular mechanism involved bring us closer to propose new strategies and/or pharmacological targets to prevent or counteract chemoresistance, avoiding complications in ER-positive tumor treatment.

5. Conclusions

High LDL concentration in culture media during tamoxifen metabolites chemoresistance development prevents hormonal receptor status drastic changes in MCF7 cell line. Also prevents the emergence of more aggressive characteristics possibly related to the EMT process, that is associated with metastasis process. More studies are required to clarify the phenomenon observed. It is also necessary to evaluate in other cellular models the effects of high LDL concentrations.

Author Contributions: VG-G:Conceptualization, AM-A:methodology development and writing.

Funding: This article is part of the proyect: “Regulación del eje PERK/eIF4A por moléculas terpénicas: implicación metabólica en quimiorresistencia” approved in Convocatoria Ciencia Básica del Conacyt 2018-2019.

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

References

1. Meisner, A. L. W., Houman Fekrazad, M. & Royce, M. E. Breast Disease: Benign and Malignant. *Med. Clin. North Am.* **92**, 1115–1141 (2008).
2. Fragomeni, S. M., Sciallis, A. & Jeruss, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **27**, 95–120 (2018).
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.* **55**, 471–478 (2005).
4. Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C. & Curigliano, G. Breast cancer. *Lancet (London, England)* **6736**, 1–20 (2021).
5. Jordan, V. C. Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, 1–20 (2014).
6. Mills, J., Rutkovsky, A. & Giordano, A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **63**, 59–65 (2018).
7. Bouris, P. *et al.* Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific

- matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biol.* **43**, 42–60 (2015).
8. Yuan, J. *et al.* Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype in the tamoxifen-resistant breast cancer cell: A new role for G protein-coupled estrogen receptor in mediating tamoxifen resistance through cancer-associated fibroblast-derived fibronectin and $\beta 1$ -. *Breast Cancer Res.* **17**, 1–18 (2015).
 9. Nguyen, T. H., Nguyen, V. H., Nguyen, T. L., Qiuyin, C. & Phung, T. Evaluations of Biomarker Status Changes between Primary and Recurrent Tumor Tissue Samples in Breast Cancer Patients. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).
 10. Melvin, J. C. *et al.* Lipid profiles and risk of breast and ovarian cancer in the swedish AMORIS study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **21**, 1381–1384 (2012).
 11. Raza, U., Asif, M. R., Rehman, A. Bin & Sheikh, A. Hyperlipidemia and hyper glycaemia in Breast Cancer Patients is related to disease stage. *Pakistan J. Med. Sci.* **34**, 209–214 (2018).
 12. Wolfe, A. R. *et al.* High-Density and Very-Low-Density Lipoprotein Have Opposing Roles in Regulating Tumor-Initiating Cells and Sensitivity to Radiation in Inflammatory Breast Cancer. *Physiol. Behav.* **91**, 1072–1080 (2015).
 13. Kang, C., LeRoith, D. & Gallagher, E. J. Diabetes, obesity, and breast cancer. *Endocrinology* **159**, 3801–3812 (2018).
 14. Fernández-Suárez, M. E. *et al.* Selective estrogen receptor modulators (SERMs) affect cholesterol homeostasis through the master regulators SREBP and LXR. *Biomed. Pharmacother.* **141**, (2021).
 15. Gonzalez-Ortiz, A., Galindo-Hernandez, O., Hernandez-Acevedo, G. N., Hurtado-Ureta, G. & Garcia-Gonzalez, V. Impact of cholesterol-pathways on breast cancer development, a metabolic landscape. *J. Cancer* **12**, 4307–4321 (2021).