

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



**REGULACIÓN DEL FACTOR eIF4F EN PROCESOS DE
QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER DE MAMA**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

PRESENTA

M. en C. ANGEL ARMANDO PULIDO CAPIZ

Mexicali, Baja California

enero de 2025

Carta de Dictamen de la Evaluación Escrita del Examen de Grado




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

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

Mexicali, B.C., a 18 de diciembre de 2024

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del trabajo terminal titulado "REGULACIÓN DEL FACTOR eIF4F EN PROCESOS DE QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER DE MAMA" que para obtener el Diploma de **Grado de Doctor en Ciencias en Biomedicina**, presenta el C. Angel Armando Pulido Capiz, una vez concluida la evaluación correspondiente, hemos resuelto **aprobado**.


Dr. Víctor G. García González.
Presidente


Dr. Raúl Díaz Molina.
Secretario


Dr. Octavio Galindo Hernández.
Sinodal


Dra. Raquel Muñoz Salazar
Sinodal


Dra. Brenda Chimal Vega.
Sinodal

Agradecimientos

Al finalizar esta tesis de doctorado, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible este logro y me acompañaron en este desafiante camino.

En primer lugar, dedico un agradecimiento muy especial a mi esposa y a mi hija. A mi esposa, gracias por tu amor, paciencia y apoyo incondicional en cada paso de este proceso. Tu comprensión en los momentos de ausencia y tu constante motivación fueron fundamentales para que pudiera seguir adelante. A mi hija, por ser una fuente de inspiración y alegría en mi vida. Cada sonrisa y abrazo me recordaban la importancia de perseverar y dar lo mejor de mí. Ustedes han sido mi mayor impulso para alcanzar este objetivo.

A mis padres, quienes han estado a mi lado desde el inicio de esta travesía académica, agradezco su constante apoyo, confianza y amor inquebrantable. Gracias por ser mi ejemplo de fortaleza y por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación. Sus consejos y su fe en mí fueron un pilar indispensable para seguir adelante.

A mis profesores, en especial a mi director de tesis, expreso mi profundo agradecimiento por su orientación, paciencia y guía a lo largo de este proyecto titulado "Regulación del factor eIF4F en procesos de quimiorresistencia en cáncer de mama". Sus enseñanzas y su apoyo incondicional fueron clave para el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por su colaboración, amistad y disposición para trabajar en equipo. Las horas compartidas en el laboratorio, las discusiones científicas y su apoyo constante hicieron de este proceso una experiencia más llevadera y enriquecedora. Agradezco su compañerismo y la dedicación con la que contribuyeron a este proyecto.

Por último, extendiendo mi gratitud a todas las personas y entidades que, de alguna manera, contribuyeron al éxito de esta tesis. Su apoyo fue clave para que este trabajo pudiera concretarse. A todos, mi más sincero agradecimiento.

Dedicatoria

Abreviaturas

MCF-7: Línea celular receptor de estrógenos positivo+.

MCF-7^{Var E}: Línea celular receptor de estrógeno positivo resistente, variante E.

RE+: Receptor de Estrógenos positivo.

HER2+: Receptor positivo al factor 2 de crecimiento epidermal.

RP+: Receptor de progesterona positiva.

CYP: Citocromos de la familia P450.

MDR: Multifarmaco resistente.

4-OH Tam: 4-OH tamoxifeno.

E2 : Estradiol.

TNBC: Células de cáncer de mama triple negativo.

WB: Western Blot.

RE α : Receptor de estrógenos Alpha.

Contenido

Carta de Dictamen de la Evaluación Escrita del Examen de Grado	i
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Abreviaturas	iv
Contenido	v
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	vii
Resumen	viii
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
3. Antecedentes	13
4. Planteamiento del Problema	15
5. Justificación	16
6. Hipótesis y Objetivos	17
6.1. Objetivo general	17
6.2. Objetivos específicos	17
7. Materiales y métodos	18
7.1 <i>Cultivo de células MCF-7 (RE+).</i>	18
7.3 <i>Evaluación de la resistencia.</i>	18
7.4 <i>Protocolo de resistencia.</i>	19
7.4.1 <i>Ensayos de viabilidad celular.</i>	19
7.4.2 <i>Caracterización de factores asociados a la resistencia.</i>	19
7.5 <i>Evaluación criptotanshinona, y aurapteno sobre los fenómenos de proliferación y quimiorresistencia.</i>	20
7.6 <i>Evaluación de las vías relacionadas con el complejo eIF4F.</i>	20
7.7 <i>Ensayos de docking molecular para determinar interacciones de criptotanshinona y aurapteno con componentes del complejo eIF4F y el RE.</i>	21
7.8 <i>Sobreexpresión y purificación de eIF4A.</i>	22
7.9 <i>Evaluación de la actividad ATPasa del eIF4A.</i>	23
7.10 <i>Evaluación de la interacción de eIF4A por medio de ensayos de fluorescencia.</i>	24
7.11 <i>Propiedades ADME del aurapteno.</i>	24
7.12 <i>Análisis estadístico.</i>	24
8. Resultados	25
9. Discusión	52
10. Conclusiones	55
11. Logros alcanzados	57
12. Bibliografía	58
11. Anexos	64
Anexo A. Artículo de Investigación	
Anexo B. Solicitud de patente	
Anexo C. Artículo de Colaboración	

Índice de Tablas

Tabla 1. Valores de IC₅₀ de las variantes de línea celular MCF-7 bajo 37
tratamientos con endoxifeno, 4-OH tamoxifeno y aurapteno.

Tabla 2. Valores de EC₅₀ para células ER+ y TNBC bajo tratamientos con 55
aurapteno y metabolitos de tamoxifeno.

Índice de Figuras

Figura 1. Dominios estructurales del receptor de Reα.	14
Figura 2. Vías de señalización que regulan la formación del complejo eIF4F.	16
Figura 3. Western Blot y SDS-PAGE de la proteína eF4A purificada.	33
Figura 4. Esquema para la generación de resistencia a los metabolitos del tamoxifeno.	37
Figura 5. Comparación de dosis vs viabilidad celular sobre la línea celular partenar y la variante E.	38
Figura 6. Comparación de dosis vs viabilidad celular sobre la variante G	39
Figura 7. Expresión del receptor de estrógenos y catepsina D.	40
Figura 8. Imagen de Microscopía Óptica de la línea celular MCF-7 con tratamientos de E2, endoxifeno, 4-OH Tam.	41
Figura 9. Caracterización del complejo eIF4F utilizando como tratamiento las moléculas del tamoxifeno y E2.	42
Figura 10. Comparación de docking molecular del receptor de estrógeno.	43
Figura 11. Efecto de la cryptotanshinona en la regulación de eIF4A.	45
Figura 12. Viabilidad celular de las células MCF-7 con tratamientos de cryptotanshinona.	47
Figura 13. Viabilidad celular de las células MCF-7Var E con tratamientos crecientes de Cryptotanshinona y en combinación con metabolitos del tamoxifeno.	48
Figura 14. Efecto de aurapteno en la regulación de eIF4A.	49
Figura 15. Docking molecular de aurapteno y rocaglamida sobre eIF4A.	50
Figura 16. Viabilidad celular de células MCF-7 y MCF-7 ^{Var E} con tratamientos de aurapteno.	51
Figura 17. Microscopia óptica de los tratamientos con endoxifeno, 4-OH Tam, y Aurapteno.	53
Figura 18. Caracterización del complejo eIF4F y RE.	57
Figura 19. Interacciones de la bomba de eflujo de aurapteno.	60
Figura 20. Resultados de SwissADME sobre las propiedades del aurapteno.	62

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres, y aproximadamente el 80 % de los casos diagnosticados son positivos para receptores de estrógenos (RE+). Este subtipo tumoral es particularmente sensible a los tratamientos hormonales, aunque muestra una baja respuesta frente a terapias citotóxicas convencionales.

El tamoxifeno es uno de los tratamientos hormonales más empleados para el cáncer de mama RE+. Sus principales metabolitos activos, el 4-OH-tamoxifeno y el endoxifeno, que desempeñan un papel fundamental en su mecanismo terapéutico. Sin embargo, la aparición de resistencia al tamoxifeno en células tumorales RE+ representa un desafío clínico significativo, asociado a diversos mecanismos moleculares, entre ellos, la mayor actividad del complejo eIF4F. Dentro de este complejo, el factor eIF4A juega un papel esencial al desenrollar las estructuras terciarias de la región 5'UTR del ARN mensajero (ARNm), facilitando así la traducción de proteínas críticas para la proliferación celular y la resistencia a los tratamientos.

En este contexto, se planteó la generación de líneas celulares resistentes a los metabolitos del tamoxifeno mediante protocolos específicos de inducción de resistencia. Posteriormente, se propuso evaluar el potencial terapéutico de la criptotanshinona y el aurapteno como agentes sensibilizadores en estas células resistentes a los metabolitos 4-OH-tamoxifeno y endoxifeno. Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular, estudios de docking molecular y análisis mediante *western blot*. Los resultados obtenidos evidencian la eficacia de los tratamientos combinados de criptotanshinona y aurapteno con los metabolitos del tamoxifeno, lo que sugiere su potencial en la sensibilización de las variantes resistentes.

1. Introducción

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que se puede clasificar en diferentes subtipos moleculares: receptor de estrógeno positivo (RE+), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2+), y triple negativo (TNBC) (García-Redondo *et al.*, 2023). Aproximadamente el 80 % de los casos de cáncer de mama son receptor de estrógeno positivo (RE+) (Sung *et al.*, 2021). Uno de los medicamentos más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama RE+ es el tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógeno que compite con su ligando natural, el estradiol (E2); una hormona estrogénica que juega un papel crítico en el crecimiento, desarrollo y función del tejido mamario (Chang, 2012). El tamoxifeno se clasifica como un profármaco debido a su transformación al ser metabolizado en metabolitos activos. Estos metabolitos incluyen N-desmetiltamoxifeno (NMD), 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno) y 4-OH tamoxifeno (4-OH Tam), los cuales muestran una afinidad entre 30 y 100 veces más por el receptor de estrógeno comparado con el tamoxifeno (Lim *et al.*, 2005).

Dentro de los tratamientos más recurrentes contra el cáncer de mama RE+ es el tamoxifeno; No obstante, algunos pacientes desarrollan farmacorresistencia. Particularmente, hay informes sobre la adquisición de la resistencia a 4-OH Tam y su capacidad para inhibir al RE+ (Chang, 2012); Siendo, el 4-OH Tam y el endoxifeno los principales metabolitos activos. Sin embargo, la información es limitada sobre la resistencia al metabolito activo más potente, el endoxifeno. La aparición de quimiorresistencia en las diferentes etapas del cáncer de mama RE+, ha aumentado significativamente la complejidad del tratamiento (Lim *et al.*, 2005).

Se han elucidado varios mecanismos que explican cómo las células neoplásicas desarrollan resistencia a la terapia. Estos incluyen una disminución en la activación del profármaco, una mayor expresión de bombas de eflujo, una reducción de la internalización del fármaco (Marin *et al.*, 2014) además de la activación de sistemas enzimáticos responsables del catabolismo del fármaco.

Asimismo, una de las causas de la resistencia al tamoxifeno es la disminución de la expresión del RE a través de la supresión transcripcional, causando una transformación fenotípica o cambios en el porcentaje de poblaciones celulares entre baja y normal expresión de RE (Gupta *et al.*, 2011). También se ha observado una baja concentración de metabolitos intratumorales de tamoxifeno en algunos casos de cáncer de mama resistente al tamoxifeno, lo que sugiere una condición de resistencia adquirida asociada con un aumento de bombas de eflujo de ABC (ATP-binding cassette) o de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Hembruff *et al.*, 2008). El receptor de estrógenos Alpha (RE α) es un actor clave en el contexto del cáncer de mama RE+, influyendo tanto en la patogénesis como en la respuesta al tratamiento. Además, la señalización de RE α muestra una compleja interacción con otras vías, como las mediadas por receptores de crecimiento, influyendo en el crecimiento y la supervivencia celular (Nair & Sachdeva, 2018).

Esta activación conduce al aumento en la síntesis selectiva de proteínas, haciendo del complejo del factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F) un objetivo de estudio interesante. El complejo eIF4F está compuesto por tres componentes clave: eIF4E, eIF4A y eIF4G, que juntos coordinan el inicio de la traducción del mRNA en células eucarióticas (Pelletier *et al.*, 2015). Una sobreexpresión o hiperactivación del factor eIF4E ha sido implicado en la traducción de diversos blancos de mRNA, incluyendo ciclinas D1, c-Myc, VEGF y Bcl-2, dependientes de la señalización por RE, que contribuyen a la progresión del cáncer de mama. Además, un aumento en la traducción de proteínas de supervivencia, incluyendo mecanismos de resistencia a fármacos por anti apoptóticos y bombas de eflujo. Además, una señalización anormal de eIF4G puede aumentar el ensamblaje y la estabilidad del complejo eIF4F, llevando a un incremento de la traducción de mRNA. Además, las alteraciones que incrementan la expresión o mejoran la función helicasa de eIF4A, pueden llevar a la traducción de transcritos específicos de mRNA, que, a su vez, pueden potenciar la quimioresistencia (Boyer *et al.*, 2024; Galicia-Vázquez *et al.*, 2012).

Por lo tanto, estos componentes forman un complejo dinámico y crucial para una traducción eficiente de mRNA, cuya desregulación a menudo está implicada en fenómenos de quimiorresistencia en células cancerosas (Boussemart *et al.*, 2014). Mediante su influencia en la traducción de proteínas clave, el complejo eIF4F impacta diversos procesos celulares mediados por RE, incluyendo la regulación del ciclo celular, proliferación, angiogénesis y resistencia a la apoptosis. Además, en células MCF-7 (células RE+), se han descrito altos niveles de expresión de las bombas de eflujo ABCB1 y ABCC1 (Hembruff *et al.*, 2008; Sodani *et al.*, 2012). Por lo tanto, esta doble regulación de eIF4F y RE podría representar un enfoque terapéutico estratégico para la quimiorresistencia del RE.

Como respuesta a este enfoque terapéutico, los compuestos naturales tienen potencial como estrategia terapéutica. En este sentido, se ha reportado que varias moléculas, como los rocaglates, el hippuristanol y la pateamina A, tienen actividad anticancerígena en modelos *in vitro* e *in vivo* (Naineni *et al.*, 2020). De hecho, se ha caracterizado que el rocaglamida y el silvestrol son compuestos adyuvantes en el tratamiento del cáncer, capaces de inhibir la subunidad eIF4A (Boyer *et al.*, 2024; Iwasaki *et al.*, 2019; Naineni *et al.*, 2020). Sin embargo, nuevas moléculas de origen natural pueden representar un área de oportunidad, en este sentido, el aurapteno, una geraniloxicumarina obtenida de plantas del género *Citrus*, la que podría mostrar varias propiedades farmacológicas, como agente antineoplásico, inductor de apoptosis, agente neuroprotector, inhibidor de metaloproteinasas, antioxidante y hepatoprotector. También se ha propuesto que el aurapteno se une a ER α y modula su actividad transcripcional en células RE+ (de Medina *et al.*, 2010). Además, esta cumarina puede interactuar con el complejo eIF4F interfiriendo con la traducción selectiva (Naineni *et al.*, 2020), en este sentido, eIF4A podría ser su blanco.

La criptotanshinona es un diterpeno natural obtenido de plantas del género *Salvia*.

Este compuesto posee una amplia variedad de propiedades farmacológicas, tales como antitumoral, antiinflamatoria, antifibrótica, protector cardiovascular y regulador en trastornos metabólicos. La criptotanshinona podría mostrar capacidades antitumorales, induciendo apoptosis, disminuyendo la proporción de Bcl-2/Bax, aumentando la liberación de citocromo C y la pérdida de metaloproteinasas. También puede inhibir la proliferación a través de la vía STAT-3 (Wu *et al.*, 2020b). Además, evidencia sugiere que también podría interactuar con el factor de iniciación de la traducción de proteínas eIF4A y el factor PI3K (Gonzalez-Ortiz *et al.*, 2022).

Los compuestos naturales, como moléculas bioactivas derivadas de plantas, hierbas y otras fuentes, han demostrado un efecto terapéutico contra el cáncer, que abarca desde propiedades antiinflamatorias y antioxidantes hasta la modulación del sistema inmunológico y la inducción de apoptosis. Los metabolitos del tamoxifeno utilizados junto con estos compuestos naturales pueden tener el potencial de contrarrestar los mecanismos de quimiorresistencia y mejorar los resultados terapéuticos. En este sentido, la criptotanshinona y el aurapteno pueden ser una alternativa para la sensibilización de las células cancerígenas resistentes. Por lo tanto, ser coadyuvantes en los tratamientos, dirigidos a modelos de células RE+.

2. Marco teórico

2.1 El Receptor de estrógenos.

Los receptores de estrógenos forman parte de una superfamilia de receptores hormonales nucleares, que actúan como factores de transcripción activados por ligando y juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo, reproducción y mantenimiento de un amplio rango de tejidos (Lipovka & Konhilas, 2016).

El RE α está conformado por 595 aminoácidos, el cual está diseccionado en diferentes dominios que cumplen diversas funciones, entre los que encontramos el dominio amino terminal o NTD en el cual se encuentra el sitio de activación 1 o AF1, después tenemos al dominio de unión a ADN, seguido del sitio H o de articulación, y finalmente el sitio de unión a ligando o LBD, el cual se encuentra el dominio de activación 2 o AF-2 (Fig. 1) (Xin *et al.*, 2016). Siendo la parte más importante para la activación del receptor, el dominio LBD, el cual está conformado por 12 hélices alfa en posición antiparalela, en el cual la parte del central están las hélices 5/6, H9, H10, y dos estratos más de hélices que rodean al centro, lo que genera una cavidad para la unión de los ligandos, a su vez el RE se dimeriza para poder cumplir con su función, en donde la región DBD y H juegan un papel importante para que esto se lleve a cabo (Yasar *et al.*, 2017).

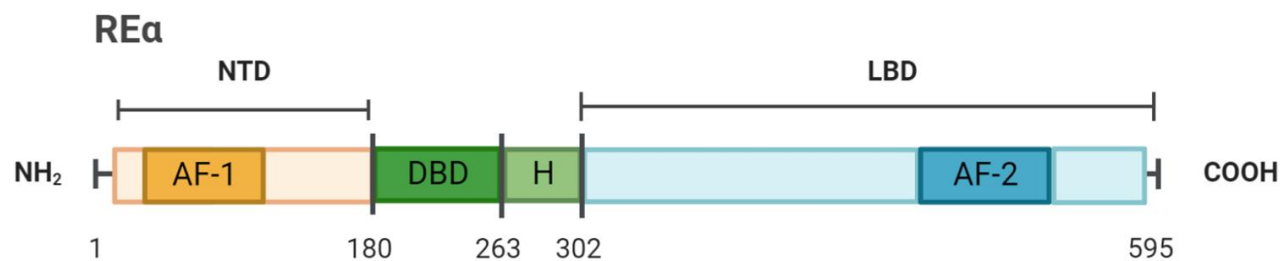


Fig. 1 **Dominios estructurales del receptor de RE α .** El receptor de estrógenos se conforma de 595 aminoácidos, y tiene 2 regiones principales, la NTD región amino terminal, en donde se encuentra la AF-1 (Activation function 1) en color amarillo, después se encuentra el DBD que corresponde al dominio de unión a DNA en color verde, seguido del dominio H o de articulación, después tenemos la otra región principal denominada LBD o dominio de unión a ligando, donde se encuentra el AF-2 (Activation function 2) en color azul.

La gran mayoría de los tumores RE+ (55-65%) son positivos también para el receptor de progesterona (RP+). El RP tiene una función en la señalización por RE (Fragomeni *et al.*, 2018). Cabe mencionar que los tumores RE+ son sensibles al tratamiento hormonal, pero muestran baja sensibilidad a tratamientos citotóxicos. Además, presentan una mayor recurrencia, pero siendo menos agresivos (García-Redondo *et al.*, 2023).

2.2 El rol del complejo eIF4F en la regulación de la traducción

Los mecanismos de traducción de ARNm a proteínas representan un proceso complejo, en donde participa el complejo eIF4F, que está conformado por tres subunidades principales, los factores eIF4E, eIF4A y eIF4G. El complejo tiene como principal función el reclutamiento de los ribosomas, con el fin de llevar a cabo la traducción del ARNm. Además, este complejo requiere de dos chaperonas de ARN, eIF4B y eIF4H, que promueven la actividad del eIF4A, para desplegar las estructuras terciarias que se pueden formar en la región 5'UTR del ARNm (Pelletier & Sonenberg, 2019b).

El mecanismo de traducción de proteínas comienza con la unión de las subunidades pequeñas ribosomales dependientes del 5'-m⁷G al ARNm, seguido de la búsqueda de las regiones 5' no traducidas (UTRs), para lo cual se requiere del factor de iniciación de helicasas de ARN dependientes de ATP, es decir el eIF4A, que contribuye en la velocidad de síntesis proteica, además están involucrados otros mecanismos de regulación, modulados por tres vías de señalización, PI3K/mTOR, MAPK e ISR (Fig. 2) (Shirokikh *et al.*, 2019). En el caso de la vía de PI3K/mTOR puede tener un efecto sobre la regulación de eIF4E, así como de las proteínas de unión del grupo 4E-BP, además la activación de la vía de señalización de MAPK provoca la fosforilación de eIF4E, que estimula la traducción de los ARNm (Bhat *et al.*, 2015). Sin embargo, aún no se ha dilucidado cómo se lleva a cabo la regulación de estos

mecanismos.

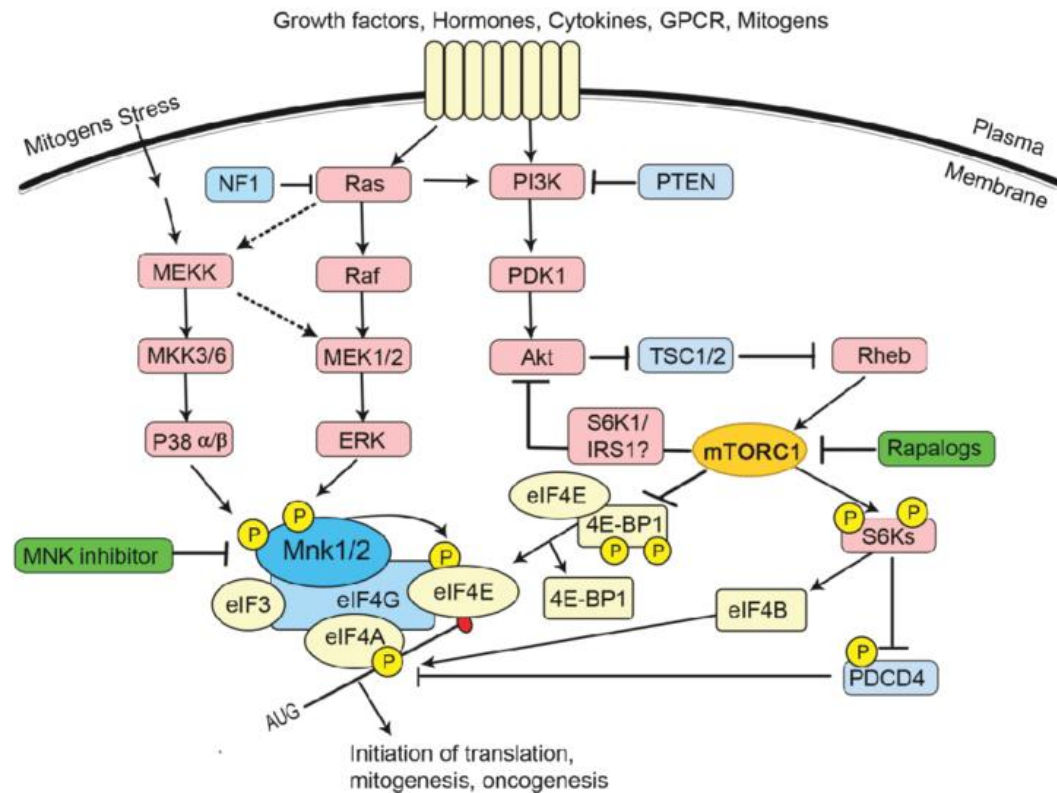


Fig. 2 **Vías de señalización que regulan la formación del complejo eIF4F.** Vías implicadas para la formación del complejo eIF4F. Tomado de Hou, J., Lam, F., Proud, C., & Wang, S. (2012). Targeting Mnk1/2 for cancer therapy. *Oncotarget*, 3(2), 118–131. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.453>.

2.2.1 El factor eIF4E.

Los niveles del factor eIF4E son críticos para el inicio de la traducción, y en células que se dividen activamente. Por ejemplo, ciertos cálculos sugieren que los niveles se encuentran hasta en 4×10^5 moléculas/célula. Cabe destacar que la expresión de eIF4E debe controlarse de manera adecuada, ya que incluso un pequeño aumento en su expresión podría promover la tumorigénesis, e incluso fenómenos asociados con la fármaco-resistencia (Kulak *et al.*, 2014). El aumento de la expresión de eIF4E se ha asociado a distintos tipos de cáncer, así como un incremento en la actividad del complejo eIF4F, que podría estar relacionado con fenómenos de resistencia, en terapias

que tiene como objetivo la vía de PI3K/mTOR. Cabe mencionar que la expresión de eIF4E es estimulada por medio de MYC y C-MYC, que aumentan por el estímulo de eIF4E, lo que genera una retroalimentación entre ambos factores (Lin *et al.*, 2008; Schmidt, 2004).

Si bien existen tres proteínas supresoras que regulan la disponibilidad de eIF4E en el complejo eIF4F, las cuales son 4E-BP1, 4E-BP2, y 4E-BP3, esta regulación se lleva a cabo cuando sufren una fosforilación a la baja, lo que genera una selección competitiva para unirse con eIF4E, es decir entre las proteínas de unión (4E-BP1, 4E-BP2, 4E-BP3) y el eIF4G, suprimiendo la traducción dependiente de Cap (Pelletier & Sonenberg, 2019a).

Por otro lado, se han descrito proteínas homólogas a eIF4E, dentro de las cuales se encuentra la 4EHP/eIF4E2 que comparte un 30 % de homología. Cabe mencionar que 4EHP/eIF4E2 son menos abundantes, y se unen a análogos de Cap con una menor afinidad en comparación con eIF4E, no llegando a interactuar con eIF4G. Así mismo, se han reportado otras proteínas homólogas, eIF4E3 y eIF4E1, las cuales no han sido completamente caracterizadas debido a su baja expresión y que solo se encuentran en tejido cardíaco, pulmonar y del músculo esquelético (Joshi *et al.*, 2004; Rosettani *et al.*, 2007; Zuberek *et al.*, 2007).

2.2.2 El factor eIF4G.

El factor eIF4G funciona como una estructura de andamiaje para la unión del ARNm y la subunidad ribosomal pequeña, resultando en el reclutamiento del complejo de pre-iniciación 43S (43S PIC). Ahora bien, en el caso de eIF4G1 y eIF4G3 poseen un sitio específico de unión para las proteínas de unión a poli-A (PABP), eIF4E, eIF4A, eIF3 y MNK, las cuales son de gran importancia para el proceso de inicio de la traducción (Pelletier & Sonenberg, 2019a).

En el inicio de la traducción se lleva a cabo la interacción de eIF4G y PABP, lo

cual sucede en varias etapas. En primera instancia, esta interacción hace posible la estabilización del complejo eIF4F con el Cap del ARNm, lo que estimula el reclutamiento del 43S PIC, provocando la unión de la subunidad ribosomal 60S, permitiendo incrementar la concentración de ribosomas maduros cercanos al Cap (Sun *et al.*, 2010).

2.2.3 El factor eIF4A.

El factor eIF4A se compone de 2 parálogos, eIF4A1 y eIF4A2, los cuales tienen un 90% de homología a nivel de secuencia de aminoácidos, siendo eIF4A1 el más abundante y mejor caracterizado, no obstante, una de las mayores diferencias de estos parálogos está relacionado con su expresión: eIF4A1 es sintetizado al momento de la división celular, y de manera contraria eIF4A2 se produce cuando la célula se encuentra en estado basal. Por otro lado, las expresiones de estos parálogos están interrelacionada, ya que al suprimir la expresión de eIF4A1, esto provoca un aumento en los niveles de eIF4A2 (Galicia-Vázquez *et al.*, 2012).

Además, existe una dependencia de la traducción limitada por el Cap en varios ARNm, fenómeno que ocurre cuando aumenta la estabilidad de las barreras estéricas en la región 5', en parte, debido a la formación de estructuras tridimensionales, lo que conlleva a eIF4A mantener su función crítica en el complejo eIF4F, esto al discriminar entre diferentes ARNm. En el caso de la afinidad entre eIF4A al ARNm, ésta tiende a ser mejor cuando el ARN presenta cadenas sencillas de polipurinas, con fragmentos de una longitud de 15 a 20 nucleótidos, donde no se ve involucrada una actividad ATPasa, puesto que, si se presenta dicha actividad, provocaría la separación de eIF4A del complejo eIF4F (Peck & Herschlag, 1999).

Adicionalmente, otro mecanismo relacionado con la modulación de eIF4A y del complejo eIF4F, es la vía de PDCD4, el cual es un gen supresor de tumores que se une a eIF4A, secuestrándolo, condición que puede bloquear la

formación del complejo eIF4F. Sin embargo, la interacción entre eIF4A y PDCD4 está regulada por S6K1 y S6K2 por la vía de mTORC1, las cuales fosforilan a PDCD4, e inducen su degradación por la vía de ubiquitinación (Dorrello *et al.*, 2006; Liwak *et al.*, 2012).

Además, en un reporte realizado en células tumorales resistentes a tamoxifeno, mostró un aumento en la expresión del complejo eIF4F, debido a una hiperfosforilación de la proteína 4E-BP1, ocasionando un impedimento en la unión con eIF4E y, provocando un aumento en la formación del complejo eIF4F (Fagan *et al.*, 2017).

2.3 Mecanismos de resistencia al tamoxifeno.

La quimiorresistencia involucra procesos que provocan la falta de sensibilidad de las células cancerígenas a la terapia, siendo uno de los factores más notables en el fracaso de la quimioterapia. Las células tumorales están expuestas a condiciones metabólicas altamente fluctuantes, metabolitos de señalización, biomoléculas del estroma y agentes quimioterapéuticos, que en conjunto generan un microambiente que puede inducir cambios en el fenotipo (Carvalho *et al.*, 2021; Galindo-Hernandez *et al.*, 2015). Estas adaptaciones pueden incluir alteraciones genéticas y, de manera importante, implican cambios transcripcionales o epigenéticos que modifican rutas metabólicas (Li *et al.*, 2017). Por mucho tiempo, la expresión de receptores del tipo MDR/ABCB1 se ha asociado con fenotipos multifarmaco-resistentes (Wang *et al.*, 2020).

Con la aparición de los fenómenos de quimiorresistencia a diferentes niveles, el tratamiento del cáncer de mama se ha vuelto más complejo (Zahreddine & Borden, 2013). Se han descrito varios mecanismos a través de los cuales, células neoplásicas se vuelven resistentes a la quimioterapia. Por ejemplo, la disminución de la activación de profármacos, el aumento en la expresión de bombas de eflujo, la disminución de la internalización de los fármacos y, la activación de sistemas enzimáticos para su catabolismo (Marin *et al.*, 2014).

Además, se ha observado que la metástasis de tumores epiteliales resistentes a la terapia constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer en adultos. (Gupta *et al.*, 2011).

Específicamente, dentro de las posibles causas de resistencia al tamoxifeno, se encuentra la disminución en la expresión del RE, provocando un cambio de fenotípico, de receptor de estrógenos positivo (RE+) a receptor de estrógenos negativo (RE-), por medio de una supresión transcripcional del RE o un cambio en el porcentaje de las poblaciones celulares, a este tipo de resistencia se le denomina resistencia *de novo* (Chang, 2012). Por otro lado, se puede presentar un fenómeno de resistencia por medio de una desregulación en la expresión de proteínas reguladoras; estos reguladores pueden ser tanto activadores como inhibitorios, encargados de determinar la actividad transcripcional del RE. También cambios conformacionales del RE provocados por la unión de agonistas o antagonistas determinan su habilidad de reclutar a proteínas regulatorias (Bocchinfuso & Korach, 1997; Simons & Kumar, 2013). En el caso del tamoxifeno, puede ejercer un efecto agonista mediante la interacción con coactivador 1 del receptor de esteroides (SRC-1) en el dominio AF-1 del RE, de tal manera que su actividad agonista o antagonista puede ser modulada dependiendo del contexto celular y de los activadores asociados al RE (Benecke *et al.*, 2000), ya que una alta expresión de algunos activadores podría aumentar la actividad agonista sobre el RE, lo que podría resultar en la resistencia al tamoxifeno.

Además, los mecanismos más frecuentes en la generación de resistencia farmacológica, se deben a la disminución de las concentraciones intracelulares del fármaco, al aumentar su eflujo y disminuir su internalización a la célula. En algunos casos de cáncer de mama que presentaron resistencia a tamoxifeno, encontraron una menor cantidad del fármaco intratumoral, lo que sugiere una condición de resistencia adquirida (Chang, 2012). Una de las posibles causas de tener una menor cantidad de tamoxifeno intracelular, es por el aumento de las

bombas de eflujo de la familia de las ABC o MDR; sin embargo, en el caso particular del tamoxifeno al ser un profármaco es necesario su biotransformación a los metabolitos activos, endoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno, proceso que se da por medio de los citocromos de la familia P450 o CYP (Massarweh & Schiff, 2006). Se conoce que existen polimorfismos que pueden afectar su función y disminuir su actividad enzimática.

2.4 Moléculas reguladoras del factor eIF4F

Una subunidad esencial del complejo eIF4F, es el factor eIF4A, que es uno de los blancos más valorados que se han estudiado del complejo. Se han reportado varias moléculas como los rocaglates, hippuristanol, pateamina A, los cuales han presentado una actividad anticancerígena en modelos *in vitro* como *in vivo* (Naineni *et al.*, 2020). Siguiendo esta misma temática de moléculas pequeñas de origen natural, donde se encuentran las flavaglinas, como la rocaglamida y el silvestrol, que han sido caracterizados como compuestos coadyuvantes en el tratamiento contra el cáncer, debido a que pueden inhibir a la subunidad eIF4A (Iwasaki *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2007).

Sin embargo, existen otras biomoléculas como la criptotanshinona, un compuesto de origen natural, que en células de leucemia linfoblástica aguda puede regular genes relacionados con la vía UPR y la vía de señalización de eIF2. Adicionalmente, podría interaccionar con el factor eIF4A y PI3K, esto basado en evidencia de docking molecular llevado a cabo en nuestro grupo de trabajo, de manera que puede ser un blanco importante como disruptor de síntesis proteica (Gonzalez-Ortiz *et al.*, 2022). No obstante, esta información todavía no se ha corroborado de manera experimental. Así mismo, se ha observado que la criptotanshinona puede inhibir la proliferación de las células MCF7, efecto regulado por la vía de señalización de mTOR y el RE, de tal manera que la criptotanshinona podría ser un coadyuvante para el tratamiento de cáncer de mama RE+ (Pan *et al.*, 2017).

Por otro lado, el aurapteno, una molécula pequeña, la cual no ha sido caracterizada extensivamente, podría interactuar con el complejo eIF4F, debido a que reduce la fosforilación de 4EBP1 y disminuye la traducción de eIF4B (Andreou *et al.*, 2017), también se ha observado que se puede unir a los receptores de estrógeno, y por lo tanto podría modular su actividad transcripcional en las células RE+ (de Medina *et al.*, 2010). A continuación, se llevará a cabo una descripción más específica del aurapteno y la criptotanshinona.

2.4.1 Aurapteno. El aurapteno es una preniloxicumarina, que es obtenida de las plantas del género *Citrus*, como lo son la toronja, naranja y mandarina. El aurapteno posee propiedades farmacológicas como un agente antineoplásico, inductor de apoptosis, agente neuroprotector, antihipertensivo, agonista de PPAR alfa, inhibidor de metaloproteinasas de matriz extracelular, antioxidante y agente hepatoprotector (Tayarani-Najaran *et al.*, 2021).

En estudios con líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231), se encontró que el aurapteno puede reducir la proliferación celular en un 50% a una dosis de 12 μM y hasta un 85% con 25 μM . Así mismo, en la línea celular MCF-7 también se observó una reducción en proliferación celular, sin embargo, esta no fue tan crítica como con las MDA, este efecto se observó en los rangos de 20-50 μM de aurapteno (Krishnan *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha descrito que el aurapteno puede disminuir la proliferación del carcinoma, junto con IGF-1, esto por medio del aumento de la expresión de la ciclina D1 (Krishnan *et al.*, 2009). De manera interesante también se ha observado que puede llegar a modular al RE, en un rango de concentraciones de 3.5 μM a 4.5 μM , de igual manera también puede tener un efecto agonista sobre la expresión de TGF- α , ya que bloquea la vía del receptor EGF. Otro de los efectos que tiene el aurapteno es inhibir a la enzima ACAT, y por lo cual puede inducir la inhibición del ciclo celular (de Medina *et al.*, 2010).

2.4.2 Criptotanshinona. La criptotanshinona, es un diterpeno que se obtiene de la planta *Salvia miltiorrhiza*, la cual posee una gran cantidad de propiedades farmacológicas, como capacidad antitumoral, antiinflamatorias, antifibrótica, además como protector cardiovascular, y regulador en desórdenes metabólicos.

Dentro de las capacidades antitumorales, se ha visto que la criptotanshinona puede ser un inductor de la apoptosis, esto por medio de la disminución de la relación de Bcl-2/Bax, aumento en la liberación de citocromo C, y pérdida de las metaloproteinasas, además de aumentar la expresión de la caspasa 3 por el aumento de expresión de p53, así mismo se ha visto que puede inhibir la proliferación por la vía de STAT-3 (Wu *et al.*, 2020b). Además, en modelos celulares RE+, puede disminuir la expresión de los genes de CDK1 y CCNA2 que son reguladores del ciclo celular, y al presentar una menor expresión se ve disminuida la proliferación celular (Li *et al.*, 2021). Por otro lado, también se ha observado que la criptotanshinona puede inhibir la actividad transcripcional del RE α , ya que disminuye la expresión del mensajero de pS2 y Cat D, que en condiciones con E2 el ligando natural del RE, se ven aumentadas (Li *et al.*, 2015).

3. Antecedentes

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, el uso de técnicas como la inmunohistoquímica y el perfil de expresión genética permite identificar a los diferentes subtipos moleculares. La determinación del subtipo es de gran importancia, ya que permite orientar el tratamiento, así como llevar a cabo un pronóstico de la enfermedad.

Los 3 principales subtipos moleculares son: el positivo a receptores de estrógeno (RE+), que puede subclasificarse en luminal A o luminal B dependiendo de la expresión de la proteína marcadora de proliferación (Ki67) (Loibl, Poortmans, Morrow, Denkert, & Curigliano, 2021); el positivo al receptor 2 del factor de crecimiento epidermal (HER2+/Neu) y el triple negativo (TNBC) que no expresa receptores hormonales (Fragomeni *et al.*, 2018). El 80% de los tumores mamarios son RE+ (Sung *et al.*, 2021)., siendo el que presentan una alta tasa de recurrencia, aunque representa el subtipo molecular menos agresivo.

Uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama RE+ se encuentra el tamoxifeno, indicado para etapas tempranas y avanzadas en mujeres en todas las edades. Además, su uso ha sido aprobado para la prevención primaria del cáncer de mama en mujeres con factores de riesgo elevado (Snozek *et al.*, 2011). El tamoxifeno actúa como modulador selectivo del RE, compitiendo con su ligando natural, estradiol (E2). El efecto mayoritariamente es antiestrogénico, debido a que impide la unión del E2, y evitando la generación de señales de supervivencia y proliferación, e inhibiendo el crecimiento de los tumores mamarios (Snozek *et al.*, 2011). También, juegan un papel importante las enzimas CYP1A1 y CYP1B1, debido a que se encargan de la degradación del E2.

El tamoxifeno es descrito como un profármaco, ya que su efecto farmacológico no es llevado a cabo únicamente por la molécula del tamoxifeno, debido a la formación de metabolitos a partir de este, y que tienen una contribución inhibitoria más elevada. De los metabolitos formados a partir del tamoxifeno se

encuentran el N-desmetiltamoxifeno (NMD), 4-hidroxi-N- desmetil-tamoxifeno (endoxifeno) y el 4-hidroxitamoxifeno (4-OH Tam), siendo el endoxifeno y el 4-OH Tam los que poseen una mayor actividad, la cual puede ser de 30-100 veces más potente que la del tamoxifeno. No obstante, el endoxifeno presenta un efecto farmacológico más potente y con mayor citotoxicidad, debido a su elevada concentración en plasma (Lim *et al.*, 2005), además de presentar una mayor afinidad sobre el receptor de estrógenos con respecto al 4- OH Tam.

Si bien, el uso del tamoxifeno es uno de los tratamientos más recurrentes contra el cáncer de mama RE+, algunos de los pacientes generan procesos de resistencia a dicho fármaco. De manera particular, existen reportes sobre la adquisición de resistencia con 4-OH Tam (Fan *et al.*, 2014); Sin embargo, los reportes sobre la resistencia a endoxifeno son reducidos.

En resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, sugieren que PDCD4, una proteína con propiedades antitumorales e inhibidora de eIF4A, está regulada a la baja en variantes resistentes a doxorubicina en un modelo celular de cáncer de mama triple negativo (células MDA-MB-231) al ser tratadas con criptotanshinona. Además, se observó que el tratamiento con esta molécula puede reducir su capacidad de invasión (Gonzalez-Ortiz *et al.*, 2022). En otro modelo y con la finalidad de la identificación de proteínas blancas a las que se une la criptotanshinona, en un reporte de nuestro grupo de sobrecarga metabólica en hepatocitos, se encontró que la criptotanshinona podría modular algún elemento del complejo eIF4F (Galindo-Hernández *et al.*, 2019).

4. Planteamiento del problema

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que mediante el uso de técnicas como la inmunohistoquímica y el perfil de expresión genética permite la identificación de los diferentes subtipos biológicos, los cuales son receptores de estrógeno positivo (RE+), receptor 2 del factor de crecimiento epidermal positivo (HER2+) y el triple negativo (Fragomeni, Sciallis, & Jeruss, 2018). Los tumores RE+ son sensibles a tratamientos hormonales, pero muestran poca sensibilidad a tratamientos citotóxicos. Los RE forman parte de la superfamilia de receptores hormonales nucleares, que actúan como factores de transcripción activados por ligando y juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo, reproducción y mantenimiento en un amplio rango de tejidos (Lipovka & Konhilas, 2016).

Las células tumorales están expuestas a condiciones metabólicas altamente fluctuantes, metabolitos de señalización, biomoléculas del estroma y agentes quimioterapéuticos, que generan un microambiente que puede inducir cambios fenotípicos (Carvalho *et al.*, 2021; Galindo-Hernandez *et al.*, 2015). Estas adaptaciones pueden incluir alteraciones genéticas, que implican cambios transcripcionales o epigenéticos que modifican las rutas metabólicas (Li *et al.*, 2017), que pueden repercutir sobre la efectividad de la terapia farmacológica. La quimiorresistencia involucra procesos que generan la falta de sensibilidad de las células cancerígenas a la terapia, por lo tanto, es un factor clave en el fracaso del tratamiento. Puesto que en el proceso de quimiorresistencia se ha observado un incremento en la expresión de bombas de eflujo, una disminución de la internalización de fármacos (Marin *et al.*, 2014), y la activación de sistemas enzimáticos para el catabolismo de los fármacos.

Por lo tanto, un blanco en el tratamiento del cáncer es la traducción de proteínas, debido a que disminuiría la expresión de las bombas de eflujo y de los sistemas enzimáticos, por lo cual el factor eIF4A, una subunidad del complejo eIF4F se vuelve apreciable para ser caracterizada, de manera que se dilucide

su comportamiento en fenómenos de quimiorresistencia. Siendo el uso de moléculas pequeñas naturales una alternativa para los tratamientos convencionales, como la criptotanshinona o el aurapteno, que podrían regular o modular el complejo eIF4F en células resistentes al tamoxifeno y los metabolitos derivados de este fármaco.

5. Justificación

El cáncer RE+ representa aproximadamente el 80 % de los casos de cáncer de mama (Fragomeni *et al.*, 2018), por lo cual es de gran interés su estudio. Dentro de las estrategias farmacológicas más utilizadas para el tratamiento complementario del cáncer de mama se encuentra el tamoxifeno. Sin embargo, se ha visto que pacientes con cáncer RE+ es probable que desarrollen fenómenos de resistencia. De tal manera, que el desarrollo de modelos experimentales, que permitan dilucidar los mecanismos de la quimiorresistencia son de gran importancia. Siendo, el factor eIF4F un elemento crítico, no sólo en la proliferación celular descontrolada asociada con procesos neoplásicos, sino también en los fenómenos de quimiorresistencia. Por lo anterior, es de gran interés, el buscar nuevas alternativas que puedan modular al complejo eIF4F, más aún, en casos donde se presenten fenómenos de resistencia, como la disminución de la activación de profármacos, el aumento en la expresión de bombas de eflujo o la disminución de la internalización de los fármacos. Para conocer cómo se llevan estos procesos de quimiorresistencia es de alta relevancia dilucidar las vías de señalización que se ven involucradas.

6. Hipótesis y Objetivos

6.1 Hipótesis

La criptotanshinona o aurapteno disminuyen la actividad del complejo eIF4F, en un modelo celular de cáncer RE+ (MCF-7), resistente a metabolitos del tamoxifeno.

6.2 Objetivo general

Caracterizar el efecto del aurapteno y criptotanshinona sobre el complejo eIF4F en células de cáncer de mama resistentes al tamoxifeno (modelo celular de cáncer MCF-7 RE+).

6.3 Objetivos específicos

1. Generar dos variantes resistentes a los metabolitos 4-OH Tamoxifeno y endoxifeno utilizando la línea celular tumoral MCF-7 RE+.
2. Evaluar las siguientes moléculas, criptotanshinona y aurapteno, en fenómenos de proliferación y quimiorresistencia en células MCF-7 nativas y resistentes.
3. Evaluar la función de las moléculas criptotanshinona, y aurapteno con respecto al factor eIF4A (ARN helicasa), a partir de proteínas sobrepresadas.
4. Determinar las bases de interacción de moléculas naturales (criptotanshinona, y aurapteno) a través de ensayos de docking molecular sobre componentes del complejo eIF4F y el RE.
5. Evaluar la expresión de marcadores de resistencia asociados a los transportadores ABC (ABCB1, ABCC1), en células MCF-7 nativas y resistentes.
6. Evaluar la activación de los factores del complejo eIF4F y RE en variantes resistentes en base a la estimulación con moléculas

reguladoras como criptotanshinona, y aurapteno.

7. Materiales y Métodos

7.1 Cultivo de células MCF-7 (RE+).

Se evaluó la línea celular MCF-7, que es RE+ y sensible a anti-estrógenos (ATCC HTB-22). La línea MCF-7 se cultivó en medio Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM Gibco). Los medios se suplementaron con 10 % de suero fetal bovino, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin, además de 0.02mg/mL de insulina.

7.2 Cultivo de células MDA-MB-231.

Se utilizó la línea celular MDA-MB-231 que tiene como característica la ausencia de marcadores, y se le denomina también como triple negativo (ATCC HTB-26). La línea celular MDA-MB-231 se proliferó en medio Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM). Los medios se suplementaron con 10 % de suero fetal bovino, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin.

7.3 Protocolo de resistencia.

Se establecieron los protocolos de resistencia a los metabolitos activos 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OH Tam) y 4-hidroxi-N-desmetil tamoxifeno (endoxifeno), a través del tratamiento de las células con concentraciones de 1 µM de cada metabolito además de la adición de 2 µM de estradiol. Las soluciones stock de los metabolitos se disolvieron 1 mM de DMSO para endoxifeno y estradiol, y para el 4-OH Tam se disolvió en etanol. El protocolo inicial comenzó con tratamientos con 1 µM de 4-OH Tam y de endoxifeno por 48 h, después de un periodo de recuperación, en donde las células se mantuvieron en medio fresco libre de 4-OH Tam y endoxifeno por 24 h, posteriormente se adicionó de nuevo el tratamiento con 1 µM de 4-OH Tam y de endoxifeno por 48 hrs además de 2 µM de estradiol, y este proceso se repitió por un periodo de 4 meses, hasta obtener las variantes resistentes, las cuales se expandieron para los estudios posteriores.

Además, se realizó otro protocolo de resistencia, donde se utilizó el fármaco fulvestrant, y mediante dosis crecientes, en un intervalo de 200nM hasta 1.6µM en periodos de 8-12 días según se observaron sus efectos por un periodo total de 4 meses.

Para el mantenimiento de las variantes resistentes, se mantuvieron los cultivos con 50 nM de 4-OH Tam y endoxifeno (Cheng *et al.*, 2017) o en su caso 50 nM de Fulvestrant. Como control en los experimentos se utilizaron células no tratadas con ninguno de los fármacos.

7.4 Evaluación de la resistencia.

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

7.4.1 Ensayos de viabilidad celular.

Para evaluar la quimioresistencia y los estímulos de citotoxicidad se utilizó el ensayo de reducción de MTT (Pulido-Capiz *et al.*, 2018). Las células se mantuvieron en proliferación en placas de 96 pozos con una densidad de 20,000 células/pozo y se dejaron proliferar hasta obtener una confluencia del 90 % con medio DMEM completo. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por medio Opti-MEM. Después las células se incubaron por 2 h bajo esta condición, pasado este tiempo se adicionaron los distintos tratamientos, con tiempos que variaron de 12 hasta 120 h dependiendo del experimento a realizar, el procesamiento de los resultados realizo en base a trabajos previos (Pulido-Capiz *et al.*, 2018).

7.4.2 Caracterización de factores asociados a la resistencia.

Se evaluó la expresión génica de transportadores de la familia de ABC, ABCC1 y ABCB1. Este protocolo se llevó a cabo mediante el uso de ARNm. Se sembraron a una densidad de 200.000 células/mL en placas de 6 pocillos de 20 mm y posteriormente se incubaron hasta alcanzar un 90 % de confluencia. Posteriormente, las células se incubaron bajo los diferentes tratamientos en periodos de 12h. El ARN total de las variantes celulares se obtuvo utilizando Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADNc se sintetizó

utilizando 1 µg de ARN y el Primer Script RT-PCR (FastSCRIPT™ cDNA Synthesis Kit). La concentración de ADNc se estandarizó para la qPCR con la mezcla maestra PowerUp Sybr Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante, y se utilizaron 10 µL de los ADNc resultantes para cada reacción de PCR.

Se utilizaron las siguientes secuencias de los primers: ABCB1 FWD 5-GCCAGCTGAACTCCTTAGAC-3; ABCB1 RVS 5-GATTCGTGCACAGCAGCA-3; ABCC1 FWD 5-GGCTCAAGGAGTATTCAGAG-3; ABCC1 RVS 5-CCATCGATGATGATCTCTCC-3; GAPDH FWD 5-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3; y GAPDH RVS 5-CTTGCCGTGGTAGAGTCAT-3. Las reacciones de qPCR se realizaron en un QuantStudio 1 de Applied Biosystems. Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción. 1 ciclo 95°C 1 min, 40 ciclos 95°C 15 s, 62°C 1 min, seguido de la curva de melting 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95° 15 s. Los datos fueron analizados con el método 2- $\Delta\Delta$ Ct tomando a GAPDH como gen de referencia y los resultados se expresaron como cambio según el control.

7.5. Evaluación de cryptotanshinona, y aurapteno sobre los fenómenos de proliferación y quimioresistencia.

La evaluación de criptotanshinona y aurapteno se llevó a cabo sobre la línea celular MCF7 (RE+) quimiorresistente a los metabolitos del tamoxifeno (desarrolladas a través del método 7.3 Protocolo de resistencia). Se utilizaron diferentes concentraciones en orden creciente en un rango de 500 nM a 100 µM, esto para determinar los valores de IC₅₀, para criptotanshinona y aurapteno, con el fin de establecer la concentración óptima de efectividad de cada una de estas moléculas.

7.6 Evaluación de las vías relacionadas con el complejo eIF4F.

Se realizó esta evaluación por medio de la expresión proteica, para el complejo eIF4F. El protocolo se llevó a cabo con las células MCF-7 y la variante resistente,

utilizando las moléculas reguladoras (criptotanshinona, y aurapteno).

Las células se sembraron a una densidad de 200 000 células/mL en placas de 20 mm y 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 90%. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se expusieron a los tratamientos respectivos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se lisaron durante 35 minutos a 4°C utilizando un buffer de lisis de proteínas con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados se centrifugaron a 4100×g durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA assay kit Thermo Scientific).

Las muestras de la fracción proteica total se analizaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) con concentraciones del 8-12%, dependiendo del peso molecular de las proteínas blanco. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Burlington, MA, EE.UU.), se bloquearon con leche descremada al 5% en solución buffer Tris al 0.1% de Tween-20 (TBS-T) durante 1 h a 37 °C, posteriormente se cubrieron con los respectivos anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos utilizados son lo siguientes, entre paréntesis se indica la concentración utilizada: anti-ER (1:250), anti-β actina (1:500), anti-eIF4A (1:500), anti-eIF4E (1:400), anti-GAPDH (1:500), anti-Catepsina D (1:450), anti-eIF4G (1:300) y anti-p-4E-BP1/2/3 (1:400).

La β-actina y GAPDH se usaron como control de carga. Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano y la detección se realizó con el kit Immobilon Western (Millipore).

7.7 Ensayos de docking molecular para determinar las bases de interacción de moléculas reguladoras y los componentes del complejo eIF4F y el RE.

La estructura tridimensional de eIF4A1 se obtuvo del Protein Data Bank (PDB) ID 5ZC9, que corresponde a la estructura de eIF4A1-ATP humana a 2Å de resolución. La estructura tridimensional de ERα es PDB 3ERT a 1,9Å de resolución (Berman *et al.*, 2002). Las estructuras de las moléculas ligando se

obtuvieron de la base de datos PubChem (Kim *et al.*, 2023), rocaglamida (CID 331783), aurapteno (CID 1550607), endoxifeno (CID 10090750), 4-OH Tam (CID 449459) y fulvestrant (CID 104741). Las estructuras proteicas se prepararon eliminando el agua y las moléculas pequeñas, dejando sólo la estructura de la proteína. El receptor fue protonado y con minimización de energía, estos experimentos se realizaron mediante el software Molecular Operating Environment (MOE) (*Molecular Operating Environment (MOE)*, 2022.02) con parámetros por defecto bajo el campo de fuerza AMBER99 (Hornak *et al.*, 2006). Para los ligandos, se generaron diferentes conformaciones utilizando la búsqueda estocástica en los parámetros por defecto del MOE.

Los sitios de unión se predijeron empleando la opción site Finder del software MOE (Soga *et al.*, 2007). El acoplamiento molecular se estableció con los parámetros por defecto del software MOE y se utilizó el refinamiento de receptor rígido. Para la interpretación de los resultados del docking, MOE identifica puentes salinos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, azufre-LP, catión- π y exposición al disolvente y da la puntuación S como valor de afinidad ligando-receptor. Las interacciones del ligando con las proteínas diana se predijeron basándose en la puntuación S (Clark & Labute, 2007).

7.8 Sobreexpresión y purificación de eIF4A.

El gen que codifica para la proteína eIF4A1 se clonó en el vector de expresión pET19b modificado (pET19bm), que contiene un gen de resistencia a la ampicilina, un sitio de poliadeninas, la secuencia del operón lac controlada por el promotor T7 y un tracto de 10 histidinas en el extremo N-terminal de eIF4A1. Además, el vector incluye un sitio de proteólisis para la proteasa de precisión (PPS, GE Healthcare) para facilitar la eliminación del tracto de histidinas.

Para los ensayos de sobreexpresión, el plásmido (pET19b-eIF4A1) se transformó en células de *Escherichia coli* Rosetta-Star (Novagen) y se sobreexpresó a 37°C en medio de cultivo 2XYT suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) hasta alcanzar una densidad óptica (DO 600 nm) de 0.6 nm. La expresión de la proteína se indujo añadiendo isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una

concentración final de 1 mM, seguido de incubación durante 16-24 h a 37°C.

Tras la incubación, las células se colectaron por centrifugación, se lisaron por sonicación y el sobrenadante se lavó con una solución tampón de NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM y de imidazol 10 mM. La purificación de la proteína eIF4A se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA (QIAGEN, Alemania). La purificación se evaluó mediante gel de acrilamida nativo adaptado del protocolo de Arndt Cluadia et.al, (Arndt *et al.*, 2012), la identificación se realizó mediante western blot utilizando anticuerpo contra eIF4A y también se realizó otro con un anticuerpo específico para el tag de histidinas, que se denominó Anti-His, en el cual solo debería estar presente en las proteínas que si presentan el tag de Histidinas (Fig. 3).

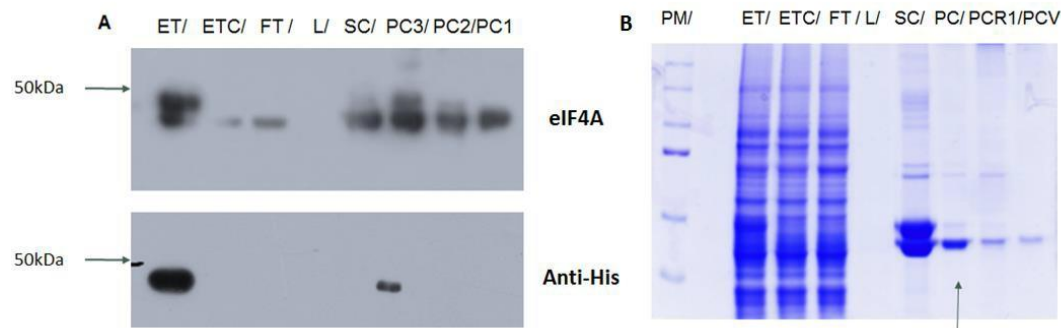


Fig. 3 Western Blot y SDS-PAGE de la proteína eIF4A purificada. A) Imagen del WB de eIF4A además del Anti-His. El carril ET corresponde al extracto total, el ETC es el extracto total pasado por la columna de Niquel, FT es el flow true, L corresponde a los Lavados, SC corresponde a proteína sin cortar, PC3 corresponde a proteína cortada con la PPS de la tercera purificación realizada, PC2 es proteína cortada de la segunda purificación realizada y PC1 proteína cortada de la primera extracción realizada. B) El carril ET corresponde al extracto total, el ETC es el extracto total pasado por la columna de Niquel, FT es el flow true, L corresponde a los Lavados, SC corresponde a proteína sin cortar, PC corresponde a proteína cortada con la PPS de la tercera purificación realizada, PCR1 es proteína cortada de la segunda purificación realizada y PCV proteína cortada de la primera extracción realizada. La flecha señala la proteína cortada donde se ve mayor cantidad de proteína.

7.9 Evaluación de la actividad ATPasa del eIF4A.

Se empleó el ensayo de ATPasa en gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plomo (PbNO_3) para evaluar el efecto de aurapteno sobre la actividad ATPasa de eIF4A. Se prepararon diluciones seriadas de aurapteno en un intervalo de

concentración de 0-200 μM . La rocaglamida, utilizada como control, se preparó a una concentración de 5 nM según un informe anterior (Iwasaki *et al.*, 2019). Tras realizar la electroforesis en gel, los geles se tiñeron con nitrato de plomo. La actividad ATPasa se visualizó como bandas claras sobre un fondo oscuro.

7.10 Evaluación de la interacción entre eIF4A por medio de ensayos de fluorescencia.

Las mediciones se realizaron mediante un fluorómetro Cary Eclipse (Varian) con barrido de 250 a 350 nm a 25 °C en modo síncrono. Se evaluó la interacción proteína-ligando con el uso de 12 μM de eIF4A1 y un rango de concentración de aurapteno de 0-80 μM . Las soluciones se homogeneizaron y se incubaron durante 5 min a 25 °C; las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo con una longitud de trayectoria de 1 cm y un volumen de 500 μL a 25 °C.

7.11 Propiedades ADME del aurapteno.

La estructura química del aurapteno se introdujo en la herramienta web SwissADME (Daina *et al.*, 2017) y en la interfaz ADMETlab 2.0 (Xiong *et al.*, 2021) para identificar las características ADME favorables y de toxicidad. Las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) de aurapteno determinan su similitud con un fármaco y los perfiles farmacocinéticos deseados. En concreto, nos centramos en evaluar la lipofílica óptima, la alta solubilidad en agua y la biodisponibilidad prevista.

7.12 Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, implementado mediante el programa GraphPad Prism 8. Este método permitió evaluar y comparar la expresión de diferentes variantes en los westerns blots, asegurando un análisis robusto de las diferencias observadas entre los grupos estudiados.

En el caso de los ensayos de viabilidad celular mediante la técnica MTT, se consideraron tres experimentos independientes para garantizar la

reproducibilidad y validez de los resultados obtenidos. Los datos se presentan como el promedio acompañado de su correspondiente desviación estándar (SD), lo que proporciona una medida clara de la variabilidad en las observaciones.

Finalmente, los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de p fue menor a 0,05 ($p < 0,05$), indicando un nivel de confianza suficiente para respaldar las conclusiones derivadas del estudio.

Con formato[Raquel Muñoz-Salazar]: Justificar, Sangría:
Izquierda: 1.6 mm, Derecha: 2 mm, EspacioAnterior: 10.25
pto, Interlineado: 1.5 líneas, Punto de tabulación: 2.23 car,
Izquierda, Sin control de líneas viudas y huérfanas

8 Resultados

8.1 Generación de variantes farmacoresistentes en células RE+ (MCF-7)

Se generaron dos variantes resistentes denominadas variante E y variante G, obtenidas por distintas estrategias experimentales. Para la variante E (MCF-7^{Var E}) el protocolo de resistencia utilizado fue mediante la exposición a endoxifeno 1 μM , 4-OH tamoxifeno 1 μM y estradiol (E2) 2 μM de manera conjunta para mantener una concentración equimolar entre los metabolitos y el E2, esta relación se consideró para emular las condiciones en el organismo. Cabe destacar que los metabolitos derivados del tamoxifeno utilizados son los que se encuentran en mayores concentraciones plasmáticas, y tienen un mayor efecto terapéutico. Estos cultivos celulares se estimularon en periodos de 48 h, seguidos de una recuperación de 24h (Fig. 4), así como dosis de mantenimiento de 50 nM de cada uno de los compuestos en el periodo de recuperación.

Ahora bien, para la variante G, se utilizó fulvestrant, un antagonista del receptor de estrógenos, el cual fue administrado en dosis crecientes; los tratamientos iniciaron con una concentración de 200 nM y se fue duplicando la dosis periódicamente en intervalos de 7-9 días, hasta llegar a una concentración de 1.6 μM (Fig. 4), utilizando dosis de mantenimiento de 50 nM de fulvestrant en los periodos de recuperación; ambas variantes se originaron a partir de la línea celular MCF-7.

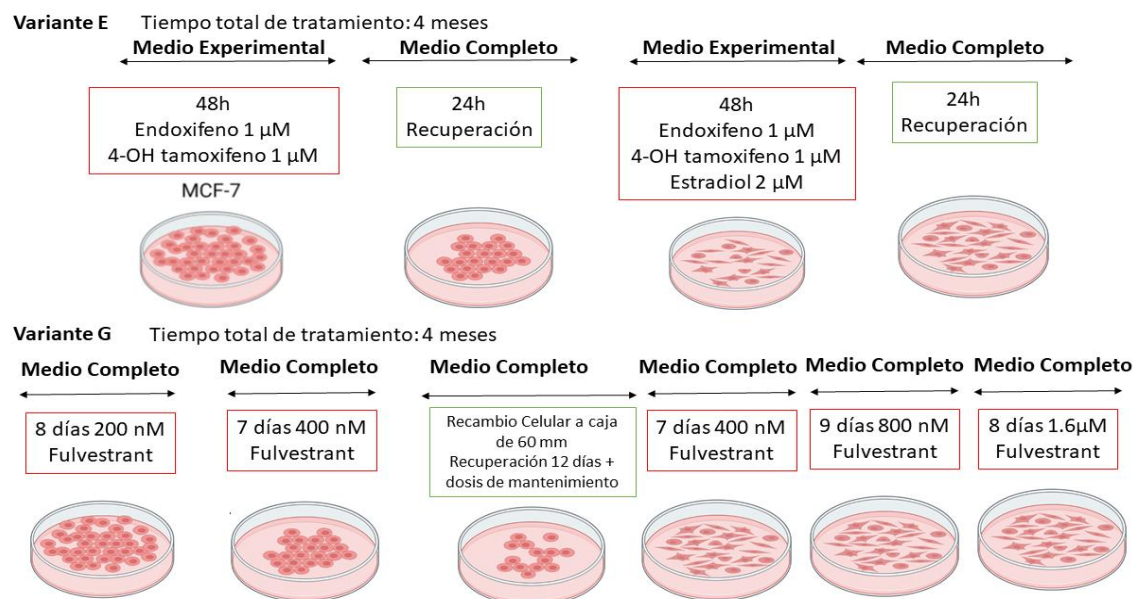


Fig. 4 Esquema para la generación de resistencia a los metabolitos del tamoxifeno. Tiempo y dosis del tratamiento para generar la resistencia. A) Representación gráfica del tratamiento utilizado para la generación la resistencia de la variante E utilizando endoxifeno 1 μ M, 4-OH tamoxifeno 1 μ M y estradiol 2 μ M. B) Representación gráfica del tratamiento utilizado para la generación de resistencia de la variante G utilizando fulvestrant en dosis crecientes de 200 nM a 1.6 μ M.

8.2 Caracterización de variantes farmacorresistentes

Para determinar la farmacorresistencia de las variantes G y E se realizaron ensayos de viabilidad celular, mediante la técnica de MTT, para determinar la concentración efectiva 50 (EC_{50}) de cada uno de los compuestos, realizándose una comparación entre las células parentales (MCF-7) y las variantes resistentes, con el fin de determinar los valores de EC_{50} (Tabla 1). Se observó un comportamiento particular entre cada una de las variantes, las cuales corresponden a los metabolitos del tamoxifeno (endoxifeno y 4-OH tamoxifeno) y el fulvestrant.

En el caso de la variante E, se encontró un incremento en los valores de EC₅₀ bajo el tratamiento con endoxifeno y 4-OH tamoxifeno comparado con los valores de la línea celular parental (tabla 1), demostrando la resistencia a los compuestos. También se realizó el experimento con fulvestrant, el cual mostró un comportamiento similar, registrándose un incremento en el valor de EC₅₀ de la variante E en comparación con la línea parental (Fig. 5, Tabla 1).

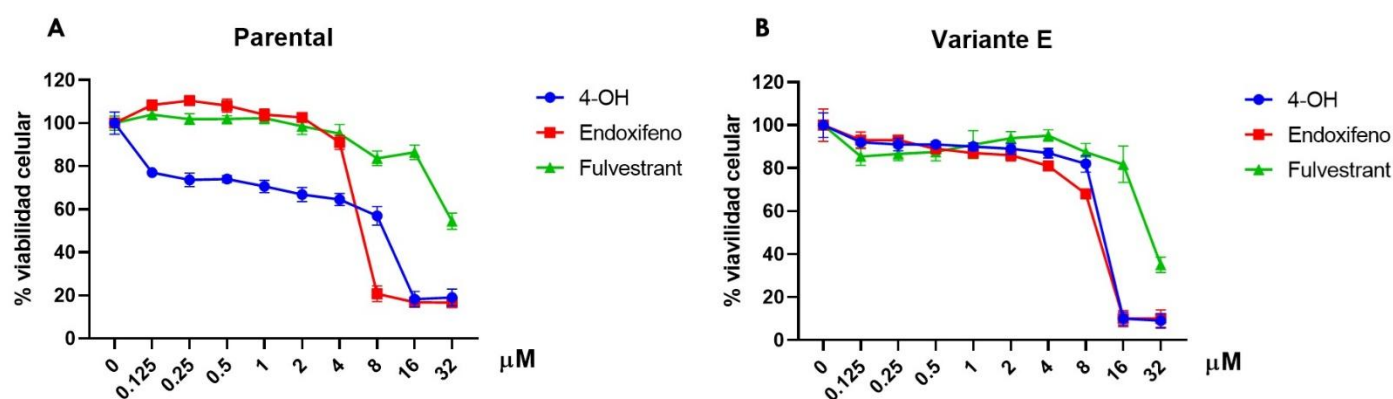


Fig. 5. **Comparación de dosis vs viabilidad celular sobre la línea celular parental y la variante E.** Curvas de viabilidad celular obtenidas bajo diferentes dosis de los endoxifeno 4-OH Tam y fulvestrant. **A)** Se muestran los resultados obtenidos en las células parentales con tratamientos crecientes de 4-OH Tam de color azul, endoxifeno en color rojo y fulvestrant en color verde. **B)** Se muestra la variante E con tratamientos crecientes de 4-OH Tam de color azul, endoxifeno en color rojo y fulvestrant en color verde.

Tabla 1. **Valores de IC₅₀ de las variantes de línea celular MCF-7 bajo tratamientos con endoxifeno, 4-OH tamoxifeno y aurapteno.** Comparación de los valores de EC₅₀ de los diferentes tratamientos con metabolitos derivados del tamoxifeno y fulvestrant.

Variante de Línea celular	Endoxifeno (μM)	4-OH Tam (μM)	Fulvestrant (μM)
MCF-7	5.91 ± 1.75	10.49 ± 0.96	19.81 ± 3.9
MCF-7 ^{Var E}	9.62 ± 0.49	5.91 ± 1.5	29.62 ± 8.7
MCF-7 ^{Var G}	8 ± 6.6	16.35	23.23

La variante G también mostró resultados favorables al obtener la resistencia a fulvestrant y al 4-OH Tam, sin embargo, para el endoxifeno los datos no fueron favorables en la adquisición de la resistencia (Fig. 6), puesto que el resultado obtenido fue similar al de la variante parental (MCF-7). Tomando estos resultados en consideración, se deduce que los mecanismos que inducen a la resistencia son diferentes para ambas variantes, aunque los fármacos tengan el mismo blanco terapéutico.

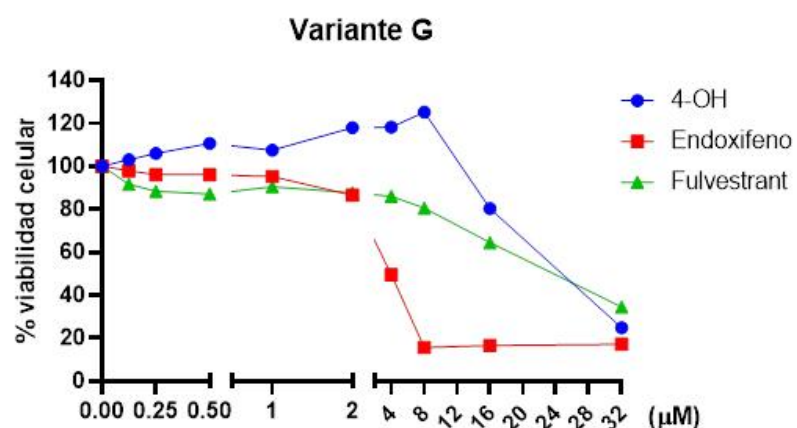


Fig. 6 **Comparación de dosis vs viabilidad celular sobre la variante G.** Se muestra el comportamiento de la variante G con respecto a los diferentes fármacos, así también se observa como en el caso del endoxifeno cae más rápidamente que los otros dos, y en el caso del 4-OH Tam podría incluso estimular el metabolismo de la clona G.

Para comprender parte del mecanismo de resistencia y su relación con el RE, se realizaron ensayos de western blot, donde se caracterizó de manera particular a la variante E ahora denominada como MCF-7^{Var E} junto con la variante parental ahora nombrada como MCF-7. Se utilizaron las siguientes condiciones, 8 μM de cada

uno de los metabolitos del tamoxifeno, con una dosis de 2 μM de estradiol. Con esto se obtuvieron seis condiciones diferentes, enlistadas a continuación: control (sin metabolitos), endoxifeno (8 μM), 4-OH tamoxifeno (8 μM), estradiol (2 μM), endoxifeno (8 μM) + estradiol (2 μM) y 4-OH tamoxifeno (8 μM) + Estradiol (2 μM).

Debido a que las células MCF-7 presentan como característica principal la expresión del RE y a su vez es la proteína blanco de los metabolitos derivados del tamoxifeno, así como el E2, ligando natural del RE, se decidió caracterizar su expresión en las distintas condiciones mencionadas anteriormente. Cabe indicar que el E2 funciona como un regulador crítico de la señalización ER α . Aunque su presencia favorece el crecimiento y la proliferación celular, elucidar los efectos del E2 es crucial para desentrañar las complejidades de la regulación del cáncer de mama ER+ y para desarrollar estrategias terapéuticas.

En condiciones de quimiorresistencia, los metabolitos del tamoxifeno indujeron un aumento de la expresión del RE en las MCF-7^{Var E} en comparación con las células MCF-7 parentales (Fig. 7). Además, el tratamiento combinado con metabolitos derivados del tamoxifeno y E2 mostraron una regulación a la baja de la expresión del receptor de estrógenos α (Fig. 7 B), provocando un daño celular significativo el cual se hace evidente al observar por microscopía (Fig. 8 E, F). Este fenómeno podría estar asociado a la estimulación con E2, al aumentar la actividad celular, potenciando así la eficacia de los metabolitos del tamoxifeno, en los tratamientos combinados. Además, en las células MCF-7^{Var E} resistentes, el efecto combinado del E2 y lo metabolitos del tamoxifeno, redujo significativamente la expresión de ER α (Figura 7A, B) y, en consecuencia, provocaría un efecto citotóxico más potente.

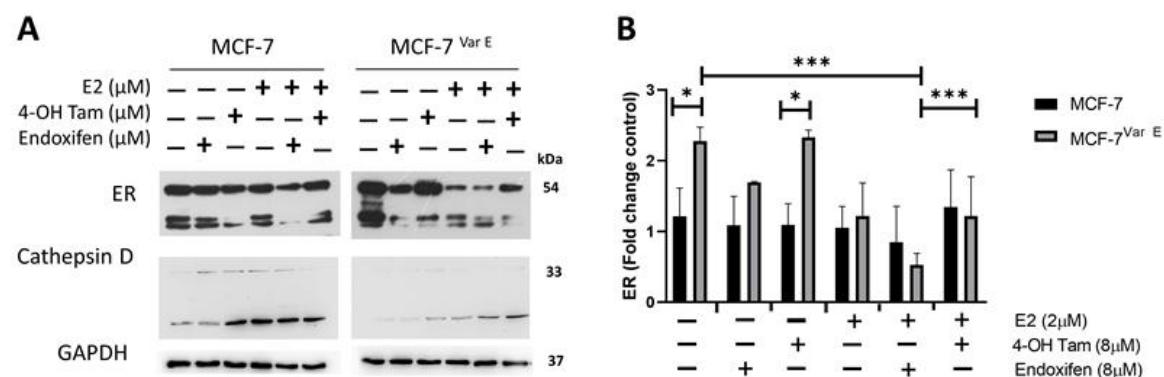


Fig. 7 Expresión del Receptor de Estrógenos y catepsina D. Comparación de células MCF-7 y MCF-7^{Var E} bajo tratamientos con E2, endoxifeno y 4-OH Tam A) Caracterización del RE y Catepsina D entre MCF-7 y MCF-7^{Var E} con los estímulos de endoxifeno (8μM), 4-OH tamoxifeno (8μM) y estradiol (2μM). B) Comparación de la densitometría del receptor de estrógenos entre MCF-7 y MCF-7^{Var E} con los tratamientos de endoxifeno, 4-OH tamoxifeno y estradiol, de manera conjunta. Se reportan las medio ± SD (n = 3) y se expresan como cambio relativo en comparación con el control de carga; * p < 0.05, *** p < 0.001 en comparación con el control mediante anova de dos vías. GAPDH se utilizó como control de carga.

Las células, MCF-7^{Var E} con tratamientos conjuntos de estradiol y los metabolitos del tamoxifeno (endoxifeno, 4-OH tamoxifeno), mostraron un efecto sinérgico al disminuir la proliferación celular, y la expresión del receptor. La combinación del 4-OH tamoxifeno con estradiol fue la más efectiva, comparada con el tratamiento con endoxifeno y estradiol (Fig. 7 B), en periodos de 24 h. El receptor de estrógenos induce un aumento en la proliferación celular, por tanto, al bloquearlo se espera una disminución en este proceso. Sin embargo, de manera conjunta con el estradiol, muestra una pérdida en la expresión del receptor, coincidiendo con lo observado a nivel de microscopía óptica, en donde las células con este tratamiento combinando con 4-OH tamoxifeno y estradiol presentaron una mayor afectación (Fig. 8).

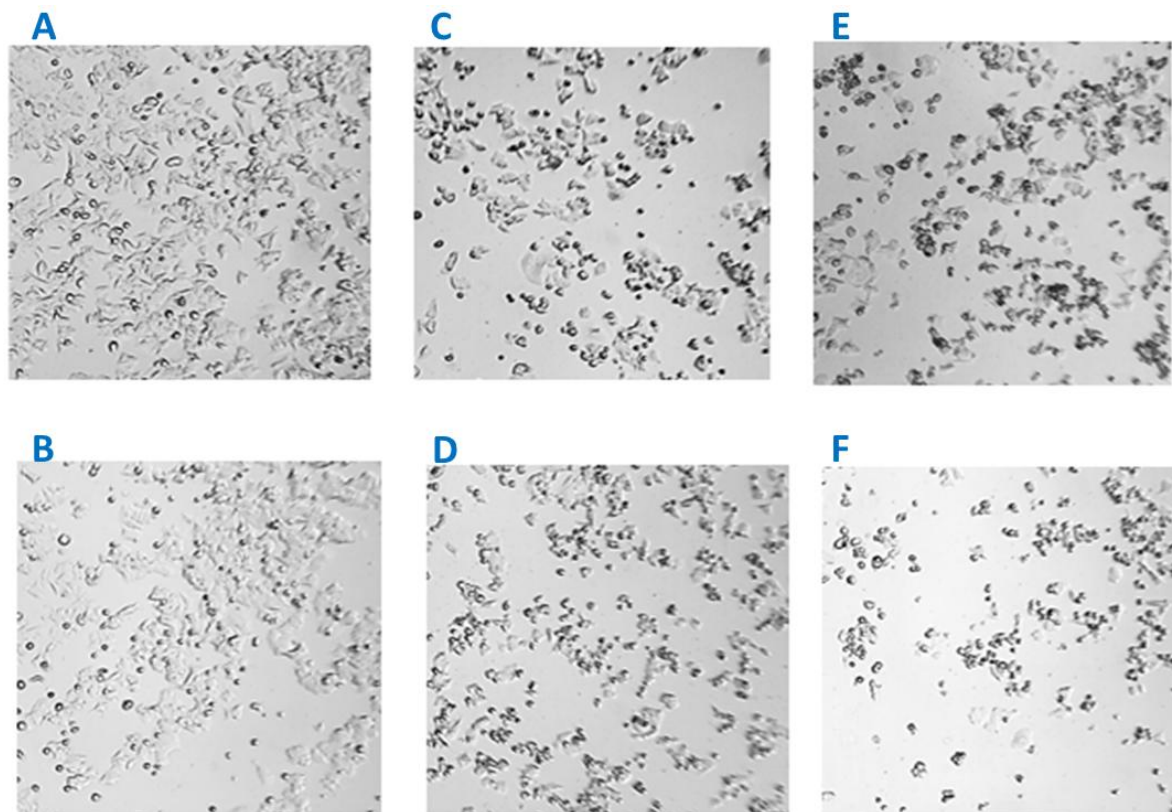


Fig. 8 Imagen de Microscopía Óptica de la línea celular MCF-7 con tratamientos de E2, endoxifeno, 4-OH Tam, Comparación de células MCF-7 bajo diferentes tratamientos con 12 horas de tratamiento, objetivo 10 X. A) Muestra sin tratamiento. B) Tratamiento con E2. C) Tratamiento con endoxifeno. D) Tratamiento con 4-OH Tam. E) Tratamiento conjunto de E2 con endoxifeno. F) Tratamiento conjunto de E2 con 4-OH Tam.

8.3 Los componentes del complejo eIF4F a través del tratamiento con metabolitos derivados de tamoxifeno más E2.

Los componentes proteicos del complejo eIF4F, son esenciales para el inicio de la traducción de proteínas. Para determinar el papel del complejo eIF4F en la farmacoresistencia, caracterizamos su expresión en las líneas celulares MCF-7 y MCF-7^{Var E}. En primer lugar, se observó a eIF4A, que es una proteína helicasa de ARN, donde las células MCF-7^{Var E} mostraron niveles aumentados en su expresión comparado con las células parentales MCF-7, este fenómeno puede ser atribuido a la resistencia a los fármacos (Figura 9 A, B). No obstante, los niveles de eIF4A aumentaron en las células MCF-7 al ser tratadas con E2 en

comparación con el control. En contraste, las células MCF-7^{Var E} mostraron una disminución de la expresión de eIF4A tras el tratamiento con E2, sugiriendo que E2 tiene un efecto diferencial en ambas variantes celulares. De igual manera, los niveles de eIF4A se mantuvieron estables a pesar del tratamiento concomitante con metabolitos derivados de tamoxifeno y E2 (Figura 9 A, B).

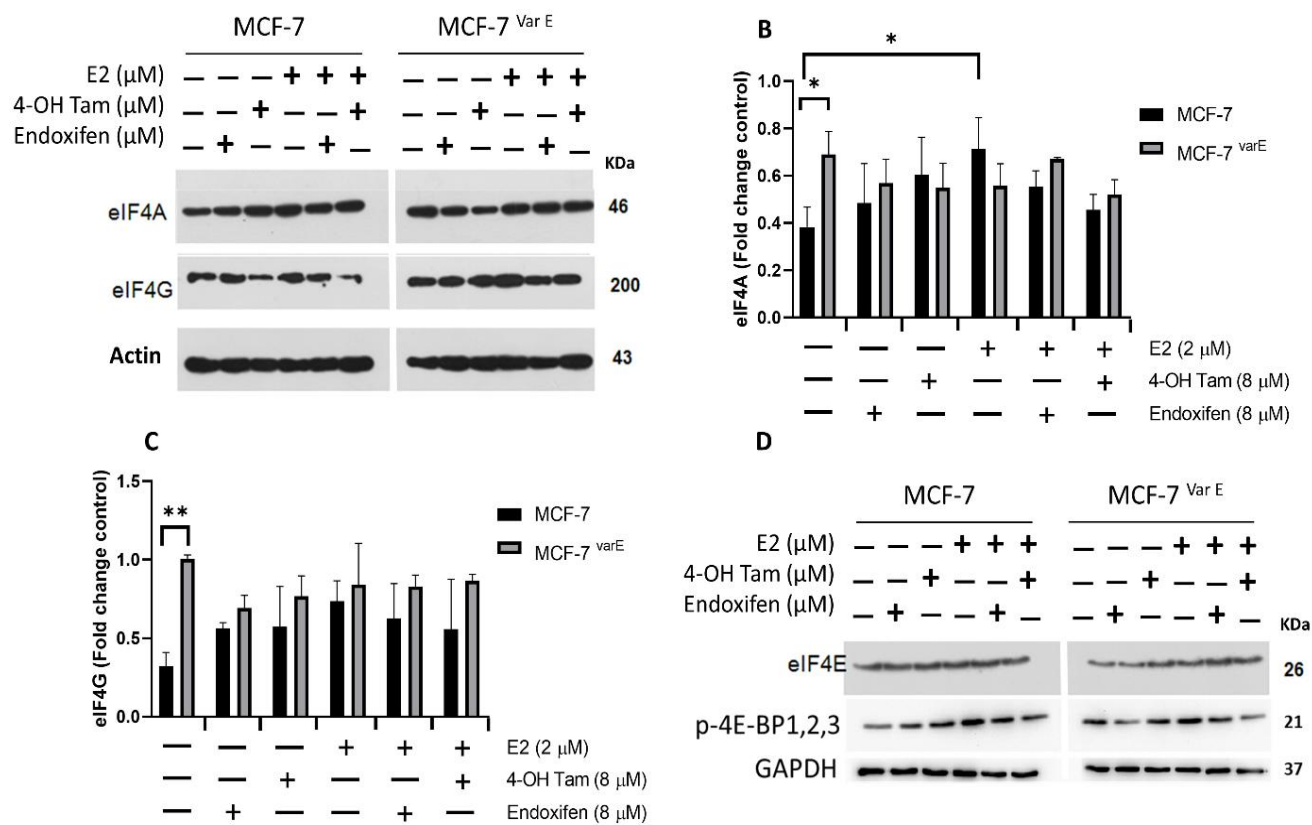


Fig. 9 **Caracterización del complejo eIF4F utilizando como tratamiento las moléculas del tamoxifeno y E2.** A) Caracterización de eIF4A y eIF4G con tratamientos de E2, endoxifeno y 4-OH tamoxifeno. B) Análisis densitométrico de eIF4A, mostrando la significancia entre el MCF-7 y MCF^{Var E}. C) Análisis densitométrico de eIF4G, mostrando la significancia entre el MCF-7 y MCF^{Var E}. D) Caracterización de eIF4E y p-4E-BP1,2,3 con tratamientos de E2, endoxifeno y 4-OH tamoxifeno. Los resultados se reportan como media ± DE (n = 3) y se expresan como cambio relativo en comparación con el control de carga; * p < 0.05, *** p < 0.001 en comparación con el control. GAPDH y Actina se utilizaron como control de carga.

La regulación de la expresión de eIF4E es crucial, siendo las proteínas 4E-BP las que modulan su actividad al unirse a eIF4E e inhibiendo la formación del complejo eIF4F. De manera particular, en las células MCF-7, la expresión de eIF4E se mantuvo sin cambios a pesar de los estímulos de los metabolitos de tamoxifeno (Fig. 9 D). Además, en las células MCF-7^{Var E}, la expresión de eIF4E aumentó con los tratamientos combinados (Fig. 9 D). Además, el estado de fosforilación de p-4E-BP1, 2 y 3 sugiere una posible incorporación de eIF4E en el complejo eIF4F, lo que probablemente lo vuelve más activo en las células MCF-7^{Var E} (Fig. 9 D).

La evidencia sugiere un mecanismo compensatorio para mantener la actividad del complejo al aumentar potencialmente la expresión de eIF4G y eIF4A. Además, la expresión del factor de traducción se mantiene a pesar de los tratamientos con los metabolitos del tamoxifeno y de forma conjunta con E2. Por lo tanto, eIF4A podría permanecer unido al complejo eIF4F y cumplir su función, una característica particular de las células resistentes MCF-7^{Var E}. Esto nos lleva a buscar estrategias para la regulación del complejo eIF4F, específicamente eIF4A y ER α , mediante la inhibición con compuestos naturales, como las cumarinas.

8.5 Efecto celular de las moléculas reguladoras.

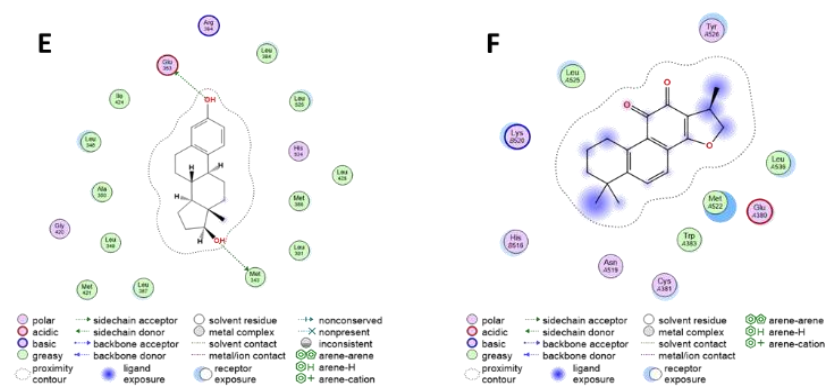
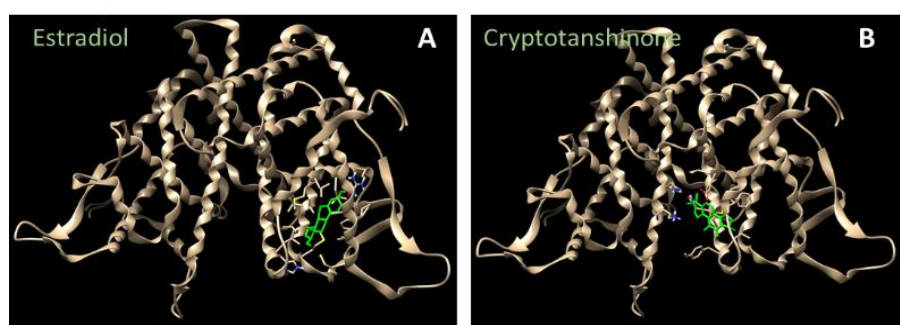
Se utilizaron dos moléculas derivadas de productos naturales, la criptotanshinona, un diterpeno que se obtiene de las plantas del género *salvia*, y el aurapteno, una preniloxicumarina, obtenida de las plantas del género *Citrus*. Sin embargo, aún se desconocen su posible interacción con el complejo eIF4F en un modelo de cáncer de mama RE+. Por lo tanto, se realizaron ensayos de viabilidad celular para establecer las concentraciones que se utilizarían en ensayos posteriores, mediante el conocimiento de los valores de IC₅₀, y conocer el comportamiento diferencial de las células MCF-7 y MCF-7^{Var E}.

Además, de forma complementaria se realizaron experimentos de docking molecular, para conocer si las moléculas naturales (aurapteno y criptotanshinona) podrían interaccionar con el ER α , así como con eIF4A, parte esencial del

complejo eIF4F.

8.5.1 Caracterización de la unión de la criptotanshinona con el RE.

Se realizó un ensayo complementario de docking molecular para comparar las posiciones de unión de la criptotanshinona (Cry) y los metabolitos del tamoxifeno, junto con su ligando natural, el estradiol (E2). Los valores de afinidad obtenidos, o E Score, fueron los siguientes: -5.60 kcal/mol para estradiol, -6.45 Kcal/mol para criptotanshinona, -7.81 kcal/mol para endoxifeno y -7.29 kcal/mol para 4-OH tamoxifeno. Cabe destacar que la afinidad fue mayor para criptotanshinona (Cry) y los metabolitos del tamoxifeno en comparación con el estradiol (Fig. 10), debido a que a menor valor tiene una mayor afinidad. Además, el sitio de unión se encuentra en la misma región de interacción que el estradiol, lo que sugiere una competencia por el sitio de unión a ligando del receptor de estrógeno (ER), provocando la inhibición de su función.



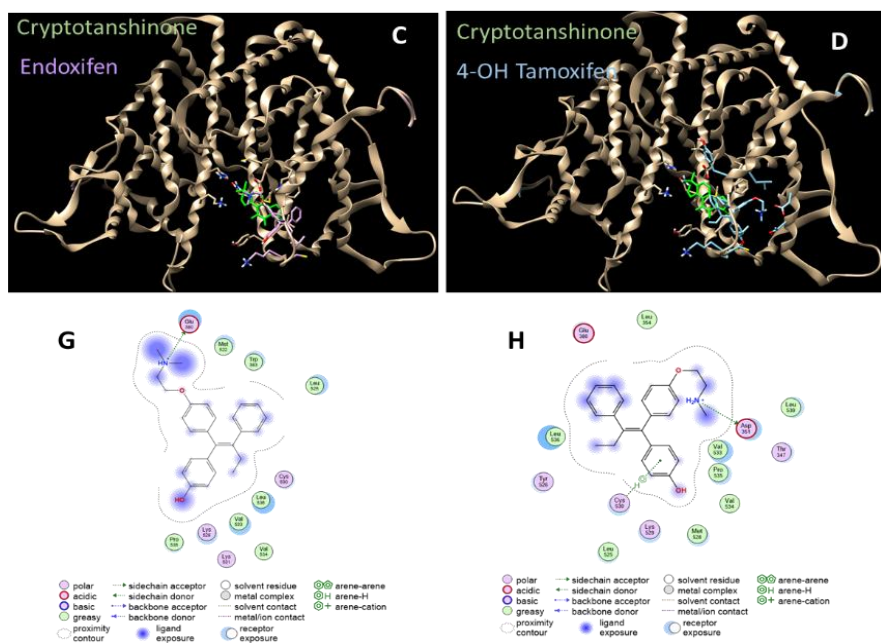


Fig. 10 **Comparación de docking molecular del receptor de estrógeno.** Cristal del receptor de estrógenos en color beige (PDB: 3ERT). A) Cristal del receptor de estrógeno más estradiol en color verde. B) Cristal del receptor de estrógeno más criptotanshinona en color verde. C) Cristal del receptor de estrógeno más criptotanshinona (Verde) y endoxifeno (Morado) en el sitio de interacción. D) Cristal del receptor de estrógeno más criptotanshinona (Verde) y 4-OH tamoxifeno (Azul). E) Interacción del ligando criptotanshinona, muestra los residuos y el tipo de interacción. F) Interacción del ligando criptotanshinona, muestra los residuos y el tipo de interacción. G) Interacción del ligando endoxifeno, muestra los residuos y el tipo de interacción. H) Interacción del ligando 4-OH tamoxifeno, muestra los residuos y el tipo de interacción.

Es importante señalar que la criptotanshinona comparte la interacción con aminoácidos del RE tanto con el endoxifeno como con el 4-OH tamoxifeno, los que incluyen al Glu-380, Leu-536 y Leu-525. En particular, con el endoxifeno también comparte Met-522, mientras que con el 4-OH tamoxifeno comparte Tyr-526. Esto implica que la criptotanshinona podría exhibir una actividad similar a la de los metabolitos del tamoxifeno.

La evidencia del docking molecular proporciona información consistente de la afinidad de la criptotanshinona y los metabolitos del tamoxifeno por el receptor de estrógeno (ER). En consecuencia, los resultados sugieren que la criptotanshinona podría tener un efecto sensibilizador sobre RE.

8.5.2 Caracterización de la actividad de la criptotanshinona sobre el factor eIF4A.

La criptotanshinona puede modular la traducción de ARNm específicos al inhibir la actividad helicasa de eIF4A, afectando la síntesis de proteínas involucradas en el crecimiento celular y la supervivencia entre otros procesos celulares. Para entender mejor el proceso de unión entre eIF4A y la criptotanshinona, se sobreexpresó y purificó la proteína eIF4A utilizando la cepa *E. coli* Rosetta Star (Fig. 11 A-B), de la cual se obtuvo una fracción enriquecida de eIF4A purificada (Fig. 11 C).

Una vez obtenida la proteína, se realizó un ensayo de unión entre eIF4A y Cry (eIF4A 4 μ M, Cry 50-100 μ M), que fue caracterizado por fluorescencia mediante un escaneo sincrónico (Fig. 11 D). Los resultados obtenidos sugieren una interacción entre eIF4A y Cry a diferentes concentraciones, debido a un cambio en el espectro de emisión, los cuales fueron ajustados restando la línea base. En contraste, no se observó una disminución en la actividad ATPasa, la cual se evaluó en un gel de nitrato de plomo, donde la actividad ATPasa se mantuvo, incluso en concentraciones altas; resultado que podría asociarse al sitio de interacción entre la Cry y eIF4A.

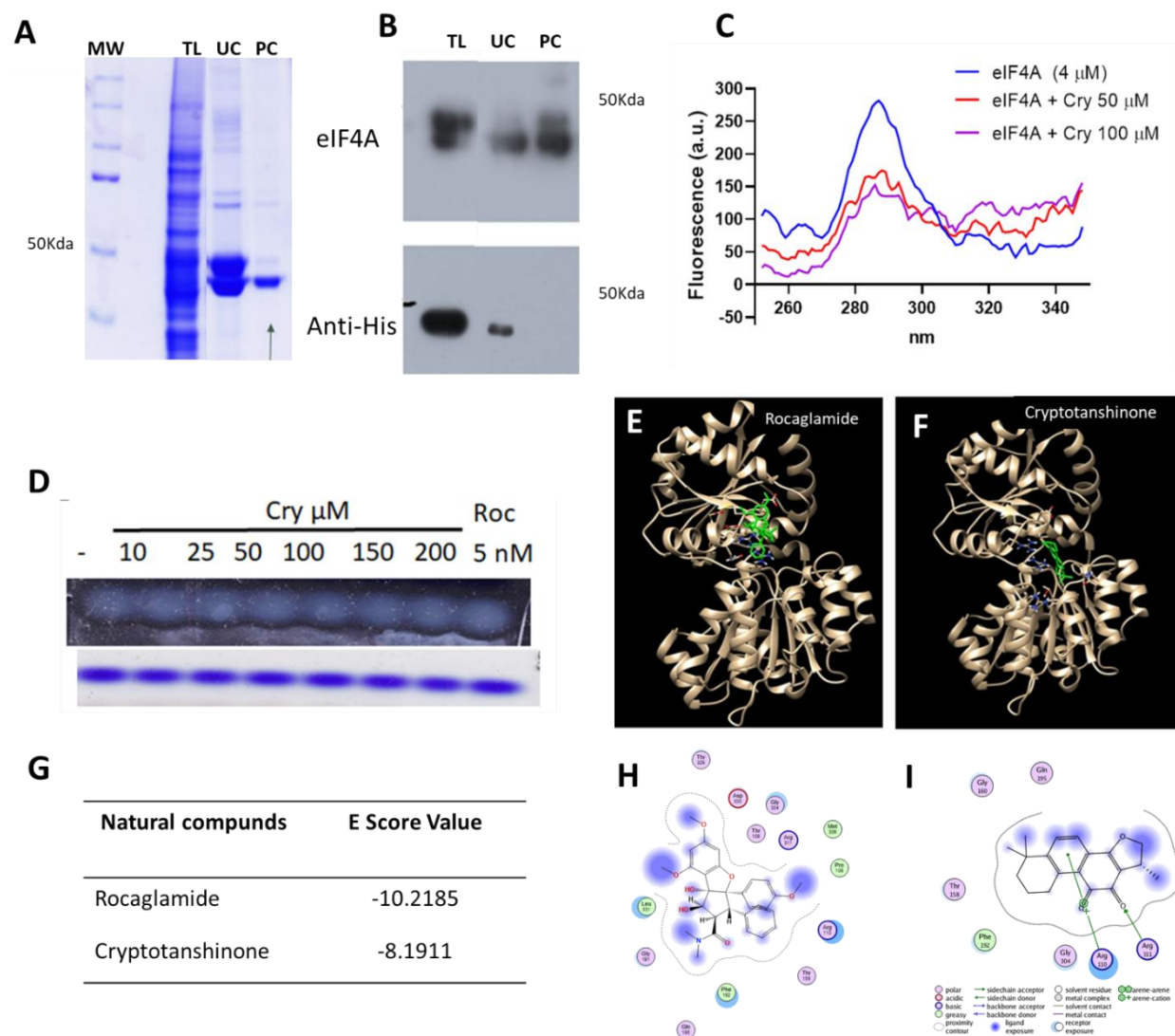


Fig. 11 Efecto de la cryptotanshinona en la regulación de eIF4A. A) SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones purificadas de eIF4A, correspondientes a: TL (lisado total), UC (proteína con tag de histidinas) y PC (proteína sin tag de histidinas). B) Inmunodetección de las fracciones con sobreexpresión de eIF4A utilizando anticuerpos específicos para eIF4A y otra para el tag de histidinas. C) Ensayo de fluorescencia de eIF4A y cryptonashinona, mostrando los espectros de emisión de fluorescencia de eIF4A, eIF4A con 50 μ M de Cry y eIF4A con 100 μ M de cry, en azul, rojo y violeta, respectivamente. D) Ensayo de actividad ATPasa en gel de acrilamida con nitrato de plata, en concentraciones crecientes de cry 10-200 μ M y control de rocaglamida. E) docking molecular de rocaglamida en el sitio de unión al ARN de eIF4A (PDB ID: 5ZC9), donde eIF4A se muestra en beige y la rocaglamida en verde. F) Docking molecular de cry en el sitio de interacción con ARN de eIF4A, con eIF4A en beige y aurapteno en verde. G) Valores de E score obtenidos para cada molécula en el docking molecular. H) Interacciones ligando-proteína entre rocaglamida y eIF4A, mostrando los residuos y tipos de interacción. I) Residuos de unión de cry y eIF4A y naturaleza de las interacciones.

En este sentido, el docking molecular mostró que el sitio de unión de Cry se encuentra en la región de interacción ARN-eIF4A (PDB ID: 5ZC9) (Fig. 11 E), mostrando ser la misma región de interacción que la rocaglamida, la cual se ha descrito como un inhibidor de eIF4A (Shintaro Iwasaki *et al.*, 2019). Para evidenciar este resultado, se realizó un docking molecular tomando a la rocaglamida como control y se comparó con la Cry. Resultó que la afinidad de la criptotanshinona es menor que la rocaglamida (Fig. 11 G), sin embargo, el sitio de unión sugiere que la Cry podría bloquear la interacción ARN-eIF4A, ya que comparten algunos residuos de interacción con la rocaglamida, como lo son Arg-110, Arg-311, Phe-192 y Gly-304 (Fig. 11 E, F, H, I). Además, tomando en cuenta el ensayo de actividad ATPasa, así como el docking molecular, la rocaglamida tampoco mostró disminución de la actividad ATPasa, debido a que su sitio de unión de este compuesto se encuentra en la región de unión al ARN (Fig. 11 E), efecto que también estaría presente con la criptotanshinona (Fig. 11 F).

8.5.3 Sensibilización de la criptotanshinona sobre las células RE+

Se realizaron ensayos de viabilidad celular para comparar el comportamiento de las células MCF-7 y su contraparte resistente, MCF-7^{Var E}.

Se utilizaron las células MCF-7, empleando concentraciones crecientes desde 0 hasta 10 μM de criptotanshinona, (Fig. 12 A, B), basado en reportes previos (Wu *et al.*, 2020b). También se evaluó a la cry en conjunto con los metabolitos derivados del tamoxifeno (endoxifeno y 4-OH tamoxifeno) a una concentración fija de 8 μM , para observar si estos metabolitos pueden potenciar su efecto. De manera interesante, se logró observar un efecto sinérgico en el tratamiento combinado de cry con los metabolitos del tamoxifeno. Se observó que la interacción de los metabolitos del tamoxifeno con la criptotanshinona redujo drásticamente la viabilidad celular en concentraciones que previamente la Cry no había mostrado efecto. El efecto sinérgico con 4-OH tamoxifeno se logró observar a una concentración de 10 μM de criptotanshinona, mientras que con endoxifeno fue a 5 μM , lo que indica una mayor sinergia con este metabolito (Fig.

12 C, D).

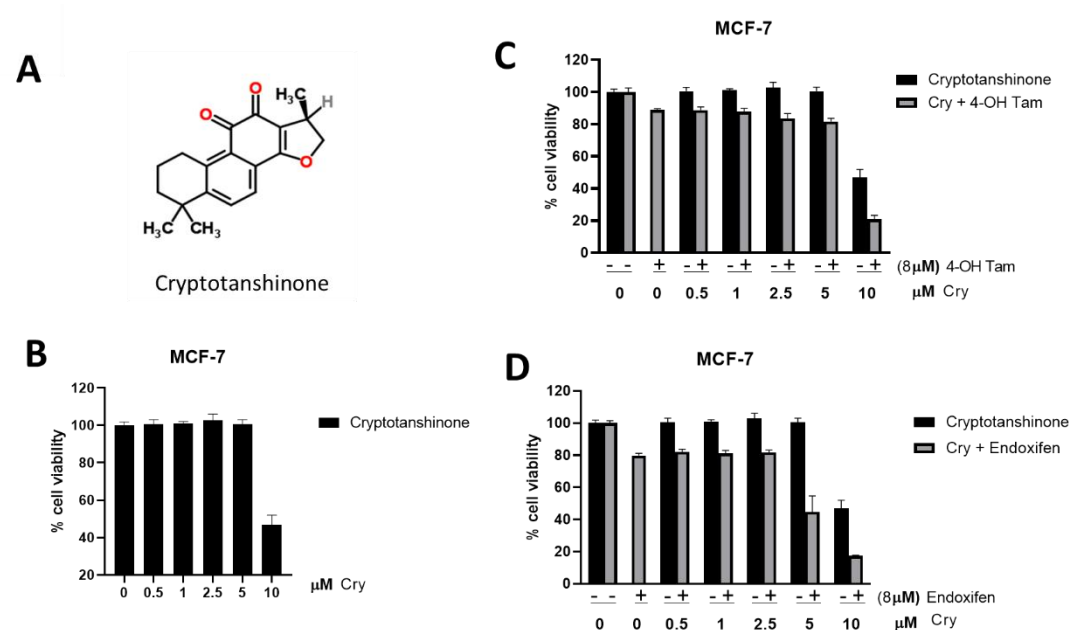


Fig. 12 **Viabilidad celular de las células MCF-7 con tratamientos de cryptotanshinona.** Comparación entre tratamientos con cryptotanshinona y combinado con metabolitos de tamoxifeno. A) Molécula de criptotanshinona. B) Porcentajes de viabilidad de células MCF-7 tratadas con cry en concentraciones crecientes 0-10 μM, C) Porcentajes de viabilidad de cry con 4-OH Tam. D) Porcentajes de viabilidad de cry con endoxifeno. Los resultados para cry se presentan en columnas negras y cry con metabolitos de tamoxifeno en gris.

Tomando en cuenta los resultados anteriores se llevó a cabo la misma estrategia para la variante resistente MCF-7^{Var E} (Fig. 13). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con criptotanshinona (10 μM) induce un fenómeno de sensibilización en las MCF-7^{Var E} tanto con 4-OH tamoxifeno (Fig. 13 A, B) como con endoxifeno (Fig. 13 C). Sin embargo, la criptotanshinona en conjunto con el endoxifeno induce una mayor sensibilidad sobre las células MCF-7^{Var E}, puesto que la disminución de la viabilidad celular sucede en la concentración de 5 μM (Fig. 13 C), mostrando un resultado similar en las células MCF-7, de tal manera que este efecto es independiente si presentan o no farmacoresistencia.

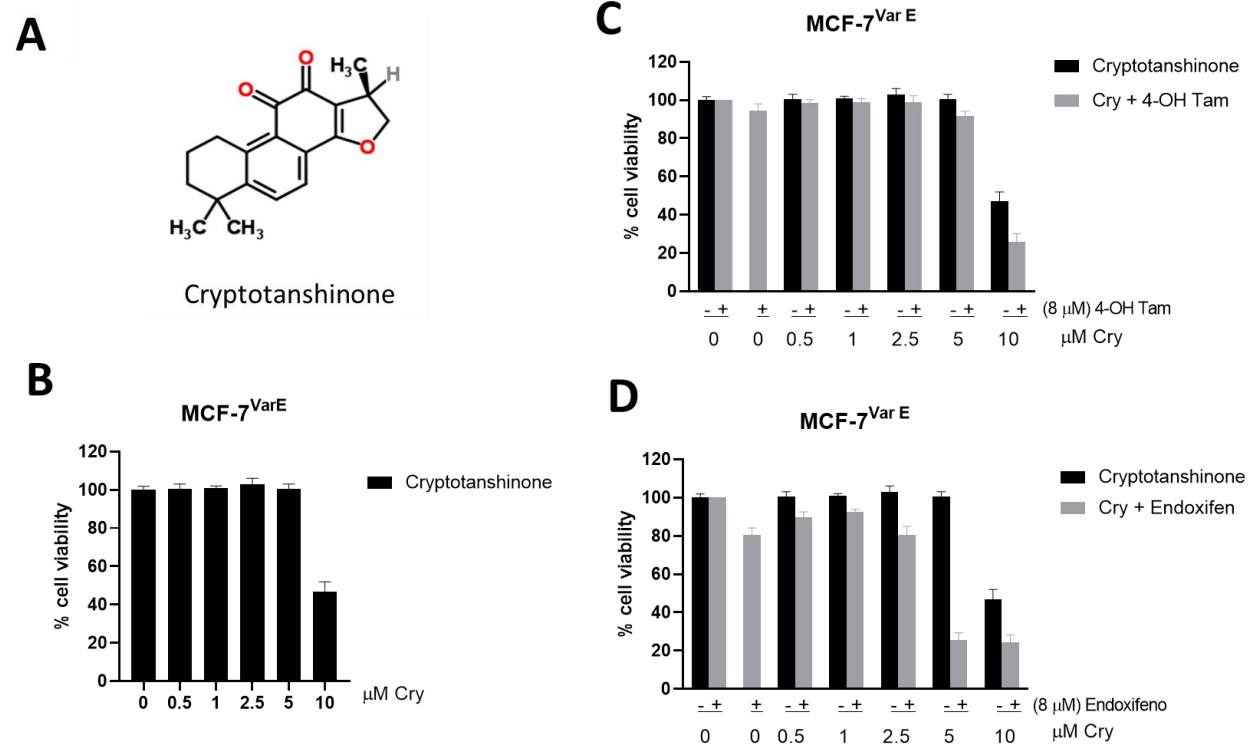


Fig. 13 Viabilidad celular de las células MCF-7^{VarE} con tratamientos crecientes de Cryptotanshinona y en combinación con metabolitos del tamoxifeno. Comparación entre tratamientos con cryptotanshinona y combinado con metabolitos de tamoxifeno. A) Molécula de cryptotanshinona. B) Porcentajes de viabilidad de células MCF-7 tratadas con cry en concentraciones crecientes 0-10 μM, C) Porcentajes de viabilidad de cry con 4-OH Tam. D) Porcentajes de viabilidad de cry con endoxifeno. Los resultados para cry se presentan en columnas negras y cry con metabolitos de tamoxifeno en gris.

8.5.4 Regulación de eIF4A por aurapteno.

Según nuestros resultados, el aurapteno podría interrumpir el proceso de traducción a través de la inhibición de eIF4A, lo que afectaría la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento celular, la supervivencia y, potencialmente, la quimiorresistencia. Para confirmar la unión *in vitro* entre el aurapteno y eIF4A, se sobre expresó y purificó eIF4A recombinante a partir de cultivos de la cepa Rosetta Star de *E. coli* (Fig. 14 A, B). Los resultados mostraron una disminución significativa en la fluorescencia durante la interacción entre eIF4A (14 μM) y el aurapteno en concentraciones de 50 μM y 100 μM , debido a una reducción en la intensidad de emisión, lo que sugiere un fenómeno de extinción (quenching) y, por lo tanto, la unión del aurapteno hacia la proteína eIF4A (Fig. 14 C).

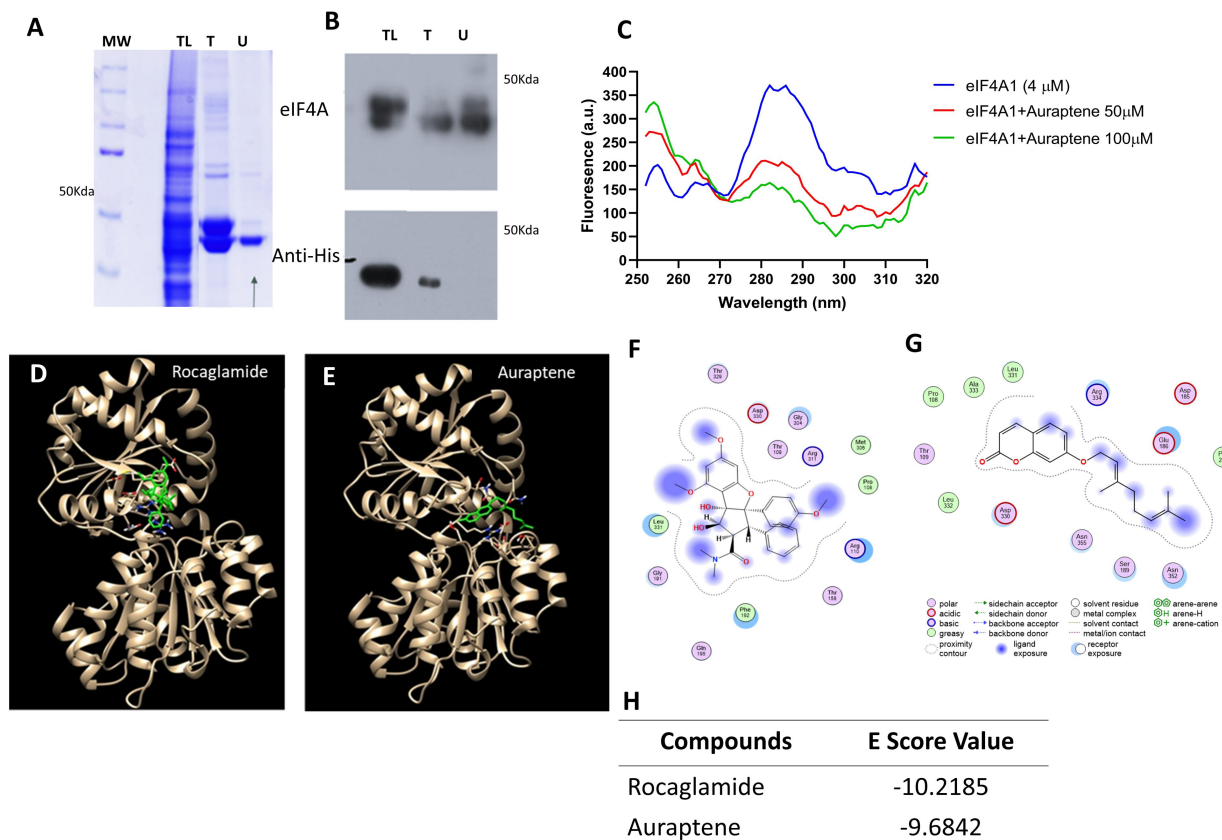


Fig. 14 **Efecto de aurapteno en la regulación de eIF4A.** A) SDS-PAGE teñido con Coomassie de las fracciones purificadas de eIF4A correspondientes a TL: lisado total, T: proteína con tag de histidinas, y U: proteína sin tag de histidina. B) Inmunodetección para las fracciones de sobreexpresión de eIF4A. Se utilizaron anticuerpos para detectar eIF4A y tag de polihistidina. C) Ensayo de fluorescencia de eIF4A y aurapteno. Los espectros de emisión de fluorescencia de eIF4A, eIF4A más 50 μM de aurapteno, y eIF4A más 100 μM de aurapteno se muestran en azul, rojo y verde, respectivamente. D) Acoplamiento de rocaglamida en el sitio de unión al ARN de eIF4A (ID PDB: 5ZC9). eIF4A se muestra en beige y rocaglamida en verde. E) Acoplamiento de Aurapteno en el sitio de interacción de eIF4A con ARN. eIF4A se muestra en beige y el aurapteno en verde. F) Interacciones ligando-eIF4A de rocaglamida, mostrando los residuos y el tipo de interacción. G) Residuos de unión de aurapteno-eIF4A y la naturaleza de la interacción con las moléculas. H) Valores de la puntuación E obtenidos para cada molécula en la simulación de acoplamiento molecular.

Los resultados de docking molecular sugieren que el aurapteno se puede unir a eIF4A cerca del sitio de unión de la rocaglamida, lo cual se probó en diferentes protocolos de docking molecular, en los cuales se encontraron posiciones de unión altamente puntuadas de aurapteno cerca del sitio de unión al ARN. Además, comparte residuos de interacción importantes con la rocaglamida, como Asp330, Leu331, Pro108 y Thr109 (Fig. 1 4D-G). El valor del E-score para

el aurapteno fue de -9.68 kcal/mol, cercano al de la rocaglamida, que fue de -10.21 kcal/mol (Fig. 4H). Finalmente, la función de puntuación de Vina permitió identificar una conformación del aurapteno en la que el oxígeno de la lactona forma enlaces de hidrógeno con Arg334 (Fig. 15), de tal manera que esta interacción del aurapteno podría interrumpir la actividad de eIF4A.

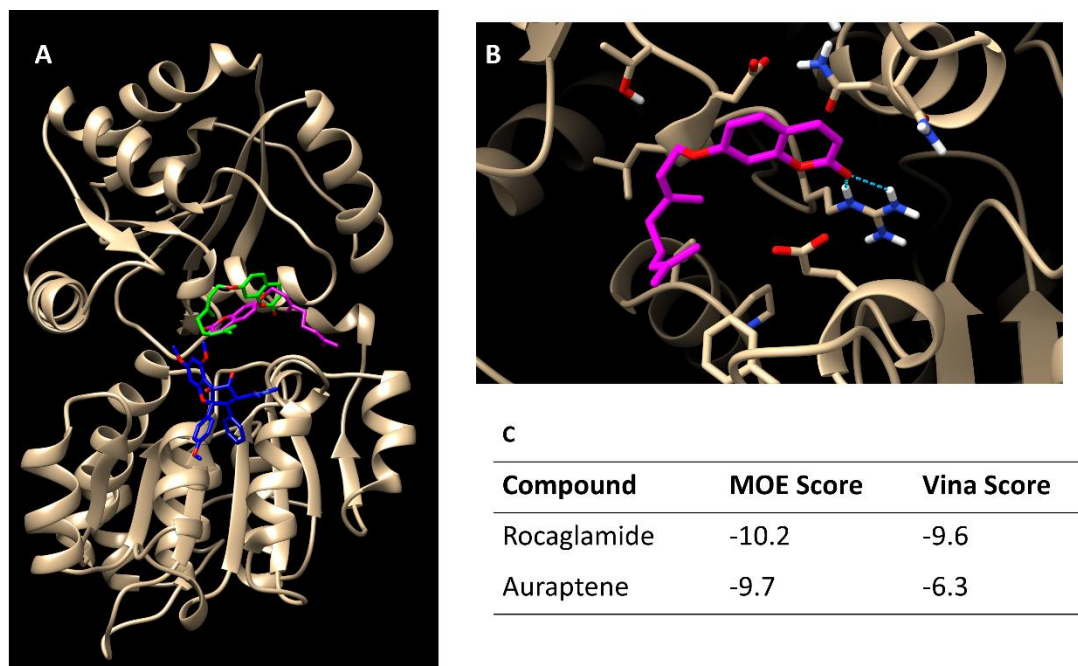


Fig. 15 **Docking molecular de Aurapteno y rocaglamida sobre eIF4A.** A) Cristal de eIF4A (ID PDB: 5ZC9), se muestra en color verde aurapteno obtenido por docking con MOE, en magenta aurapteno con Vina, y azul rocaglamida proveniente del cristal. B) Sitio de interacción del aurapteno sobre el cristal de eIF4A. C) Valores de afinidad con MOE y Vina en kcal/mol.

8.5.5 Sensibilización del aurapteno sobre las células RE+

Se propuso investigar los efectos del aurapteno en las células MCF-7^{Var E} y MCF-7 para evaluar posibles efectos con los metabolitos activos del tamoxifeno. Se emplearon concentraciones por debajo de sus valores de EC₅₀ (Fig. 16 A, D) y metabolitos activos de tamoxifeno, endoxifeno y 4-OH Tam, a una concentración fija de 8 μM (Fig. 16).

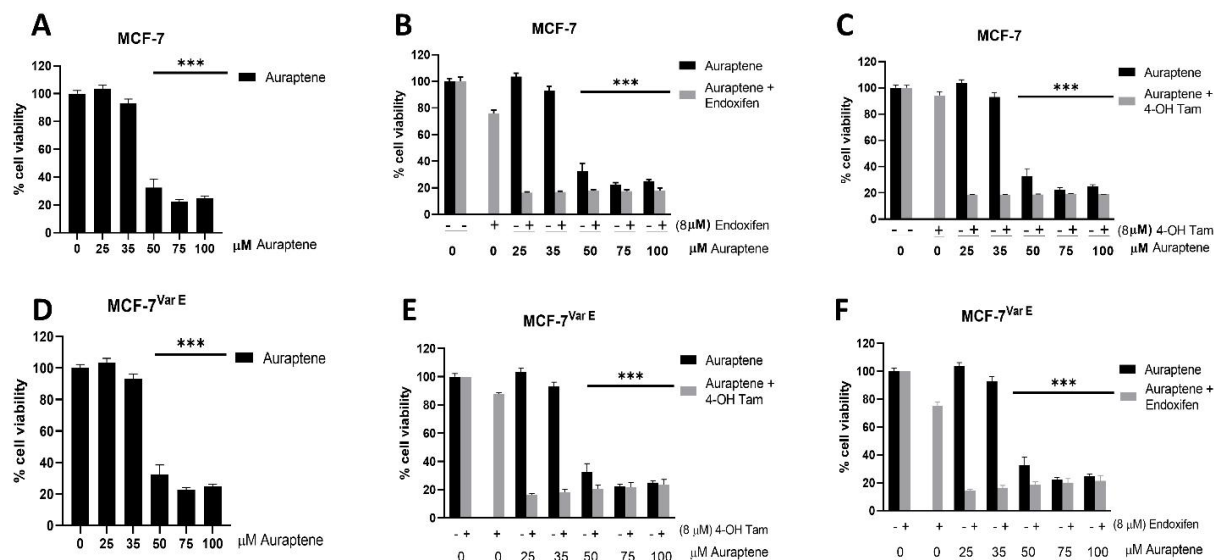


Fig. 16 **Viabilidad celular de células MCF-7 y MCF-7^{Var E} con tratamientos de aurapteno.** Comparación de tratamientos con aurapteno y aurapteno más metabolitos de tamoxifeno. Porcentajes de viabilidad de las células MCF-7 bajo tratamientos con aurapteno (A), aurapteno y 4-OH tamoxifeno (B), y aurapteno y endoxifeno (C). Los resultados de aurapteno y aurapteno más metabolitos de tamoxifeno se muestran en columnas negras y grises, respectivamente. Porcentajes de viabilidad de las células MCF-7^{Var E} bajo tratamientos con aurapteno (D), aurapteno y 4-OH tamoxifeno (E), y aurapteno y endoxifeno (F). Los resultados de aurapteno y aurapteno más metabolitos de tamoxifeno se muestran en columnas negras y grises, respectivamente. Los resultados se reportan como media \pm DE (n = 3); ***p<0.0001 en comparación con el control utilizando ANOVA de 2 vías.

Los resultados revelaron que el aurapteno puede reducir significativamente la viabilidad celular a partir de una concentración de 50 μ M en ambas líneas celulares, MCF-7 y MCF-7^{Var E} (Fig. 16 A-D). Posteriormente, se realizaron tratamientos combinados de aurapteno con los metabolitos del tamoxifeno. De manera interesante, el aurapteno mostró un efecto sinérgico con 4-OH Tam (Fig. 16 B, E) y endoxifeno (Fig. 16 C, F), lo que resultó en una reducción significativa de la viabilidad celular en ambas líneas, MCF-7 y MCF-7^{Var E}. De manera interesante, el efecto fue observado incluso en la concentración más baja de aurapteno (25 μ M), lo que resalta el potencial de un tratamiento combinado con aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno.

Aun cuando las células presentaban un fenotipo resistente, se observó un posible

efecto terapéutico en las células MCF-7^{Var E}. Al modular una vía de señalización clave involucrada en los mecanismos de resistencia a los fármacos, el aurapteno mostró el potencial de mejorar la eficacia de los tratamientos convencionales en células de cáncer de mama RE+. Es importante destacar que los tratamientos combinados demostraron ser efectivos tanto en las células MCF-7 como en la variante resistente MCF-7^{Var E} lo cual también se observó utilizando microscopía óptica (Fig. 17), mostrando un mayor daño en las células que presentaron tratamientos combinados entre el aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno. Sin embargo, este tratamiento podría ser específico para el cáncer de mama RE+. Por lo tanto, se evaluó este efecto en otro subtipo molecular de cáncer de mama.

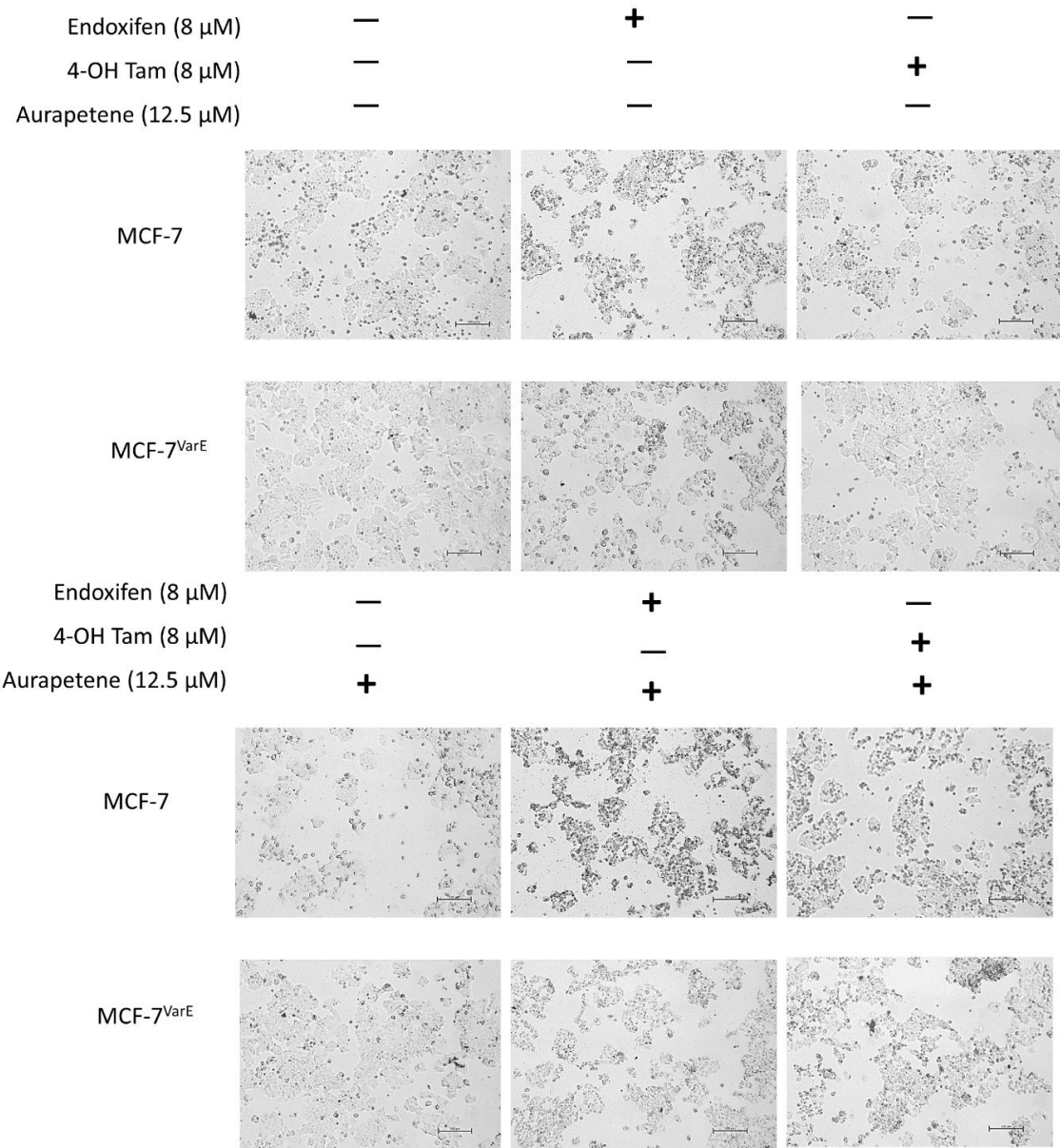


Fig. 17 **Microscopia óptica de los tratamientos con endoxifeno, 4-OH Tam, y aurapteno.** Se muestran imágenes a 10X de los efectos causados con cada uno de los tratamientos utilizados, endoxifeno (8 μM), 4-OH Tam (8 μM), aurapteno (12.5 μM), tratamientos combinados endoxifeno y aurapteno, así como 4-OH Tam bajo las mismas concentraciones.

8.5.6 Especificidad del aurapteno en células de cáncer de mama ER+

Para aclarar si los efectos de los tratamientos combinados de aurapteno con los metabolitos derivados del tamoxifeno son específicos para las células de cáncer de mama RE+ (receptor de estrógeno positivo), se evaluó en un modelo de células de cáncer de mama triple negativo (TNBC) que carece de expresión de receptores hormonales, siendo la línea celular MDA-MB-231 (MDA) la que presenta las principales propiedades fenotípicas del cáncer TNBC. Dentro de lo encontrado, la línea celular MDA mostró una mayor tolerancia al aurapteno en comparación con las líneas celulares MCF-7 y MCF-7^{VarE}, con una viabilidad del 80 % a una concentración de 35 μ M de aurapteno (Fig. 18).

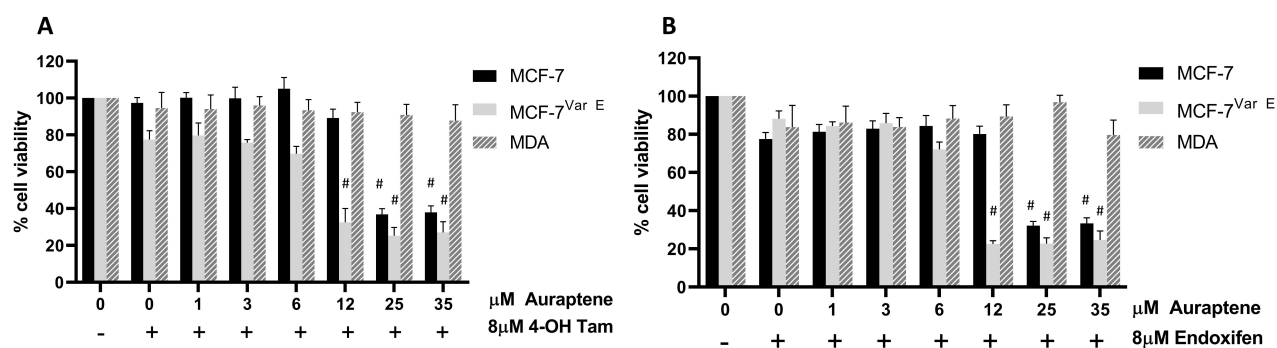


Fig. 18 **Tratamientos con aurapteno y mezcla de aurapteno más metabolitos de tamoxifeno en variantes de células ER+ y ER-**. Los porcentajes comparativos de viabilidad celular de células MCF-7, MCF-7^{VarE} y MDA-MB-231 se muestran en negro, gris claro y gris con patrón, respectivamente, bajo dosis crecientes de aurapteno más 4-OH Tam 8 μ M (A) y endoxifeno 8 μ M (B). Los resultados se reportan como media \pm DE (n = 3); # p<0.0001 en comparación con el control.

Para determinar la concentración mínima de aurapteno en la que se registrara una sinergia entre aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno, se utilizaron concentraciones bajas de aurapteno (0-35 μ M) y una concentración fija (8 μ M) de los metabolitos de tamoxifeno (Fig. 18). Los resultados sugieren un efecto sensibilizador en ambas variantes de células RE+, MCF-7 y MCF-7^{VarE}, principalmente bajo el tratamiento con 4-OH Tam (Fig. 18, Tabla 2). En contraste,

las células triple negativas mostraron una mayor tolerancia a los tratamientos conjuntos (Fig. 18, Tabla 2).

Tabla 2. Valores de EC₅₀ para células ER+ y TNBC bajo tratamientos con aurapteno y metabolitos de tamoxifeno. Valores de los tratamientos combinados en diferentes variantes celulares.

Línea celular	Características	Aurapteno (μM)	Aurapteno+ 4-OH Tam (μM)	Aurapteno+ Endoxi (μM)
MCF-7	RE+	47.49	12.69	13.34
MCF-7^{Var E}	Resistente	52.4	8.53	6.47
MDA	TNBC	76.75	80.65	52.68

Ambas variantes de MCF-7 mostraron sinergia con el aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno, lo que se corrobora con los valores de EC₅₀ más bajos cuando las células fueron tratadas con aurapteno y los metabolitos de tamoxifeno. Se obtuvo un resultado de sinergia, en el que los valores de EC₅₀ fueron casi 4 veces menores en comparación a las células tratadas solo con aurapteno (Fig. 18, Tabla 2). Mostrando un efecto de sinergia fue más potente en las células MCF-7^{Var E}, debido a que redujeron el valor de EC₅₀ casi en un orden de magnitud en comparación con las células MCF-7 (Fig. 18 Tabla 2).

Sin embargo, las células MDA (TNBC) no mostraron un efecto sinérgico, entre aurapteno y los metabolitos de tamoxifeno, el valor de EC₅₀ para aurapteno fue de 76.75 μM y el tratamiento concomitante con 4-OH Tam no indujo un efecto terapéutico significativo, ya que el valor de EC₅₀ se mantuvo en 80.65 μM (Fig. 18, Tabla 2).

En el caso de los resultados con endoxifeno, mostraron un efecto sinérgico en las células MCF-7 y MCF-7^{Var E}, pero no tuvieron un efecto significativo en las células MDA (Fig. 6B). Se registró una reducción en los valores de EC₅₀ en ambas variantes RE+, mientras que el EC₅₀ para el tratamiento con aurapteno en células MCF-7 fue de 47.49 μM, el impacto del endoxifeno redujo el EC₅₀ a 13.34 μM; mientras que en las células MCF-7^{Var E}, los valores fueron de 52.4 μM para el

tratamiento con aurapteno, y el uso en conjunto con ekl endoxifeno promovió una reducción a 6.47 μM en el valor de EC_{50} . En las células MDA, el valor de EC_{50} para aurapteno fue de 76.75 μM y el tratamiento concomitante con endoxifeno solo redujo a un valor de EC_{50} a 52.68 μM (Fig. 18, Tabla 2).

Los resultados sugieren un potencial terapéutico para el tratamiento combinado en células RE+. Además, el aurapteno mostró eficacia a concentraciones bajas como 12 μM , casi cinco veces menor que la concentración efectiva del aurapteno por si solo (50 μM) tras 24 horas de tratamiento. Debido a los resultados favorables, se llevaron a cabo experimentos posteriores con una concentración de aurapteno de 12.5 μM y poder dilucidar el mecanismo de sensibilización en las líneas celulares RE+.

8.5.7 Efecto del aurapteno sobre el RE y el complejo eIF4F.

Teniendo en cuenta que el aurapteno puede modular la actividad del receptor de estrógeno (RE), impactando en procesos celulares como la proliferación, apoptosis y potencialmente la quimiorresistencia, evaluamos la posibilidad de que la sinergia observada entre el aurapteno y los metabolitos derivados del tamoxifeno pudiera surgir de la unión del aurapteno al RE. Para ello, se realizaron simulaciones de docking molecular para comparar las posiciones de unión del aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno contra el ligando natural del RE, el E2 (Fig. 19 A-F). En primera instancia, el E2 y el aurapteno mostraron valores de afinidad similares o E-scores de -5.60 kcal/mol y -5.39 kcal/mol, respectivamente. De manera notable, se encontró que el aurapteno se une al dominio de unión al ligando (LBD), lo que sugiere una posible competencia por el dominio de unión del ligando natural del RE (Fig. 18 A-D). En este sentido, el aurapteno comparte varios residuos de unión con el estradiol, incluidos Arg394, Glu353, Leu346, Leu349, Leu384, Leu525, Ile424 y Met421, lo que resulta en un valor de afinidad similar al del estradiol.

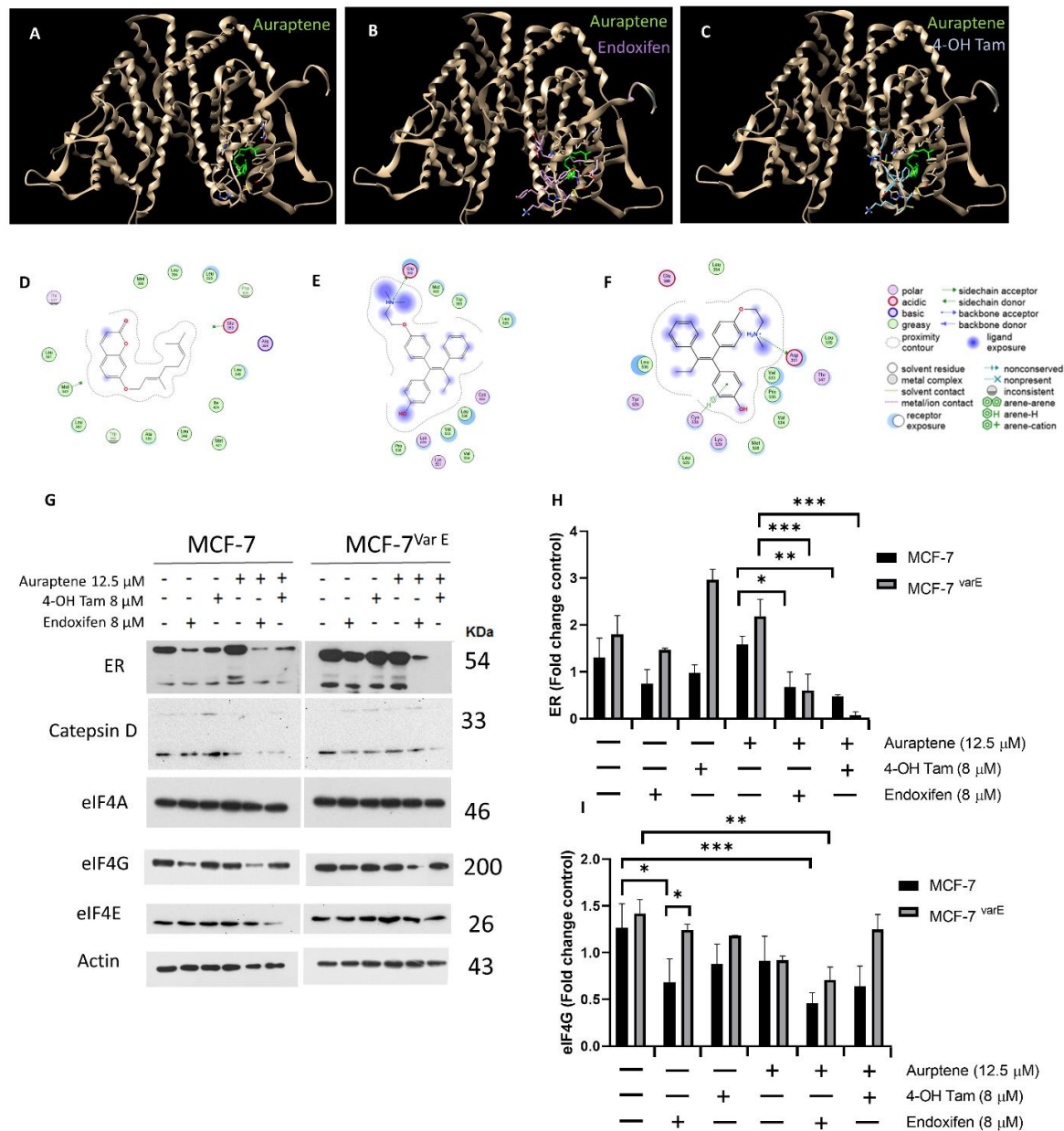


Fig. 18 **Caracterización del complejo eIF4F y ER.** Acoplamiento molecular de las moléculas de aurapteno y metabolitos de tamoxifeno en el receptor de estrógenos. Acoplamiento molecular de aurapteno (A), endoxifeno (B) y 4-OH tamoxifeno (C) en el ER α (PDB: 3ERT). ER α se muestra en beige, mientras que el grafeno, endoxifeno y 4-OH tamoxifeno se muestran en verde, púrpura y azul, respectivamente. Residuos del sitio de unión y sus tipos de interacciones con aurapteno (D), endoxifeno (E) y 4-OH tamoxifeno (F). G) Comparación entre MCF-7 y MCF-7^{Var E} bajo tratamientos con metabolitos de tamoxifeno y aurapteno para ER, catepsina D, eIF4A, eIF4G, eIF4E. Análisis de densitometría de ER (H) y eIF4G (I) en células MCF-7 y MCF-7^{Var E} bajo las mismas condiciones. Los resultados se reportan como media \pm DE (n = 3) y se expresan como cambio relativo respecto al control de carga; *p < 0.05, **p < 0.002, ***p < 0.001 en comparación con el control utilizando ANOVA de 2 vías. β -actina y actina fueron utilizados como controles de carga.

De forma interesante, los valores de E-score para el endoxifeno y el 4-OH Tam fueron de -7.81 Kcal/mol y -7.29 Kcal/mol, respectivamente (Fig. 18 A-F), y además de compartir algunos residuos de unión entre ellos, como Glu380, Leu536 y Leu525 (Fig. 18 A-F). Trp383 y Leu525 son compartidos entre los sitios de unión de aurapteno y endoxifeno, mientras que Tyr347 y Leu525 son compartidos entre los sitios de unión de 4-OH Tam y aurapteno, sugiriendo que el aurapteno puede ejercer una actividad similar a la de los metabolitos del tamoxifeno, que es la inhibición competitiva del RE, lo cual debe confirmarse mediante experimentos *in vitro*.

Intentamos entonces inhibir completamente el RE mediante el uso de tratamientos combinados de metabolitos derivados del tamoxifeno y aurapteno. Sin embargo, estos tratamientos resultaron bastante agresivos para los modelos celulares, como se evidencia en la figura 18. Por lo tanto, se redujo el tiempo de incubación a 12 h y en los experimentos posteriores a 6 h, con el fin de obtener suficiente lisado celular para realizar ensayos de western blot (Fig. 19 G, H), debido al daño celular significativo (Fig. 18). Utilizando los tratamientos conjuntos de metabolitos activos del tamoxifeno (8 μ M) y aurapteno (12.5 μ M), evaluamos la expresión proteica del RE, catepsina D y componentes del complejo eIF4F. Los resultados indicaron que el tratamiento simultáneo de aurapteno junto con metabolitos del tamoxifeno ejerce un efecto de regulación negativa notable sobre RE α en las células MCF-7, mostrando un efecto más evidente en la variante MCF-7^{Var E} (Fig. 19 G, H). Además, se registró una disminución en la catepsina D bajo los tratamientos combinados, destacando la efectividad del tratamiento sobre el RE, y por lo tanto el desarrollo de una posible estrategia terapéutica (Fig. 18 G, H).

Los tratamientos concomitantes también desencadenaron la regulación negativa de eIF4G, otra proteína del complejo eIF4F (Fig. 18 G, H), lo que podría interrumpir el ensamblaje del complejo eIF4F. Este efecto podría potenciarse aún más en las células MCF-7, donde también se observó una disminución en la expresión de eIF4E bajo el tratamiento conjunto de aurapteno y 4-OH Tam (Fig. 18 H, I), lo que disminuiría la actividad del complejo de traducción eIF4F.

8.5.8 El aurapteno podría disminuir la expresión de los transportadores ABC (ATP-binding cassette).

Los transportadores ABC son conocidos por su papel en el mecanismo de resistencia a múltiples fármacos (MDR), ya que facilitan la expulsión de los fármacos fuera de las células, reduciendo su efectividad. La supresión de estos transportadores por el aurapteno podría aumentar la acumulación intracelular de los metabolitos del tamoxifeno, potenciando su eficacia y reduciendo la resistencia quimioterapéutica en células de cáncer de mama RE+. Esta vía de acción reforzaría el potencial del aurapteno como un agente coadyuvante en tratamientos de resistencia al tamoxifeno.

Para ampliar la caracterización de los mecanismos de quimio resistencia en las células MCF-7^{Var E} y evaluar el posible efecto del aurapteno y los metabolitos del tamoxifeno, se evaluó la modulación transcripcional de los genes transportadores ABCB1 y ABCC1, asociados con el complejo de traducción eIF4F. Bajo condiciones basales, las células MCF-7^{Var E} presentan niveles de expresión de ABCB1 casi del doble comparado con las MCF-7 (Fig. 19 A). En este sentido, el endoxifeno altera de manera importante el patrón de expresión de ABCB1, ya que las células MCF-7 muestran un aumento de 25 veces en la expresión, mientras que las MCF-7^{Var E} presentan una ligera disminución en la expresión. El tratamiento con 4-OH Tam promueve un aumento en la expresión tanto en células MCF-7 como en MCF-7^{Var E} (Fig. 19 A). De manera interesante, el tratamiento conjunto de aurapteno y endoxifeno suprime por completo la expresión de ABCB1 en las células MCF-7^{Var E} (Fig. 19 A).

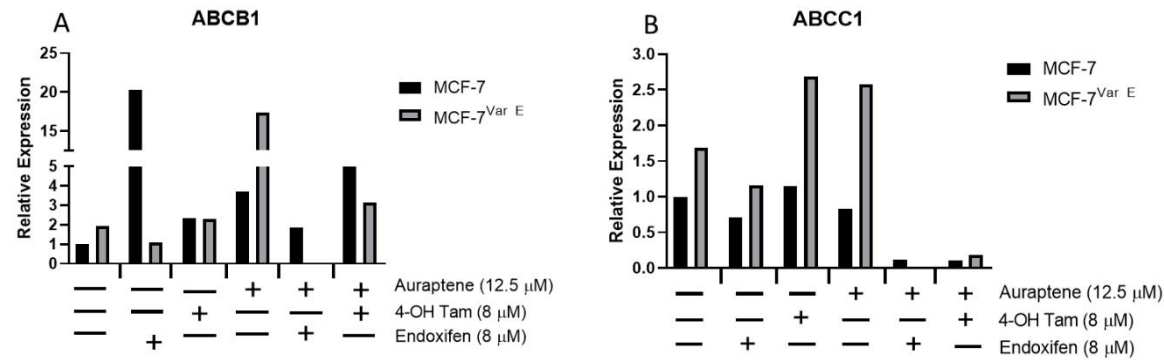


Fig. 19. **Interacciones de la bomba de eflujo de aurapteno.** A) Expresión génica relativa de ABCB1. Expresión relativa de ABCB1 normalizada con GAPDH, en negro MCF-7, en gris MCF-7^{Var E}. B) Expresión génica relativa de ABCC1. Expresión relativa de ABCC1 normalizada con GAPDH, en negro MCF-7, en gris MCF-7^{Var E}.

Por otro lado, el transportador ABCC1 mostró un patrón de expresión similar al de ABCB1, ya que las células MCF-7^{Var E} también presentan niveles de expresión casi dos veces más que las MCF-7. Tanto los tratamientos individuales con 4-OH Tam como con aurapteno desencadenan un aumento de 2.5 veces en la expresión de ABCC1 en células MCF-7^{Var E}. Sin embargo, los tratamientos combinados de aurapteno y metabolitos derivados del tamoxifeno redujeron la expresión de ABCC1 en células MCF-7 y MCF-7^{Var E} (Fig. 19 B). Los tratamientos concomitantes demuestran su máxima eficacia una vez que las células adquieren resistencia (MCF-7^{Var E}); por otro lado, al tratar las células MCF-7 con endoxifeno y la reducción de la expresión de ABCB1 y ABCC1 refuerzan la eficacia terapéutica de los tratamientos combinados.

Este patrón sugiere que los tratamientos combinados no solo tienen el potencial de disminuir su viabilidad celular una vez adquirida la resistencia, sino también de reducir la expresión de transportadores clave involucrados en fenómenos de farmacorresistencia, con lo cual se podría mejorar la eficacia de los tratamientos en células de cáncer de mama RE+ resistentes.

8.5.9 Potencial uso farmacéutico del aurapteno.

Como perspectiva para un eventual uso en el tratamiento clínico, se realizó el análisis computacional ADME del aurapteno utilizando SwissADME (Fig. 20) y ADMETlab 2.0, que proporciona un análisis *in silico* de las propiedades de un compuesto químico y su potencial uso como fármaco. En este sentido, el aurapteno tiene un peso molecular de 298.16, un logP de 5.18 y un logS de -5.75, lo que sugiere propiedades farmacéuticas potenciales basadas en sus parámetros de solubilidad y permeabilidad calculados (Xiong *et al.*, 2021). Con características de solubilidad moderada según los modelos ESOL y Ali (Daina *et al.*, 2017), sugiriendo un potencial para una adecuada disolución y absorción en sistemas biológicos. Además, su puntuación de accesibilidad sintética (SA score) sugiere simplicidad para la síntesis, y se adhiere a la regla del Triángulo Dorado, indicando un perfil ADME potencialmente favorable (Xiong *et al.*, 2021).

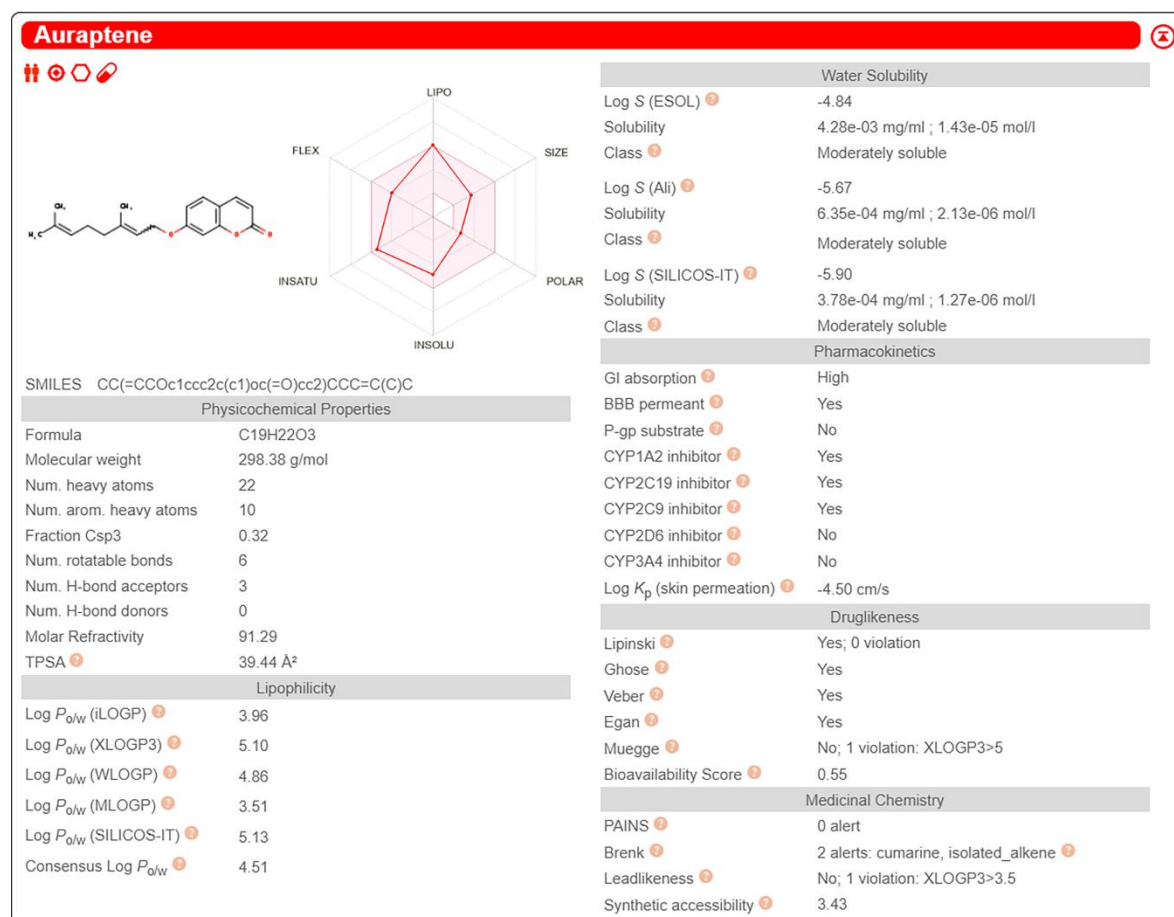


Fig. 20. **Resultados de SwissADME sobre las propiedades del aurapteno.** Los resultados se calcularon utilizando la fuente de datos SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php/>; Instituto Suizo de Bioinformática; consultado el 18 de marzo de 2024).

Particularmente, el aurapteno muestra una alta absorción gastrointestinal, lo que indica un comportamiento farmacocinético favorable. Además, el aurapteno no muestra una inhibición significativa de las enzimas clave del citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4), lo que sugiere un potencial mínimo para interacciones entre fármacos según el perfil ADME (Fig. 20). Esta información sugiere que el aurapteno puede ser un compuesto para un eventual desarrollo farmacéutico.

9 Discusión

En el presente trabajo abordó en primera instancia la generación de variantes resistentes a los metabolitos derivados de tamoxifeno (4-OH tamoxifeno, endoxifeno). Para obtener un modelo de cáncer de mama RE+ que emule algunos de los efectos de la quimiorresistencia en pacientes. Uno de los principales adyuvantes para el tratamiento de cáncer de mama RE+ es el tamoxifeno, que es un profármaco, de tal manera que los metabolitos son los que tienen un mayor efecto terapéutico. Dentro de la novedad del trabajo se encuentra que la resistencia se adquirió con ambos metabolitos del tamoxifeno (4-OH tamoxifeno, endoxifeno). En la literatura ya se han utilizado modelos celulares resistentes a tamoxifeno (Benz *et al.*, 1992; Hiscox *et al.*, 2006; Jordan, 2004), y en menor medida modelos de resistencia a sus metabolitos activos, como el 4-OH tamoxifeno y el endoxifeno, sin embargo, no se encontraron reportes donde utilicen ambos metabolitos y además en conjunto con E2, para la generación de modelos resistentes. Por otra parte, el tiempo para generar la resistencia fue de aproximadamente 4 meses, tiempo relativamente bajo en comparación de otros protocolos en donde se genera la resistencia en periodos de 6 meses hasta 1 año. Sin embargo, el proceso utilizado todavía puede mejorar su especificidad a través del análisis con un citómetro de flujo acoplado a cell sorter, para poder conocer blancos específicos que generen la resistencia a partir de una sola célula, teniendo así diversas clonas resistentes, sin embargo, este proceso extendería más el tiempo para generar la resistencia.

En el caso de la caracterización de las vías de señalización, se obtiene una perspectiva de los posibles mecanismos que podrían estar en acción. El más evidente se observa en las líneas celulares resistentes, donde se identifica una disminución en la expresión del receptor de estrógeno (RE). Este hallazgo sugiere un cambio fenotípico, un fenómeno previamente documentado en la clasificación de tumores de cáncer de mama (García-Redondo *et al.*, 2023). Esta disminución podría explicarse porque los metabolitos empleados para inducir la resistencia actúan como agonistas del receptor de estrógeno (RE), lo cual fomenta cambios

fenotípicos al estimular a las células a activar vías alternas para promover su proliferación. Sin embargo, es importante señalar que las líneas celulares resistentes presentan una velocidad de crecimiento menor en comparación con las líneas parentales. Este fenómeno puede explicarse por una redistribución de los recursos metabólicos hacia mecanismos que sustentan la resistencia, como la reparación del ADN, la regulación de vías de señalización celular y la gestión del estrés oxidativo (Holohan *et al.*, 2013; Housman *et al.*, 2014), así también las células resistentes, al priorizar la expresión de proteínas protectoras o transportadores de eflujo como las bombas de eflujo de la familia ABC, pueden ralentizar procesos normales como la proliferación celular (Gottesman *et al.*, 2002). Por otro lado, mediante microscopía óptica se observaron cambios morfológicos en las variantes resistentes, lo que confirma alteraciones estructurales asociadas a la resistencia, las que pueden incluir la reorganización del citoesqueleto o variaciones en la forma y el tamaño nuclear, asociadas con el cambio fenotípico, confiriéndoles una mejor adaptación a agentes externos (Aseervatham, 2020). Estos cambios morfológicos pueden estar ligados a una activación diferencial de vías como PI3K/AKT o NF- κ B, que son fundamentales para la supervivencia y la plasticidad celular

Por otro lado, se propone que las moléculas reguladoras aurapteno y criptotanshinona podrían interactuar tanto con el factor de iniciación eIF4A como con el receptor de estrógenos. En particular, se sugiere que la criptotanshinona interactúa con eIF4A, como lo evidencian los ensayos de fluorescencia realizados donde se observó una disminución en la emisión. Además, estudios previos indican que la criptotanshinona puede inhibir la vía PI3K/AKT/NF- κ B (Liu *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020a; Zhang *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2024), lo cual indicaría posible impacto sobre la actividad del complejo eIF4F. Esta posible inhibición sugiere un mecanismo por el cual la criptotanshinona podría modular la síntesis proteica, afectando procesos celulares críticos asociados a la proliferación y supervivencia de las células resistentes.

Tomando en consideración las vías de señalización antes mencionada, la disminución de eIF4A puede ser un buen blanco terapéutico, para regular con las moléculas naturales (criptotanshinona y aurapteno). Debido a su posible interacción con eIF4A, podrían disminuir su funcionamiento y por lo tanto inducir a apoptosis, además de bloquear procesos de transcripción para proteínas oncogénicas, o de bombas de eflujo (Sridharan *et al.*, 2019).

El aurapteno demostró un efecto más potente en la línea RE+ en comparación con la línea TNBC similar a lo reportado por (de Medina *et al.*, 2010), quien describió al aurapteno como un modulador del RE. Parte de la explicación de este fenómeno de resistencia, se plantea que este podría depender de los sitios de interacción en el receptor de estrógenos. Es posible que el aurapteno esté actuando en diferentes dominios activos del RE, como AF-1 o AF-2 (Chang, 2012), estos dominios desempeñan roles cruciales en la modulación de la actividad transcripcional del RE, dependiendo de las señales celulares y del entorno molecular. La interacción diferencial con estos dominios podría desencadenar respuestas específicas en términos de resistencia celular y la activación de vías de señalización posteriores, como las vías de supervivencia o apoptosis, promoviendo resistencia a terapias hormonales o sensibilización a otros tratamientos (Ali & Coombes, 2002; McDonnell & Norris, 2002).

De forma interesante, la línea celular resistente exhibió una respuesta amplificada cuando se aplicó un tratamiento combinado de endoxifeno y aurapteno, lo que evidencia un efecto sinérgico entre ambos compuestos. El efecto de sinergismo con 4-OH tamoxifeno y endoxifeno ya han sido reportados, donde observaron una sinergia con epicatequinas y los metabolitos derivados del tamoxifeno en la línea celular MDA-MB-231 (Chisholm *et al.*, 2004), de acuerdo con los autores, el efecto está relacionado con la sensibilización del proceso de apoptosis.

Con base en nuestros resultados, se propone que el aurapteno puede estar inhibiendo al factor eIF4A además del RE, bloqueando así una parte fundamental

de los procesos de traducción y proliferación celular y favoreciendo la activación de la vía apoptótica. Este fenómeno parece mostrar una especificidad por el fenotipo RE+, en concordancia con los resultados obtenidos en este proyecto.

Por otro lado, al evaluar la modulación transcripcional de los genes transportadores ABCB1 y ABCC1, ambos relacionados con el complejo de traducción eIF4F, encontró un perfil diferencial de expresión, que podría estar vinculado con la resistencia a fármacos en células de cáncer de mama RE+. Bajo condiciones basales, las células MCF-7^{Var E} mostraron una expresión de ABCB1 y ABCC1 casi el doble de las células MCF-7, lo que sugiere una predisposición a la quimiorresistencia. La exposición de la combinación de aurapteno y endoxifeno logró suprimir por completo la expresión de ABCB1 en las células MCF-7^{Var E}, destacando el potencial de esta combinación en revertir la quimiorresistencia. Además, al aplicar tratamientos combinados de aurapteno con metabolitos del tamoxifeno, se observó una reducción en la expresión de ABCC1 en ambas líneas celulares, lo cual refuerza el efecto inhibitor de estos compuestos en los mecanismos de resistencia. De tal manera, que los tratamientos combinados no solo afectan la viabilidad celular en células resistentes, sino que también reducen significativamente la expresión de transportadores clave asociados a la quimiorresistencia.

10 Conclusiones

El presente trabajo ofrece un enfoque innovador en el diseño de terapias dirigidas a contrarrestar la quimiorresistencia en un modelo celular con receptor de estrógeno positivo (RE+). En este trabajo se identificó un mecanismo no reportado previamente, en el que el estradiol (E2), en combinación equimolar con metabolitos activos derivados del tamoxifeno, contribuye al desarrollo de quimiorresistencia. Fenómeno que sugiere un aumento en la actividad del receptor de estrógeno y su implicación con el complejo de inicio de traducción eIF4F, factores que podrían jugar un papel importante en la generación de las células resistentes.

Adicionalmente, la criptotanshinona y especialmente el aurapteno son candidatos prometedores para modular tanto al eIF4A como al receptor de estrógeno, inhibiendo procesos como la traducción y proliferación celular, específicos del fenotipo RE+. Los resultados muestran que el efecto inhibitor del aurapteno es más potente en líneas celulares RE+ en comparación con modelos triple negativos (TNBC), lo cual destaca su capacidad de selección fenotípica y el potencial en aplicaciones terapéuticas dirigidas.

Los tratamientos combinados de aurapteno y metabolitos del tamoxifeno, disminuyeron significativamente la expresión de RE. Este fenómeno sugiere un sinergismo que podría aprovecharse para sensibilizar las células resistentes y contrarrestar la quimiorresistencia. Así, esta combinación no solo interfiere en la señalización del receptor de estrógeno, sino que también logra disminuir la activación de las bombas de eflujo ABCB1 y ABCC1, lo cual abre una vía para explorar nuevas estrategias terapéuticas, dirigidas a reducir la proliferación tumoral mediante la interrupción de vías esenciales para la supervivencia celular en cáncer de mama RE+ resistente.

Los resultados de este estudio aportan una base para el desarrollo de terapias combinadas con compuestos naturales y derivados de tamoxifeno en el tratamiento de cáncer de mama ER+, principalmente en la modulación de eIF4F y RE como estrategias innovadoras para abordar la quimiorresistencia.

11 Logros alcanzados

Durante el doctorado, se lograron tres productos de investigación:

Publicación de artículo científico como primer autor **Auraptene Boosts the Efficacy of the Tamoxifen Metabolites Endoxifen and 4-OH-Tamoxifen in a Chemoresistant ER+ Breast Cancer Model (Anexo 1).**

Solicitud de patente (Anexo 2) para proteger una tecnología innovadora desarrollada en el laboratorio, la cual tiene como base el artículo anteriormente mencionado.

Artículo de colaboración con el nombre de **eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model (Anexo 3)**, en el cual también se tuvo primera autoría.

De manera complementaria se está desarrollando otro artículo, pero teniendo como base a la criptotanshinona.

12 Bibliografia

- Ali, S., & Coombes, R. C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, 2(2), 101-112. <https://doi.org/10.1038/nrc721>
- Andreou, A. Z., Harms, U., & Klostermeier, D. (2017). eIF4B stimulates eIF4A ATPase and unwinding activities by direct interaction through its 7-repeats region. *RNA Biol*, 14(1), 113-123. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259782>
- Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., & Bachmann, M. (2012). Native polyacrylamide gels. *Methods Mol Biol*, 869, 49-53. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_5
- Aseervatham, J. (2020). Cytoskeletal Remodeling in Cancer. *Biology (Basel)*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biology9110385>
- Benecke, A., Chambon, P., & Gronemeyer, H. (2000). Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep*, 1(2), 151-157. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd028>
- Benz, C. C., Scott, G. K., Sarup, J. C., Johnson, R. M., Tripathy, D., Coronado, E., Shepard, H. M., & Osborne, C. K. (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat*, 24(2), 85-95. <https://doi.org/10.1007/BF01961241>
- Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., & Zardecki, C. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(Pt 6 No 1), 899-907. <https://doi.org/10.1107/s0907444902003451>
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., & Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 14(4), 261-278. <https://doi.org/10.1038/nrd4505>
- Bocchinfuso, W. P., & Korach, K. S. (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2(4), 323-334. <https://doi.org/10.1023/a:1026339111278>
- Boussemart, L., Malka-Mahieu, H., Girault, I., Allard, D., Hemmingsson, O., Tomasic, G., Thomas, M., Basmadjian, C., Ribeiro, N., Thuaud, F., Mateus, C., Routier, E., Kamsu-Kom, N., Agoussi, S., Eggermont, A. M., Desaubry, L., Robert, C., & Vagner, S. (2014). eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature*, 513(7516), 105-109. <https://doi.org/10.1038/nature13572>
- Boyer, J. A., Sharma, M., Dorso, M. A., Mai, N., Amor, C., Reiter, J. M., Kannan, R., Gadal, S., Xu, J., Miele, M., Li, Z., Chen, X., Chang, Q., Pareja, F., Worland, S., Warner, D., Sperry, S., Chiang, G. G., Thompson, P. A., Yang, G., Ouerfelli, O., de Stanchina, E., Wendel, H. G., Rosen, E. Y., Chandarlapaty, S., & Rosen, N. (2024). eIF4A controls translation of estrogen receptor alpha and is a therapeutic target in advanced breast cancer. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.05.08.593195>
- Carvalho, T. M. A., Di Molfetta, D., Greco, M. R., Koltai, T., Alfarouk, K. O., Reshkin, S. J., & Cardone, R. A. (2021). Tumor Microenvironment Features and Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Insights into Targeting

Physicochemical Barriers and Metabolism as Therapeutic Approaches. *Cancers (Basel)*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/cancers13236135>

Chang, M. (2012). Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)*, 20(3), 256-267. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.256>

Cheng, R., Liu, Y. J., Cui, J. W., Yang, M., Liu, X. L., Li, P., Wang, Z., Zhu, L. Z., Lu, S. Y., Zou, L., Wu, X. Q., Li, Y. X., Zhou, Y., Fang, Z. Y., & Wei, W. (2017). Aspirin regulation of c-myc and cyclinD1 proteins to overcome tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(18), 30252-30264. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16325>

Chisholm, K., Bray, B. J., & Rosengren, R. J. (2004). Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Anticancer Drugs*, 15(9), 889-897. <https://doi.org/10.1097/00001813-200410000-00010>

Clark, A. M., & Labute, P. (2007). 2D depiction of protein-ligand complexes. *J Chem Inf Model*, 47(5), 1933-1944. <https://doi.org/10.1021/ci7001473>

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

de Medina, P., Genovese, S., Paillasse, M. R., Mazaheri, M., Caze-Subra, S., Bystrycky, K., Curini, M., Silvente-Poirot, S., Epifano, F., & Poirot, M. (2010). Auraptene is an inhibitor of cholesterol esterification and a modulator of estrogen receptors. *Mol Pharmacol*, 78(5), 827-836. <https://doi.org/10.1124/mol.110.065250>

Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E., & Pagano, M. (2006). S6K1- and β TRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 314(5798), 467-471. <https://doi.org/10.1126/science.1130276>

Fagan, D. H., Fettig, L. M., Avdulov, S., Beckwith, H., Peterson, M. S., Ho, Y. Y., Wang, F., Polunovsky, V. A., & Yee, D. (2017). Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation. *Horm Cancer*, 8(4), 219-229. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0296-3>

Fan, P., Agboke, F. A., Cunliffe, H. E., Ramos, P., & Jordan, V. C. (2014). A molecular model for the mechanism of acquired tamoxifen resistance in breast cancer. *Eur J Cancer*, 50(16), 2866-2876. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.08.011>

Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 27(1), 95-120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

Galicia-Vázquez, G., Cencic, R., Robert, F., Agenor, A. Q., & Pelletier, J. (2012). A cellular response linking eIF4A1 activity to eIF4A11 transcription. *RNA*, 18(7), 1373-1384. <https://doi.org/10.1261/rna.033209.112>

Galindo-Hernández, O., Córdova-Guerrero, I., Díaz-Rubio, L. J., Pulido-Capiz, A., Díaz-Villanueva, J. F., Castañeda-Sánchez, C. Y., Serafín-Higuera, N., & García-González, V. (2019). Protein translation associated to PERK arm is a new target for regulation of metainflammation: A connection with hepatocyte cholesterol.

Journal of Cellular Biochemistry, 120(3), 4158-4171.
<https://doi.org/10.1002/jcb.27701>

Galindo-Hernandez, O., Gonzales-Vazquez, C., Cortes-Reynosa, P., Reyes-Urbe, E., Chavez-Ocana, S., Reyes-Hernandez, O., Sierra-Martinez, M., & Salazar, E. P. (2015). Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol*, 36(12), 9649-9659. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3711-9>

García-Redondo, M., Pareja López, Á., López Ruiz, N., & Rodríguez Alonso, J. M. (2023). Cáncer de mama: nueva clasificación molecular [10.1016/j.senol.2021.04.002]. *Revista de Senología y Patología Mamaria - Journal of Senology and Breast Disease*, 36(2).
<https://doi.org/10.1016/j.senol.2021.04.002>

Gonzalez-Ortiz, A., Pulido-Capiz, A., Castaneda-Sanchez, C. Y., Ibarra-Lopez, E., Galindo-Hernandez, O., Calderon-Fernandez, M. A., Lopez-Cossio, L. Y., Diaz-Molina, R., Chimal-Vega, B., Serafin-Higuera, N., Cordova-Guerrero, I., & Garcia-Gonzalez, V. (2022). eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model. *Cells*, 11(24).
<https://doi.org/10.3390/cells11244069>

Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2(1), 48-58.
<https://doi.org/10.1038/nrc706>

Gupta, S. V., Sass, E. J., Davis, M. E., Edwards, R. B., Lozanski, G., Heerema, N. A., Lehman, A., Zhang, X., Jarjoura, D., Byrd, J. C., Pan, L., Chan, K. K., Kinghorn, A. D., Phelps, M. A., Grever, M. R., & Lucas, D. M. (2011). Resistance to the translation initiation inhibitor silvestrol is mediated by ABCB1/P-glycoprotein overexpression in acute lymphoblastic leukemia cells. *AAPS J*, 13(3), 357-364.
<https://doi.org/10.1208/s12248-011-9276-7>

Hembruff, S. L., Laberge, M. L., Villeneuve, D. J., Guo, B., Veitch, Z., Cecchetto, M., & Parissenti, A. M. (2008). Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. *BMC Cancer*, 8, 318.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-318>

Hiscox, S., Jiang, W. G., Obermeier, K., Taylor, K., Morgan, L., Burmi, R., Barrow, D., & Nicholson, R. I. (2006). Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation. *Int J Cancer*, 118(2), 290-301. <https://doi.org/10.1002/ijc.21355>

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 13(10), 714-726.
<https://doi.org/10.1038/nrc3599>

Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, 65(3), 712-725.
<https://doi.org/10.1002/prot.21123>

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 6(3), 1769-1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>

Iwasaki, S., Iwasaki, W., Takahashi, M., Sakamoto, A., Watanabe, C., Shichino, Y., Floor, S. N., Fujiwara, K., Mito, M., Dodo, K., Sodeoka, M., Imataka, H., Honma, T., Fukuzawa, K., Ito, T., & Ingolia, N. T. (2019). The Translation Inhibitor Rocaglamide Targets a Bimolecular Cavity between eIF4A and Polypurine RNA. *Mol Cell*, 73(4), 738-748 e739. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.026>

Jordan, V. C. (2004). Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell*, 5(3), 207-213. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00059-5](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00059-5)

Joshi, B., Cameron, A., & Jagus, R. (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European Journal of Biochemistry*, 271(11), 2189-2203. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04149.x>

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res*, 51(D1), D1373-D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>

Kim, S., Hwang, B. Y., Su, B. N., Chai, H., Mi, Q., Kinghorn, A. D., Wild, R., & Swanson, S. M. (2007). Silvestrol, a potential anticancer rocaglate derivative from *Aglaia foveolata*, induces apoptosis in LNCaP cells through the mitochondrial/apoptosome pathway without activation of executioner caspase-3 or -7. *Anticancer Res*, 27(4B), 2175-2183. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17695501>

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

Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods*, 11(3), 319-U300. <https://doi.org/10.1038/Nmeth.2834>

Li, H. Y., Gao, C. D., Liang, Q., Liu, C., Liu, L. J., Zhuang, J., Yang, J., Zhou, C., Feng, F. B., & Sun, C. G. (2021). Cryptotanshinone Is a Intervention for ER-Positive Breast Cancer: An Integrated Approach to the Study of Natural Product Intervention Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/ARTN592109>
10.3389/fphar.2020.592109

Li, S. H., Wang, H. T., Hong, L., Liu, W., Huang, F., Wang, J., Wang, P., Zhang, X. Q., & Zhou, J. G. (2015). Cryptotanshinone inhibits breast cancer cell growth by suppressing estrogen receptor signaling. *Cancer Biology & Therapy*, 16(1), 176-184. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.962960>

Li, Y. J., Lei, Y. H., Yao, N., Wang, C. R., Hu, N., Ye, W. C., Zhang, D. M., & Chen, Z. S. (2017). Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer*, 36(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0219-2>

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 Chemother Pharmacol*, 55(5), 471-478. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0926-7>

Lin, C. J., Cencic, R., Mills, J. R., Robert, F., & Pelletier, J. (2008). c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation. *Cancer Res*, 68(13), 5326-5334. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5876>

Lipovka, Y., & Konhilas, J. P. (2016). The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: enemy or ally? *Biosci Rep*, 36(3). <https://doi.org/10.1042/BSR20160017>

Liu, Y., Lin, F., Chen, Y., Wang, R., Liu, J., Jin, Y., & An, R. (2020). Cryptotanshinone Inhibits Bladder Cancer Cell Proliferation and Promotes Apoptosis via the PTEN/PI3K/AKT Pathway. *J Cancer*, 11(2), 488-499. <https://doi.org/10.7150/jca.31422>

Liwak, U., Thakor, N., Jordan, L. E., Roy, R., Lewis, S. M., Pardo, O. E., Seckl, M., & Holcik, M. (2012). Tumor Suppressor PDCD4 Represses Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Proteins and Is Regulated by S6 Kinase 2. *Molecular and Cellular Biology*, 32(10), 1818-1829. <https://doi.org/10.1128/Mcb.06317-11>

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

Massarweh, S., & Schiff, R. (2006). Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer*, 13 Suppl 1, S15-24. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01273>

McDonnell, D. P., & Norris, J. D. (2002). Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science*, 296(5573), 1642-1644. <https://doi.org/10.1126/science.1071884>

Molecular Operating Environment (MOE). In. (2022.02).

Naineni, S. K., Itoua Maiga, R., Cencic, R., Putnam, A. A., Amador, L. A., Rodriguez, A. D., Jankowsky, E., & Pelletier, J. (2020). A comparative study of small molecules targeting eIF4A. *RNA*, 26(5), 541-549. <https://doi.org/10.1261/rna.072884.119>

Nair, S., & Sachdeva, G. (2018). Estrogen matters in metastasis. *Steroids*, 138, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.07.006>

Pan, Y. H., Shi, J. F., Ni, W. T., Liu, Y. P., Wang, S. L., Wang, X., Wei, Z. H., Wang, A. Y., Chen, W. X., & Lu, Y. (2017). Cryptotanshinone inhibition of mammalian target of rapamycin pathway is dependent on oestrogen receptor alpha in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(9), 2129-2139. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13135>

Peck, M. L., & Herschlag, D. (1999). Effects of oligonucleotide length and atomic composition on stimulation of the ATPase activity of translation initiation factor eIF4A. *RNA*, 5(9), 1210-1221. <https://doi.org/10.1017/s1355838299990817>

Pelletier, J., Graff, J., Ruggero, D., & Sonenberg, N. (2015). Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development. *Cancer Res*, 75(2), 250-263. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2789>

Pelletier, J., & Sonenberg, N. (2019a). The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 88, 88, 307-335. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111042>

Pelletier, J., & Sonenberg, N. (2019b). The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 88, 88, 307-335. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111042>

Pulido-Capiz, A., Díaz-Molina, P., Martínez-Navarro, I., Guevara-Olaya, L. A., Casanueva-Pérez, E., Mas-Oliva, J., Rivero, I. A., & Garcia-González, V. (2018). Modulation of Amyloidogenesis Controlled by the C-Terminal Domain of Islet Amyloid Polypeptide Shows New Functions on Hepatocyte Cholesterol Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/ARTN> 331 10.3389/fendo.2018.00331

Rosettani, P., Knapp, S., Vismara, M. G., Rusconi, L., & Cameron, A. D. (2007). Structures of the human eIF4E homologous protein, h4EHP, in its m7GTP-bound and unliganded forms. *J Mol Biol*, 368(3), 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.019>

Schmidt, E. V. (2004). The role of c- in regulation of translation initiation. *Oncogene*, 23(18), 3217-3221. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207548>

Shirokikh, N. E., Dutikova, Y. S., Staroverova, M. A., Hannan, R. D., & Preiss, T. (2019). Migration of Small Ribosomal Subunits on the 5' Untranslated Regions of Capped Messenger RNA. *Int J Mol Sci*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184464>

Simons, S. S., Jr., & Kumar, R. (2013). Variable steroid receptor responses: Intrinsically disordered AF1 is the key. *Mol Cell Endocrinol*, 376(1-2), 81-84. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.007>

Snozek, C. L. H., Algeciras-Schimmich, A., Goetz, M. P., & Langman, L. J. (2011). Pharmacogenomics of Tamoxifen. In A. H. B. Wu & K.-T. J. Yeo (Eds.), *Pharmacogenomic Testing in Current Clinical Practice: Implementation in the Clinical Laboratory* (pp. 77-89). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-283-4_6

Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., & Chen, Z. S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*, 31(2), 58-72. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10329>

Soga, S., Shirai, H., Kobori, M., & Hirayama, N. (2007). Use of amino acid composition to predict ligand-binding sites. *J Chem Inf Model*, 47(2), 400-406. <https://doi.org/10.1021/ci6002202>

Sun, F. Y., Palmer, K., & Handel, M. A. (2010). Mutation of , encoding a eukaryotic translation initiation factor, causes male infertility and meiotic arrest of mouse spermatocytes. *Development*, 137(10), 1699-1707. <https://doi.org/10.1242/dev.043125>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tayarani-Najaran, Z., Tayarani-Najaran, N., & Eghbali, S. (2021). A Review of Auraptene as an Anticancer Agent. *Front Pharmacol*, 12, 698352. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.698352>

Wang, J., Yang, D. H., Yang, Y., Wang, J. Q., Cai, C. Y., Lei, Z. N., Teng, Q. X., Wu, Z. X., Zhao, L., & Chen, Z. S. (2020). Overexpression of ABCB1 Transporter Confers Resistance to mTOR Inhibitor WYE-354 in Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041387>

Wu, Y. H., Wu, Y. R., Li, B., & Yan, Z. Y. (2020a). Cryptotanshinone: A review of its pharmacology activities and molecular mechanisms. *Fitoterapia*, 145, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104633>

Wu, Y. H., Wu, Y. R., Li, B., & Yan, Z. Y. (2020b). Cryptotanshinone: A review of its pharmacology activities and molecular mechanisms. *Fitoterapia*, 145. <https://doi.org/ARTN104633>
10.1016/j.fitote.2020.104633

Xin, Q. L., Qiu, J. T., Cui, S., Xia, G. L., & Wang, H. B. (2016). Transcriptional activation of nuclear estrogen receptor and progesterone receptor and its regulation. *Sheng Li Xue Bao*, 68(4), 435-454. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27546504>

Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res*, 49(W1), W5-W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>

Yasar, P., Ayaz, G., User, S. D., Gupur, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*, 16(1), 4-20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>

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

Zhang, L., Chen, C., Duanmu, J., Wu, Y., Tao, J., Yang, A., Yin, X., Xiong, B., Gu, J., Li, C., & Liu, Z. (2018). Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1alpha nuclear translocation. *Int Immunopharmacol*, 65, 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.035>

Zheng, Z., Ke, L., Ye, S., Shi, P., & Yao, H. (2024). Pharmacological Mechanisms of Cryptotanshinone: Recent Advances in Cardiovascular, Cancer, and Neurological Disease Applications. *Drug Des Devel Ther*, 18, 6031-6060. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S494555>

Zuberek, J., Kubacka, D., Jablonowska, A., Jemielity, J., Stepinski, J., Sonenberg, N., & Darzynkiewicz, E. (2007). Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. *RNA*, 13(5), 691-697. <https://doi.org/10.1261/rna.453107>

13 Anexos

Anexo 1



pharmaceutics



Article

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

Angel Pulido-Capiz, Brenda Chimal-Vega, Luis Pablo Avila-Barrientos, Alondra Campos-Valenzuela, Raúl Díaz-Molina, Raquel Muñiz-Salazar, Octavio Galindo-Hernández and Víctor García-González

Special Issue

Natural Products for Anticancer Application

Edited by

Dr. Alessandro Maugeri, Dr. Santa Cirmi, Prof. Dr. Michele Navarra and Prof. Dr. Thomas Efferth






Article

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

Angel Pulido-Campos-

^{1,2} 


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

¹ . Introduction

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



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

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

Received: 7 July 2024

Revised: 22 August 2024

Accepted: 3 September 2024

Published: 6 September 2024



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

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

* Correspondence: vgarcia62@uabc.edu.mx; Tel.: +52-686-5571622 (ext. 45309)

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

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

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

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

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

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

Natural compounds have potential as a therapeutic strategy. In this regard, several molecules such as rocaglates, hippuristanol, and pateamine A have been reported to have anticancer activity *in vitro* and *in vivo* models [15]. Indeed, rocaglamide and silvestrol have

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

Natural compounds, the bioactive molecules derived from plants, herbs, and other sources, have demonstrated a therapeutic anti-cancer effect, ranging from anti-inflammatory and antioxidant properties to immune modulation and apoptosis induction. Tamoxifen metabolites used along these natural compounds may have a potential to counteract chemoresistance mechanisms and enhance therapeutic outcomes. In this regard, we explored the use of auraptene for developing improved treatment strategies targeting ER signaling in breast cancer, as well as its use in chemoresistance conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

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

2.2. Cell Culture

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

2.3. Chemoresistance Protocol

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

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

2.4. Cell Viability

Cell viability was assessed using the MTT assay according to a previous protocol [23]. The experiments were performed in a 96-well plate, seeding 20,000 cells, which were incubated to reach 80% of confluence. Next, cells were incubated under different treatments.

Formazan crystals were dissolved in a lysis buffer containing 20% SDS and 50% N,N-dimethylformamide (pH 3.7) for 12 h at 37 °C. Optical densities were measured at 570 nm using a microplate reader.

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

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

2.5. Western Blot (WB) Analysis

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

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

(1:500), anti-eIF4A (1:500), anti-eIF4E (1:400), anti-GAPDH (1:500), anti-Cathepsin D (1:450), anti-eIF4G (1:300), and anti-p-4E-BP1/2/3 (1:400).

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

2.6. Optical Microscopy

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

2.7. Molecular Docking

The three-dimensional structure of eIF4A1 was obtained from the Protein Data Bank (PDB) [24] ID 5ZC9, which corresponds to the structure of human eIF4A1-ATP at 2 Å resolution. The PDB 3ERT three-dimensional structure of ER α at 1.9 Å resolution was used. The structures of the ligand molecules were obtained from the PubChem database [25], rocaglamide (CID 331783), auraptene (CID 1550607), endoxifen (CID 10090750), 4-OH Tam (CID 449459), and fulvestrant (CID 104741). The protein structures were prepared by removing water and small molecules, leaving only the protein structure. The ligand and receptor were protonated in 3D and energy minimization; these experiments were performed using Molecular Operating Environment (MOE) 2022.02 software [26] with default parameters under the AMBER99 force field [27]. For the ligands, different conformations were generated using a stochastic search on the MOE default parameters. Binding sites were predicted by employing the site finder option of the MOE software [28]. Molecular docking was established with the default parameters of MOE software, and refinement was used. For interpretation of the docking results, MOE identifies salt bridges, hydrogen bonds, hydrophobic interactions, sulfur-LP, cation- π , and solvent exposure, and gives the score S as a value of affinity ligand–receptor. Ligand interactions with target proteins were predicted based on the S score [29]. To find inaccessible binding modes with MOE’s scoring function, molecular docking simulations were also carried out using Vina [30]. Protein and ligand structures were prepared using Chimera’s [31] Dockprep plugin. Polar hydrogens were added, Gasteiger charges were calculated with ANTECHAMBER [32] and AMBER ff99sb force field, and missing residues were added using Dunbrack’s rotamer library [33]. Structures were then minimized using 100 steps of steepest descent with step sizes of 0.02 Å followed by 10 conjugate gradient steps of the same step size. Autodock Vina was then used to prepare pdbqt files and run the docking simulations using a grid box of enough volume to contain both the protein and the ligand and with an exhaustiveness parameter of 8.

2.8. Overexpression and Purification of eIF4A1

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

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

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

2.9. Fluorescence Assays for Auraptene-eIF4A Binding

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

2.10. ATPase Activity Assay for eIF4A1

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

2.11. qPCR for ABCC1 and ABCB1 Expression

Cells were seeded at a density of 200,000 cells/mL in 6-well plates of 20 mm and were subsequently incubated until 90% confluence was reached. Next, cells were incubated under indicated treatments for 12 h. The total RNA from cell variants were obtained with Trizol reagent, following the supplier's instructions. cDNA was synthesized using 1 µg of RNA and the Primer Script RT-PCR. cDNA concentration was standardized for qPCR with the PowerUp Sybr Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, and 10 µL of the resultant cDNAs was used for each PCR reaction. Primer sequences were *ABCB1* forward 5'-

GCCAGCTGAACTCCTTAGAC-3'; *ABCB1* reverse 5'-GATTCGTGCACAGCAGCA-3'; *ABCC1* forward 5'-GGCTCAAGGAGTATTCAGAG-3'; *ABCC1* reverse 5'-CCATCGATGATGATCTCTCC3'; *GAPDH* forward 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'; and *GAPDH* reverse 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'. qPCR reactions were performed in QuantStudio 1 by applied biosystems. Data were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with GAPDH as reference, and results were reported as fold change.

2.12. ADME Properties of Auraptene

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

2.13. Statistical Analysis

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

3. Results

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

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

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

showed a similar behavior; an increase in the EC_{50} value for the MCF-7^{Var E} ($29.62 \pm 0.49 \mu\text{M}$) compared to MCF-7 cells (19.81 ± 0.49) was registered (Supplementary Figure S1).

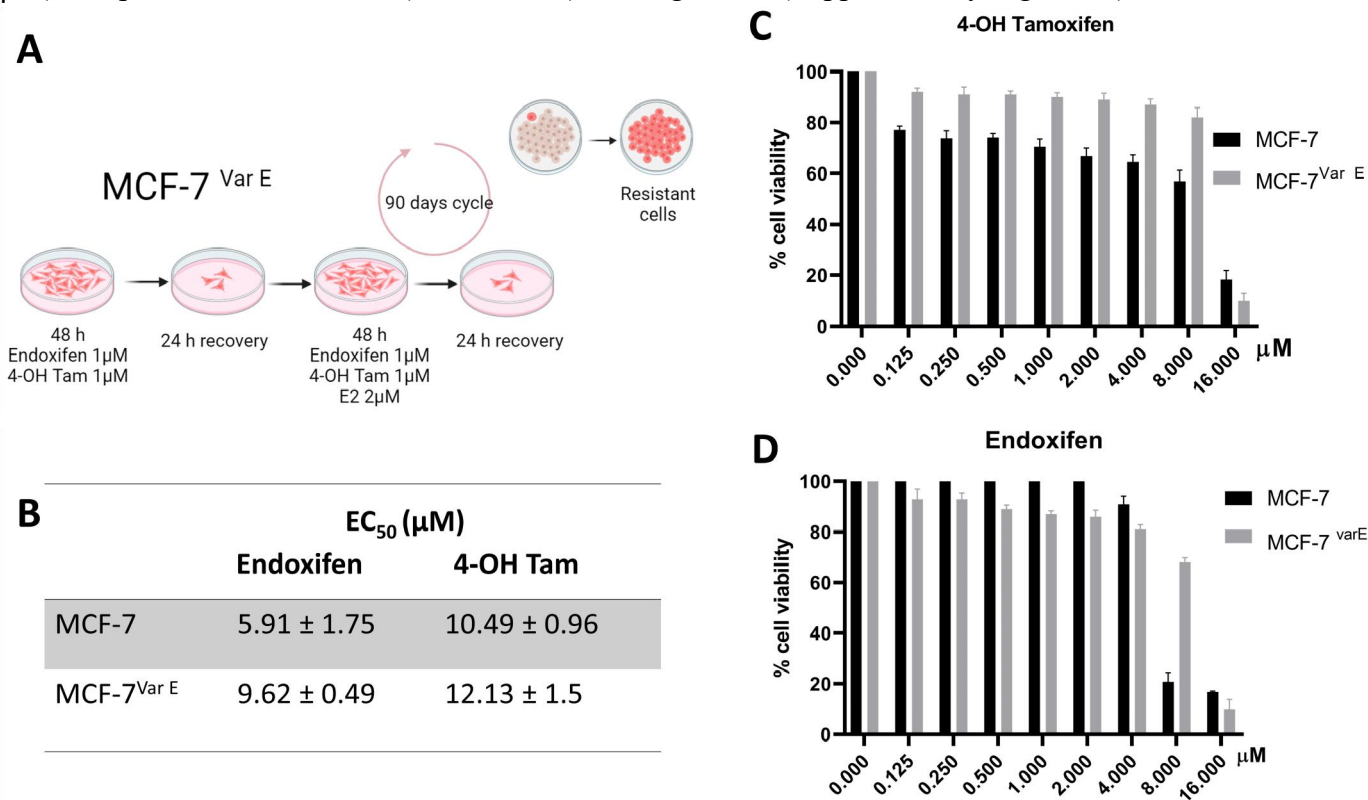


Figure 1. Resistance development in MCF-7 cells and its characterization. **(A)** Illustration of the protocol used to carry out chemoresistance, showing the procedure for resistance acquisition in MCF-7^{Var E} cells. **(B)** Comparison of the EC_{50} values and SD among MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells under the 4-OH Tam **(C)** and endoxifen **(D)** treatments (0–16 μM).

3.2. Effect of Estradiol as a Determinant of Chemoresistance

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

Under conditions of chemoresistance, tamoxifen metabolites induced an increase in ER expression in the MCF-7^{Var E} in comparison to MCF-7 cells under basal conditions (Figure 2A,B). Moreover, combined treatment with E2- and tamoxifen-derived metabolites showed a down-regulation in $ER\alpha$ expression (Figure 2A,B), which in turn caused more significant cell damage (Supplementary Figure S2). This phenomenon could be associated with the fact that E2 stimulation increases cellular activity, enhancing the effectiveness of tamoxifen metabolites, particularly under the combined treatments. In addition, in the resistant MCF-7^{Var E} cells, the combined effect was more pronounced, resulting in a significant decrease in $ER\alpha$ expression (Figure 2A,B) and, consequently, a more potent cytotoxic effect (Supplementary Figure S2). These results suggest a role of $ER\alpha$ under elevated concentrations of pharmacologically active tamoxifen-derived metabolites. Given the impact of changes in cathepsin D expression levels on breast cancer prognosis [37], we also determined its expression in control and resistant cells. Importantly, we

observed an increase in cathepsin D levels in both MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells when treated with a combination of estradiol and tamoxifen metabolites.

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

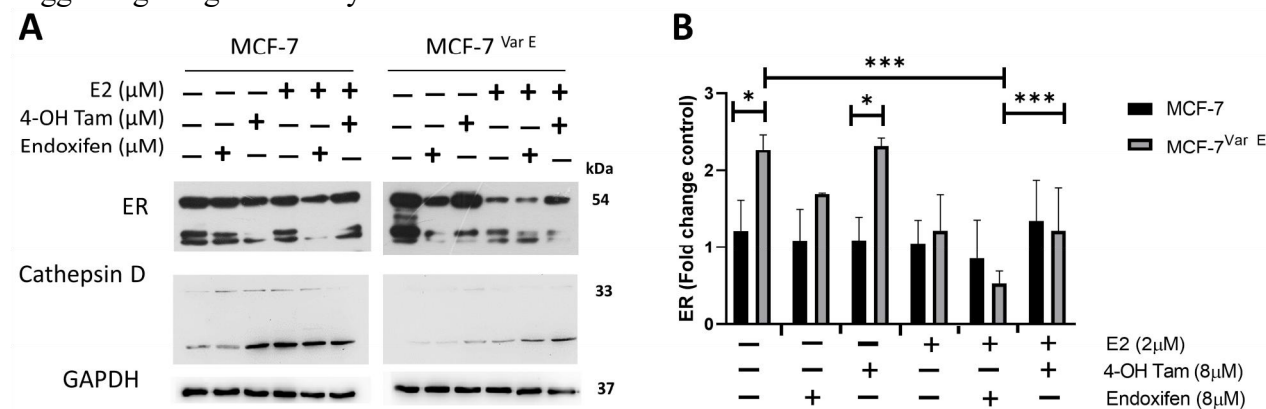


Figure 2. Role of estrogen receptor (ER) in chemoresistance. (A) Expression of ER and cathepsin D.

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

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

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

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

To determine the role of the eIF4F complex in ER drug resistance cells, we characterized its expression in MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells. In the first instance, for eIF4A, the RNAhelicase protein MCF-7^{Var E}'s cells showed increased expression levels when compared to MCF-7 parental cells, possibly due to drug resistance (Figure 3A,B). Notwithstanding, eIF4A levels were higher in E2-treated MCF-7 cells compared to their control; in contrast, MCF-7^{Var E} cells show an eIF4A reduction with E2 treatment,

suggesting that E2 has a differential effect on the cell variants. Interestingly, the levels of eIF4A were maintained despite the concomitant treatment of tamoxifen-derived metabolites and E2 (Figure 3A,B).

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

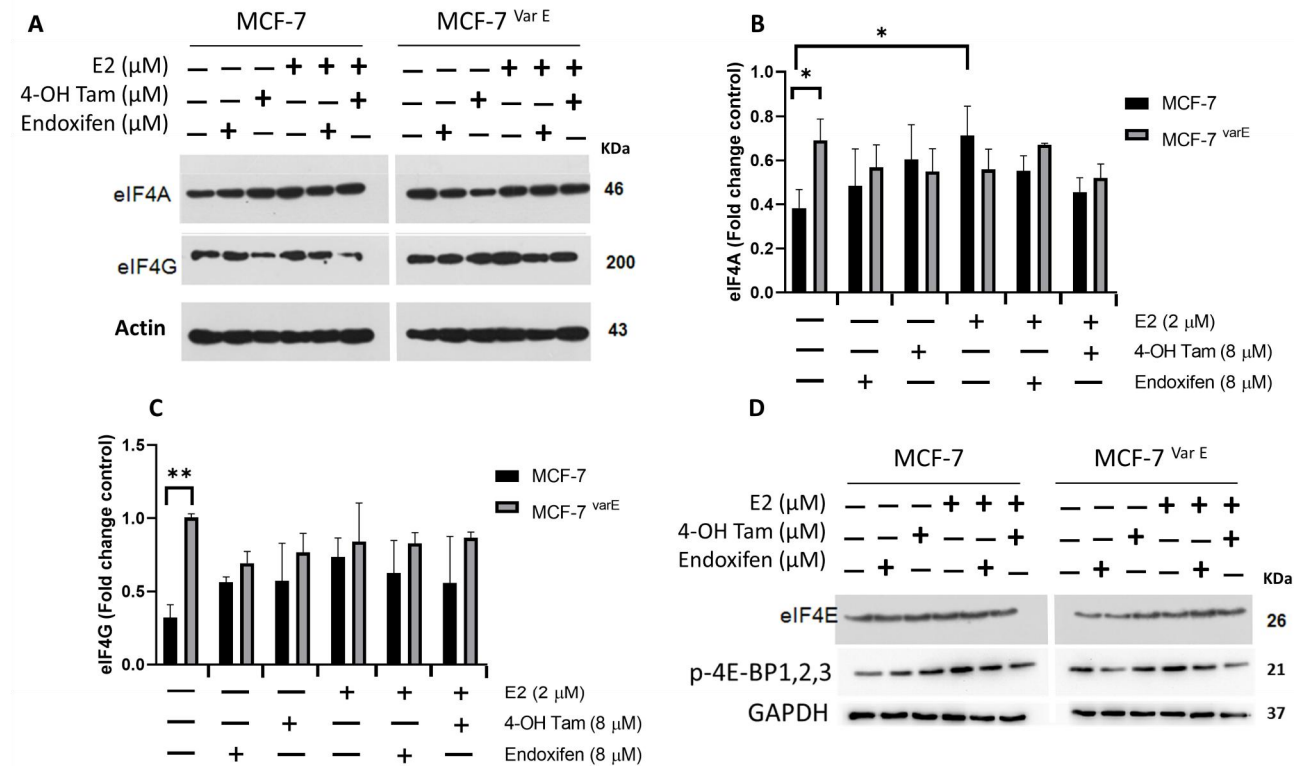


Figure 3. eIF4F complex characterization. (A) Expression of eIF4A and eIF4G targets. The comparative expression between MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells under different treatments, with E2 (2 μ M) and tamoxifen metabolites (8 μ M) for 12 h. Densitometry analysis of eIF4A (B) and eIF4G (C) in MCF-7 and MCF-7^{Var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

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

Evidence suggests a compensatory mechanism to maintain the activity of the complex by potentially increasing the expression of eIF4G and eIF4A. Moreover, the expression of the translation factor is maintained despite tamoxifen-derived treatment and concomitant treatment with E2. eIF4A could remain bound to the eIF4F complex and fulfill its function, a particular feature of the MCF-7^{Var E}-resistant cells. This prompted us to search for strategies for eIF4F regulation, specifically eIF4A and eIF4E, through inhibition by natural compounds, such as coumarins.

3.4. Regulation of eIF4A by Auraptene Binding

Auraptene, a natural coumarin found in citrus fruits, could show promising potential in cancer treatment. According to our results, auraptene may disrupt the translation process through eIF4A inhibition, in turn affecting the expression of proteins involved in cell growth, survival, and potentially chemoresistance. To find if auraptene binds eIF4A, we overexpressed and purified recombinant eIF4A from *Escherichia coli* Rosetta Star strain cultures (Figure 4A,B). Results showed a significant decrease in fluorescence under the interaction of eIF4A (4 μ M) and auraptene at concentrations of 50 μ M and 100 μ M; a reduction in the emission intensity was observed, resulting from a quenching phenomenon, suggesting that auraptene binds with the eIF4A protein (Figure 4C). Molecular docking simulation results suggest that Aur binds eIF4A close to the rocaglamide binding site, as different docking protocols found highly scored auraptene binding poses near the RNA binding site. Critical residues for rocaglamide interaction are also shared, such as Asp330, Leu331, Pro108, and Thr109 (Figure 4D–G). The E-score for values for auraptene was -9.68 Kcal/mol, which was close to rocaglamide's -10.21 (Kcal/mol) (Figure 4H). Additionally, Vina's scoring function allowed us to find an auraptene pose in which the lactone oxygen hydrogen bonds to Arg³³⁴ (Supplementary Figure S4).

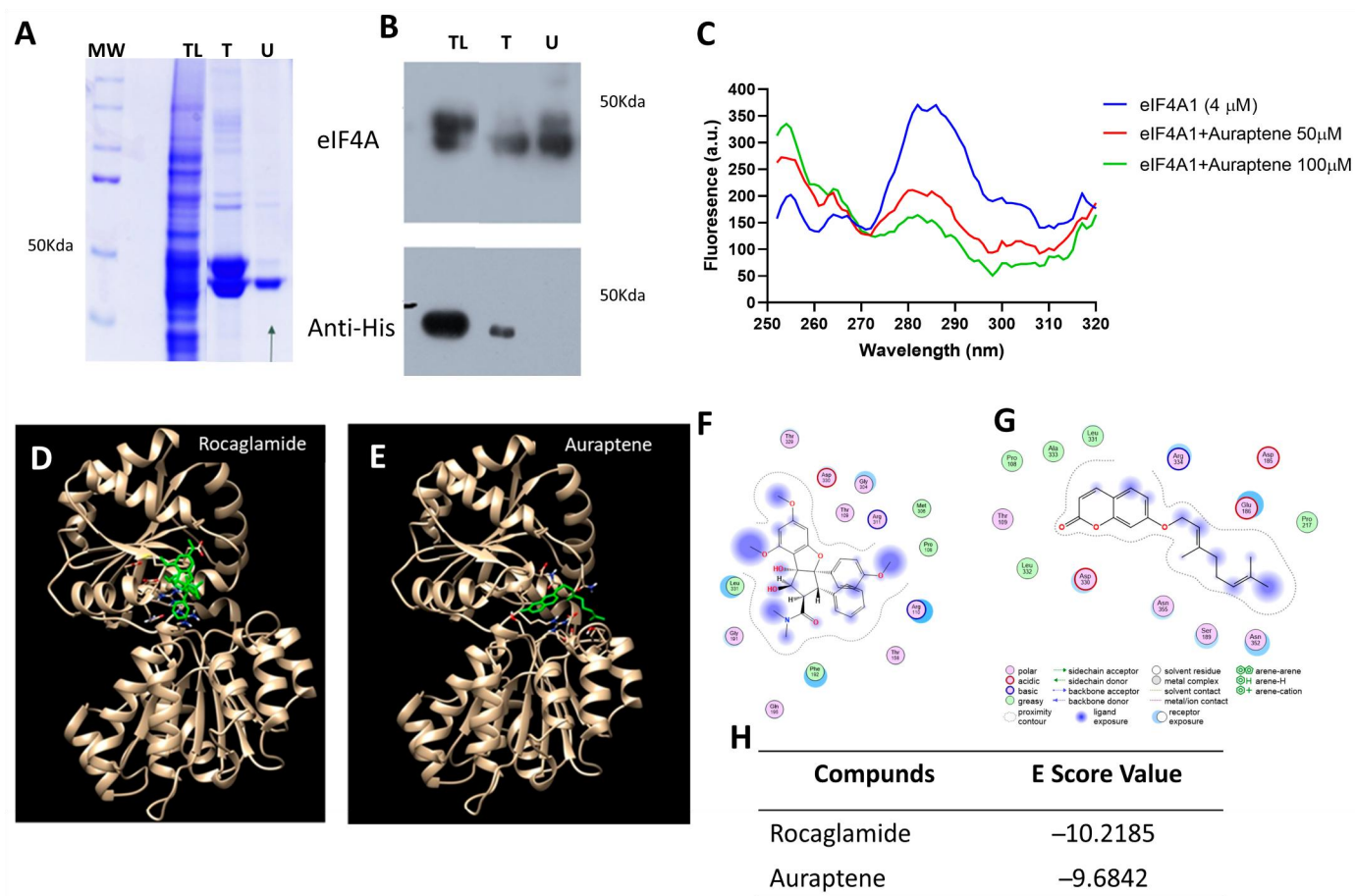


Figure 4. Effect of auraptene on the eIF4A regulation. **(A)** Coomassie-stained SDS-PAGE of eIF4A purified fractions corresponding to TL: total lysate, T: tagged protein, and U: untagged protein. **(B)** Immunodetection for the fractions of eIF4A overexpression. Antibodies to detect eIF4A and polyhistidine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

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

Auraptene is a natural compound which has been proposed to have anticarcinogenic effects in several cancer cell lines [39]; however, it has not been studied in chemoresistant conditions. We thus set out to test the effects of auraptene on MCF-7^{VarE} and MCF-7 cells to evaluate potential synergistic effects with the active tamoxifen metabolites. We employed concentrations below their EC₅₀ values (Figure 5A,D), and active metabolites of tamoxifen, endoxifen, and 4-OH Tam at a concentration of 8 μ M (Figure 5).

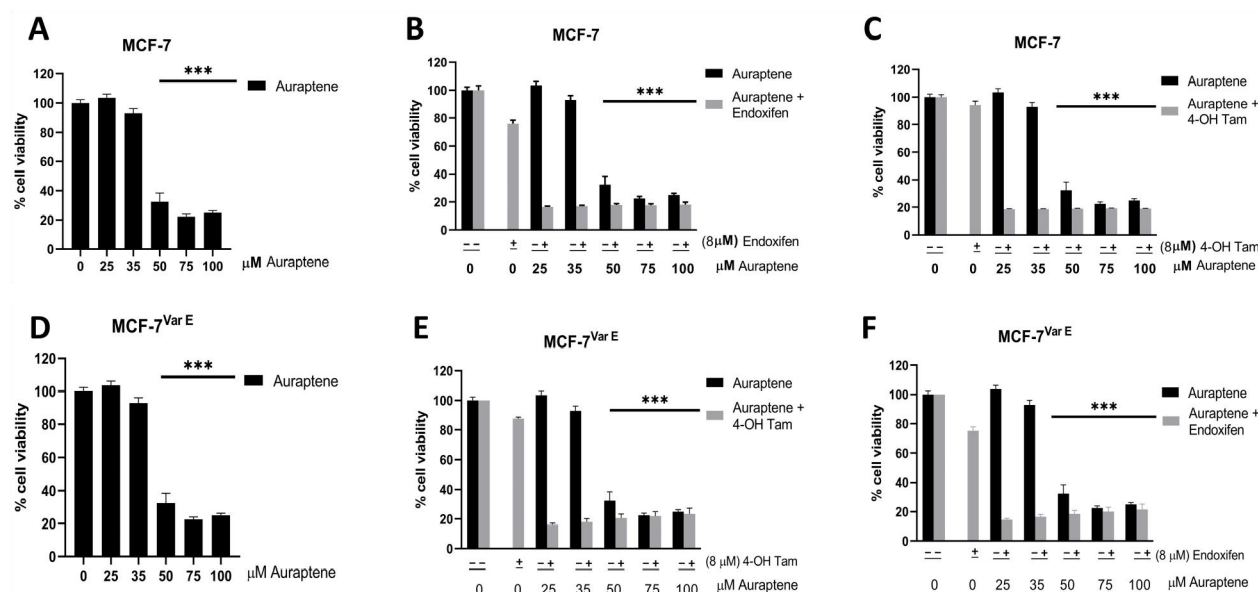


Figure 5. Cell viability of MCF-7 and MCF-7^{VarE} cells with auraptene treatments. Comparison of auraptene and auraptene plus tamoxifen metabolite treatments. Viability percentages of MCF-7 cells under auraptene (A), auraptene and 4-OH tamoxifen (B), and auraptene and endoxifen treatments (C). Results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

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

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

3.6. Auraptene Specificity in ER+ Breast Cancer Cells

To elucidate if the effects of the combined treatments of auraptene with tamoxifenderived metabolites are specific to BC cells that overexpress ER+, the triple-negative breast cancer cell model lacking expression of hormone receptors, MDA-MB-231 (MDA) cell line, which shows the main phenotypic properties of TNBC cancer, was evaluated. The MDA

cell line displayed a higher tolerance to auraptene than the MCF-7 and MCF-7^{Var E} ER+ cell lines, with a viability of 80% observed at the auraptene concentration of 35 μ M (Figure 6).

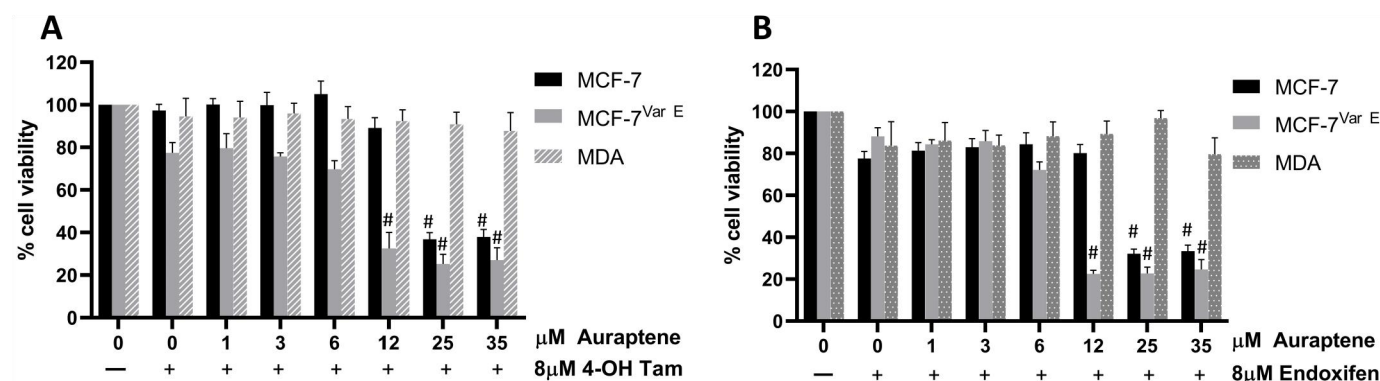


Figure 6. Auraptene and mixed auraptene plus tamoxifen metabolites treatments on ER+ and ER- cell variants. Comparative cell viability percentages of MCF-7, MCF-7^{Var E}, and MDA-MB-231 cells are shown in black, light gray, and pattern gray, respectively, under increasing doses of auraptene plus 4-OH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

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

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

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

Results for endoxifen showed a synergistic effect on MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells, but for the triple-negative cells, it did not show any significant effect (Figure 6B). We registered a reduction in EC₅₀ values in both variants, while the EC₅₀ for auraptene treatment in MCF-7 cells was 47.49 μ M, the impact of endoxifen reduced the EC₅₀ to 13.34 μ M; for MCF-7^{Var E}

cells, the values were 52.4 μM for auraptene treatment, while the concomitant use of endoxifen promoted a reduction to 6.47 μM in EC_{50} . For MDA cells, the EC_{50} value for auraptene was 76.75 μM and the concomitant treatment with endoxifen did not induce a significant therapeutic effect; the EC_{50} value was maintained at 52.68 μM (Figure 6B, Table 1).

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

3.7. Characterization of Auraptene Molecular Mechanism of Resistance

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

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

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

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

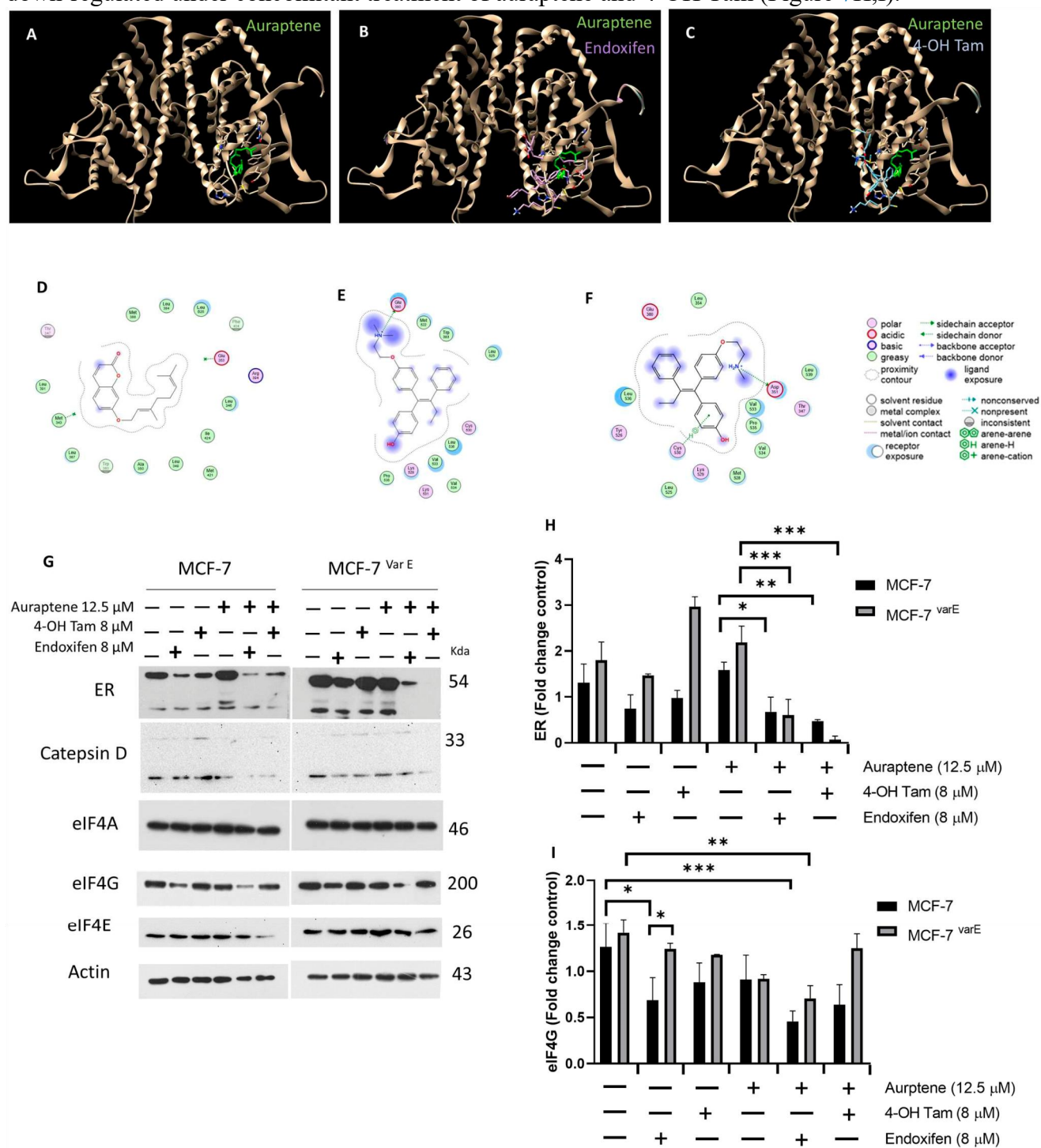


Figure 7. Characterization of eIF4F complex and ER. Molecular docking of molecules of auraptene and tamoxifen metabolites on estrogen receptor. Molecular docking of auraptene that is shown in green (A), endoxifen in purple (B), and 4-OH tamoxifen in light blue (C) on the ER α (PDB: 3ERT). ER α is shown in beige. Binding site residues and their types

of interactions with auraptene (D), endoxifen (E), and 4-OH tamoxifen (F). (G) Comparison between MCF-7 and MCF-7^{Var E} under treatments with metabolites of tamoxifen and auraptene for ER, Catepsin D, eIF4A, eIF4G, and eIF4E. Densitometry analysis of ER (H) and eIF4G (I) in MCF-7 and MCF-7^{Var E} cells under the same conditions. Results are reported as mean \pm SD ($n = 3$) and expressed as fold-change in regard to loading control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$ in regard to control. β -actin and Actin were used as loading controls.

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

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

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

3.9. Pharmacological Potential of Auraptene

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

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

4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

combination with tamoxifen metabolites, may exert regulatory effects on ABCB1 and ABCC1 transporter expression.

5. Conclusions

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

6. Patents

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

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

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

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

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

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

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

References

1. Fragomeni, S.M.; Sciallis, A.; Jeruss, J.S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2018**, *27*, 95–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nair, S.; Sachdeva, G. Estrogen matters in metastasis. *Steroids* **2018**, *138*, 108–116. [[CrossRef](#)]

3. Lim, Y.C.; Desta, Z.; Flockhart, D.A.; Skaar, T.C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *55*, 471–478. [[CrossRef](#)]
[[PubMed](#)]
4. Zahreddine, H.; Borden, K.L. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Marin, J.J.; Monte, M.J.; Blazquez, A.G.; Macias, R.I.; Serrano, M.A.; Briz, O. The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 1–10. [[CrossRef](#)]
6. Chang, M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol. Ther.* **2012**, *20*, 256–267. [[CrossRef](#)]
7. Sodani, K.; Patel, A.; Kathawala, R.J.; Chen, Z.S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin. J. Cancer* **2012**, *31*, 58–72. [[CrossRef](#)]
8. Ali, S.; Coombes, R.C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 101–112. [[CrossRef](#)]
9. Fagan, D.H.; Fetting, L.M.; Avdulov, S.; Beckwith, H.; Peterson, M.S.; Ho, Y.Y.; Wang, F.; Polunovsky, V.A.; Yee, D. Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation. *Horm. Cancer* **2017**, *8*, 219–229. [[CrossRef](#)]
10. Robichaud, N.; Sonenberg, N.; Ruggero, D.; Schneider, R.J. Translational Control in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *11*, a032896. [[CrossRef](#)]
11. Castaneda-Sanchez, C.Y.; Chimal-Vega, B.; Leon-Gutierrez, R.; Araiza-Robles, A.E.; Serafin-Higuera, N.; Pulido-Capiz, A.; Rivero, I.A.; Diaz-Molina, R.; Alatorre-Meda, M.; Rodriguez-Velazquez, E.; et al. Low-Density Lipoproteins Increase Proliferation, Invasion, and Chemoresistance via an Exosome Autocrine Mechanism in MDA-MB-231 Chemoresistant Cells. *Biomedicines* **2024**, *12*, 742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gonzalez-Ortiz, A.; Pulido-Capiz, A.; Castaneda-Sanchez, C.Y.; Ibarra-Lopez, E.; Galindo-Hernandez, O.; Calderon-Fernandez, M.A.; Lopez-Cossio, L.Y.; Diaz-Molina, R.; Chimal-Vega, B.; Serafin-Higuera, N.; et al. eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model. *Cells* **2022**, *11*, 4069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bhat, M.; Robichaud, N.; Hulea, L.; Sonenberg, N.; Pelletier, J.; Topisirovic, I. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 261–278. [[CrossRef](#)]
14. Hembruff, S.L.; Laberge, M.L.; Villeneuve, D.J.; Guo, B.; Veitch, Z.; Cecchetto, M.; Parissenti, A.M. Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 318. [[CrossRef](#)]
15. Naineni, S.K.; Liang, J.; Hull, K.; Cencic, R.; Zhu, M.; Northcote, P.; Teesdale-Spittle, P.; Romo, D.; Nagar, B.; Pelletier, J. Functional mimicry revealed by the crystal structure of an eIF4A:RNA complex bound to the interfacial inhibitor, desmethyl pateamine A. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 825–834.e6. [[CrossRef](#)]
16. Boyer, J.A.; Sharma, M.; Dorso, M.A.; Mai, N.; Amor, C.; Reiter, J.M.; Kannan, R.; Gadal, S.; Xu, J.; Miele, M.; et al. eIF4A controls translation of estrogen receptor alpha and is a therapeutic target in advanced breast cancer. *bioRxiv* **2024**. [[CrossRef](#)]
17. Iwasaki, S.; Iwasaki, W.; Takahashi, M.; Sakamoto, A.; Watanabe, C.; Shichino, Y.; Floor, S.N.; Fujiwara, K.; Mito, M.; Dodo, K.; et al. The Translation Inhibitor Rocaglamide Targets a Bimolecular Cavity between eIF4A and Polypurine RNA. *Mol. Cell* **2019**, *73*, 738–748.e9. [[CrossRef](#)]
18. Naineni, S.K.; Itoua Maiga, R.; Cencic, R.; Putnam, A.A.; Amador, L.A.; Rodriguez, A.D.; Jankowsky, E.; Pelletier, J. A comparative study of small molecules targeting eIF4A. *RNA* **2020**, *26*, 541–549. [[CrossRef](#)]
19. de Medina, P.; Genovese, S.; Paillasse, M.R.; Mazaheri, M.; Caze-Subra, S.; Bystricky, K.; Curini, M.; Silvente-Poirot, S.; Epifano, F.; Poirot, M. Auraptene is an inhibitor of cholesterol esterification and a modulator of estrogen receptors. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 827–836. [[CrossRef](#)]
20. Guevara-Olaya, L.; Chimal-Vega, B.; Castaneda-Sanchez, C.Y.; Lopez-Cossio, L.Y.; Pulido-Capiz, A.; Galindo-Hernandez, O.; Diaz-Molina, R.; Ruiz Esparza-Cisneros, J.; Garcia-Gonzalez, V. LDL Promotes Disorders in beta-Cell Cholesterol Metabolism, Implications on Insulin Cellular Communication Mediated by EVs. *Metabolites* **2022**, *12*, 754. [[CrossRef](#)]

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

45. Zhou, C.; Zhong, Q.; Rhodes, L.V.; Townley, I.; Bratton, M.R.; Zhang, Q.; Martin, E.C.; Elliott, S.; Collins-Burow, B.M.; Burow, M.E.; et al. Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF-7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration. *Breast Cancer Res.* **2012**, *14*, R45. [[CrossRef](#)]
46. Yao, J.; Deng, K.; Huang, J.; Zeng, R.; Zuo, J. Progress in the Understanding of the Mechanism of Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 592912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Avdulov, S.; Li, S.; Michalek, V.; Burrichter, D.; Peterson, M.; Perlman, D.M.; Manivel, J.C.; Sonenberg, N.; Yee, D.; Bitterman, P.B.; et al. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 553–563. [[CrossRef](#)]
48. Ebrahimi, S.; Soukhtanloo, M.; Mostafavi-Pour, Z. Anti-tumor effects of Auraptene through induction of apoptosis and oxidative stress in a mouse model of colorectal cancer. *Tissue Cell* **2023**, *81*, 102004. [[CrossRef](#)]
49. Chisholm, K.; Bray, B.J.; Rosengren, R.J. Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Anticancer Drugs* **2004**, *15*, 889–897. [[CrossRef](#)]
50. van Dyk, L.; Verhoog, N.J.D.; Louw, A. Combinatorial treatments of tamoxifen and SM6Met, an extract from *Cyclopia subternata* Vogel, are superior to either treatment alone in MCF-7 cells. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1017690. [[CrossRef](#)]
51. Gupta, S.V.; Sass, E.J.; Davis, M.E.; Edwards, R.B.; Lozanski, G.; Heerema, N.A.; Lehman, A.; Zhang, X.; Jarjoura, D.; Byrd, J.C.; et al. Resistance to the translation initiation inhibitor silvestrol is mediated by ABCB1/P-glycoprotein overexpression in acute lymphoblastic leukemia cells. *AAPS J.* **2011**, *13*, 357–364. [[CrossRef](#)]

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

Anexo 2



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE
PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE
PATENTES
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE
FORMA

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

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

Asunto: Se informa resultado del examen de forma.

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

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

REF: Se da acuse de recibo a su Solicitud

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

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

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



MX/2024/48682

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



2024
Felipe Carrillo
PUERTO
GOBIERNO DEL ESTADO DE YUCATÁN
SECRETARÍA DE GOBIERNO
DEL ESTADO

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

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

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

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

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

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

ATENTAMENTE
COORDINADOR DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE
FORMA
OMAR SANTIAGO GÁLVEZ CASTILLO.
OSGC/ISG/2024

Anexo 3



Article

eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model

Alina González-Ortiz, Angel Pulido-Capiz, César Y. Castañeda-Sánchez, Esmeralda Ibarra-López, Octavio Galindo-Hernández, Maritza Anahí Calderón-Fernández, Leslie Y. López-Cossio, Raul Díaz-Molina, Brenda Chimal-Vega, Nicolás Serafín-Higuera et al.

Topic

Adaptation Mechanisms in Therapy-Resistant Breast Cancer



Edited by
Prof. Dr. Luisa Alejandra Helguero, Dr. Iola F. Duarte Ciceco and Prof.Dr. Ana M. Gil

eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model

Alina González-Ortiz ^{1,2,†}, Ángel Pulido-Capiz ^{1,3,†}, César Y. Castañeda-Sánchez ^{1,2}, Esmeralda Ibarra-López ^{1,2}, Octavio Galindo-Hernández ^{1,2}, Maritza Anahí Calderón-Fernández ^{1,2}, Leslie Y. López-Cossio ^{1,2}, Raul Díaz-Molina ^{1,2}, Brenda Chimal-Vega ^{1,2}, Nicolás Serafín-Higuera ⁴, Iván Córdova-Guerrero and Victor García-González ^{1,2,*}



Citation: González-Ortiz, A.; Pulido-Capiz, A.; Castañeda-Sánchez, C.Y.; Ibarra-López, E.; Galindo-Hernández, O.; Calderón-Fernández, M.A.; López-Cossio, L.Y.; Díaz-Molina, R.; Chimal-Vega, B.; Serafín-Higuera, N.; et al. eIF4A/PDCD4 Pathway, a Factor for Doxorubicin Chemoresistance in a Triple-Negative Breast Cancer Cell Model. *Cells* **2022**, *11*, 4069. <https://doi.org/10.3390/cells11244069>

Academic Editors: Luisa Alejandra Helguero, Iola F. Duarte Ciceco and Ana M. Gil

Received: 28 July 2022
Accepted: 2 December 2022
Published: 15 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

³ Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico
⁴ Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico
⁵ Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana 22424, Mexico
* Correspondence: vgarcia62@uabc.edu.mx † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Cells employ several adaptive mechanisms under conditions of accelerated cell division, such as the unfolded protein response (UPR). The UPR is composed of a tripartite signaling system that involves ATF6, PERK, and IRE1, which maintain protein homeostasis (proteostasis). However, deregulation of protein translation initiation could be associated with breast cancer (BC) chemoresistance. Specifically, eukaryotic initiation factor-4A (eIF4A) is involved in the unfolding of the secondary structures of several mRNAs at the 5' untranslated region (5'-UTR), as well as in the regulation of targets involved in chemoresistance. Importantly, the tumor suppressor gene PDCD4 could modulate this process. This regulation might be disrupted in chemoresistant triple negative-BC (TNBC) cells. Therefore, we characterized the effect of doxorubicin (Dox), a commonly used anthracycline medication, on human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. Here, we generated and characterized models of Dox chemoresistance, and chemoresistant cells exhibited lower Dox internalization levels followed by alteration of the IRE1 and PERK arms of the UPR and triggering of the antioxidant Nrf2 axis. Critically, chemoresistant cells exhibited PDCD4 downregulation, which coincided with a reduction in eIF4A interaction, suggesting a sophisticated regulation of protein translation. Likewise, Dox-induced chemoresistance was associated with alterations in cellular migration and invasion, which are key cancer hallmarks, coupled with changes in focal adhesion kinase (FAK) activation and secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Moreover, eIF4A knockdown via siRNA and its overexpression in chemoresistant cells suggested that eIF4A regulates FAK. Pro-atherogenic low-density lipoproteins (LDL) promoted cellular invasion in parental and chemoresistant cells in an MMP-9-dependent manner. Moreover, Dox only inhibited parental cell invasion. Significantly, chemoresistance was modulated by cryptotanshinone (Cry), a natural terpene purified from the roots of *Salvia brandegeei*. Cry and Dox co-exposure induced chemosensitization, connected with the Cry effect on eIF4A interaction. We further demonstrated the Cry binding capability on eIF4A and in silico assays suggest Cry inhibition on the RNA-processing domain. Therefore, strategic disruption of protein translation initiation is a druggable pathway by natural compounds during chemoresistance in TNBC. However, plasmatic LDL levels should be closely monitored throughout treatment. **Keywords:** breast cancer; chemoresistance; PDCD4; eIF4A; cryptotanshinone; proteostasis

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico
² Laboratorio Multidisciplinario de Estudios Metabólicos y Cáncer, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico

1. Introduction

Triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for 15% to 20% of annual breast cancer (BC) diagnoses [1]. The name of this condition refers to the fact that the BC cells fail to express estrogen/progesterone receptors as well as human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [2–4], and this type of cancer is diagnosed based on immunohistochemical criteria [2]. TNBC has a poor prognosis due to the lack of specific and effective treatments. TNBC is a highly aggressive cancer with poor clinical outcomes due to its high degree of recurrence and distant metastasis. Therefore, the survival rates of TNBC patients are far lower than those diagnosed with other BC subtypes. Histologically, TNBC is a high-grade invasive carcinoma, and is molecularly classified as a basal phenotype. TNBC is characterized by a low sensitivity to the targeted receptor and endocrine therapies, as well as a high rate of chemoresistance [2,4,5].

The unfolded protein response (UPR) is composed of a tripartite signaling system that regulates gene expression in response to cellular stress and maintains protein homeostasis (proteostasis) through the regulation of protein translation [6]. Accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) lumen triggers the activation of the three UPR transducers, ATF6, PERK, and IRE1, which promote mRNA degradation and translation of chaperones through the activation of the transcription factors ATF6 α , CHOP, and XBP1s, respectively [7]. Critically, these mechanisms are altered in BC cells [8]. Moreover, pathways associated with the UPR and the initiation of protein translation, which is the rate-limiting step in translation, could regulate the acquisition of chemoresistance in TNBC cells [9]. Recent findings have demonstrated that inhibition of proteins involved in translation initiation, specifically the three members of the eIF4F cap-binding complex eIF4E, eIF4G, and eIF4A, promotes sensitization of tumor cells [10].

eIF4F binds 7-methylguanylate at the 5' end of mRNA, thereby modulating protein translation. eIF4A carries out scanning and unwinds the secondary structures of several mRNAs at the 5' untranslated region (5'-UTR), thus promoting binding to the small ribosomal subunit [11]. The assembly of the mature eIF4F complex is modified by the binding of programmed cell death protein 4 (PDCD4) to eIF4A via the MA-3 domain, which could suppress the selective translation of mRNAs [12]. PDCD4 activity is associated with the inhibition of cancer cell proliferation [13], and it is negatively regulated by the cascade of the mTORC1/p70S6K pathway [14]. Although PDCD4 is related to estrogen receptor status [15], its role in TNBC and its association with UPR remain unclear. PDCD4 and eIF4A may become tightly associated during tumor development, and also potentially during drug resistance. In fact, a previous study reported that the ubiquitination and degradation of PDCD4 could increase the migration and invasion of ovarian and endometrial cancer cells [16]. Moreover, enhancing eIF4A activity could promote the translation of oncogenes required for tumor cell growth and survival via the dysregulation of HER2 or FGFR1/2, leading to PI3K/Akt activation and RAS/ERK signaling [17]. In response to ER stress, PERK activation through the pro-survival Nrf2 pathway triggers an intricate transcriptional and translational regulatory response, which ultimately affects the cell cycle [18]. The transcription factor Nrf2 has been identified as a substrate of

PERK kinase, and their interaction mediates the translocation of Nrf2 to the nucleus [18]. Moreover, a connection between the PERK/Nrf2 axis with PDCD4 has been proposed. PDCD4 overexpression in lung tumor cells has been associated with the suppression of the transcriptional activation of Nrf2 through its negative regulator, Keap1 [19]. ER stress adaptations in cancer cells are likely linked to a drug-resistant phenotype. This presumably occurs through the downregulation of tumor suppressor genes such as PDCD4 with an impact on eIF4A and the PERK/Nrf2 axis, thus promoting the survival of cancer cells. Additionally, the activation of IRE1 through X-box-binding protein 1 (*XBPI*) could also contribute to the acquisition of chemoresistance [20].

Doxorubicin (Dox) is a broad-spectrum chemotherapeutic anthracycline drug that was first isolated from *Streptomyces peucetius* spp. [21–23]. Dox is currently used alone or in combination with other drugs to treat blood cancers and solid tumors (e.g., breast and thyroid) [21,24]. Dox inhibits topoisomerase II, interrupting DNA transcription and replication. Moreover, this drug increases the generation of reactive oxygen species, which leads to oxidative damage in DNA, mitochondria, and cell membranes [21–23,25]. TAC [docetaxel (Taxotere), doxorubicin hydrochloride (Adriamycin), and cyclophosphamide] is used as a neoadjuvant therapy in TNBC treatment [26]. Patients who respond to neoadjuvant TAC therapy have shown an excellent prognosis [26]. However, a lack of Dox response may also occur. The acquisition of a chemoresistant phenotype requires tumor cells to undergo molecular, biochemical, and structural adaptations. During this transition, the activation of antioxidant systems, coupled with the expression of specific transporters and detoxifying enzymes associated with the deregulation of the UPR [27], could affect the migration and invasion capability of cancer cells. These hallmarks are linked to the over-activation of the focal adhesion kinase (FAK) pathway and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Moreover, eIF4A-dependent FAK activity could also promote metastasis and chemoresistance.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon associated with an increase in the migratory and invasive capability of cancer cells, which is accompanied by a greater secretion of MMPs; a hallmark of metastasis. Molecules isolated from natural sources or dietary phytochemicals could inhibit these phenomena. For example, arctigenin, baicalin, and carnosol inhibit the signal transduction pathways mediated by TGF- β , the primary regulator of EMT, thus reducing tumor migration and invasion [28,29], with potential implications for FAK activity. Moreover, silvestrol-induced eIF4A inhibition reduces FAK phosphorylation, which is an important driver of cell proliferation [30]. Therefore, eIF4A might regulate FAK activity in TNBC.

Recent evidence has suggested the potential impact of terpene molecules on cancer development [31]. In a previous work, cryptotanshinone (Cry), a terpene molecule isolated from the root of *Salvia brandegeei*, was found to potentially regulate eIF4A [32]. Thus, natural products could inhibit the processes associated with tumor progression and the regulation of chemoresistance. Inhibitors that target specific translation factors in cancer and several diseases have shown promising potential. For example, inhibitors of eIF4E such as 4EGI-1, 4E1RCat, and 4E2RCat have shown anti-tumor effects in preclinical trials [33]. Likewise, Salubrinal (Sal) is a selective inhibitor of p-eIF2 α phosphatase, modulating the PERK arm of UPR through p-eIF2 α inactivation, which inhibits the binding of Met-tRNA^{iMet} to the 40S ribosomal subunit [32].

The development of chemoresistance requires the activation of specific molecular responses such as adaptive proteostasis. Low-density lipoprotein (LDL) dyslipidemia could accelerate the acquisition of chemoresistance in breast cancer, as reported in our previous studies [34,35]. Here, in vitro experiments were conducted using a cellular model of TNBC to understand the mechanisms that link the UPR and Dox-induced chemoresistance. Our results suggested that downregulation of PDCD4 could be one of the hallmarks of acquired chemoresistance, with PDCD4 playing a key role as a modulator of cellular responses associated with the PERK/Nrf2 pathway. Our findings also suggested that the PDCD4/eIF4A axis plays a pivotal role in the regulation of chemoresistance development, and, therefore, novel treatments could be developed by targeting this axis using plant-derived terpenes based in the structure of Cry. More importantly, concomitant treatment with Cry and Dox could inhibit the chemoresistant phenotype in MDA-MB-231 cells. Therefore, strategic disruption of protein translation initiation is an attractive therapeutic target for the treatment of TNBC.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Cell culture reagents were purchased from Thermo-Fisher (Carlsbad, CA, USA), tissue culture plates and other plastic materials were obtained from Corning Inc. (Corning, NY, USA). Salts and buffers were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Doxorubicin (Dox), MTT, salubrinal (Sal) and tunicamycin (Tun) were obtained from Merck.

Antibodies anti-XBP1s and anti-BiP/GRP78 were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti- β actin, anti-CD47, anti-PCNA, anti-eIF4A, anti-PDCD4, anti-c-Jun, anti-MMP-9, anti-Nrf2, anti-BECN1, anti-Mdm2, anti-PERK, anti-CHOP, anti-FAK, anti-p-FAK were obtained from Sta. Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA).

2.2. Cell Culture

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

2.3. Chemoresistance Protocols

To generate a drug-resistant phenotype, MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 0.8×10^6 cells/dish in p100 cell culture dishes. In one protocol, throughout the cell treatment with Dox increasing concentrations (0–100 nM), a resistant variant was obtained during three months of treatment. These cells were cultured in a Dox-maintaining dose (15 nM) based on the protocol reported by Carlisi et al. 2017 [36]. In a second method, we evaluated a scheme of lethal Dox dose (0.5 μ M) for 24 h, later, the Dox treatment was diminished to 12.5 nM for 60 days. The third protocol performed a Dox-increasing dose for 60 days (15–60 nM range). Cellular variants were evaluated by MTT assay. Experimental

conditions were assessed in resistant variants compared with the parental cells. In another report, we considered the IC₂₅ of the parental cells, and cell cultures were incubated with an initial dose of Dox 0.3 μM for 4 days and a recovery period of 20–30 days, this cycle was performed six times. This strategy has allowed defining the role of factor eIF4E on the expression of ABCC transporters during chemoresistance (personal communication).

2.4. Cell Viability

Cell viability was evaluated employing the MTT assay according to previous protocol [37]. Formazan crystals were dissolved in a lysis buffer containing SDS 20% and N,N-dimethylformamide 50% (pH 3.7) for 12 h at 37 °C. Optical density was measured at 570 nm using a microplate reader.

2.5. Western Blot (WB) Analysis

Cell cultures were maintained in proliferation until 90% of confluence. Next, cells were incubated under several treatments. Cells were washed with PBS, and lysed for 35 min at 4 °C with protein buffer lysis supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Further to centrifugation at 4100× g for 10 min, the supernatant was recovered and the protein quantification was carried out using the bicinchoninic acid assay (BCA). Samples (25 μg/lane) from the protein fraction were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% gels and further transferred to PVDF membranes. Next, membranes were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline 0.1% Tween-20 (TBS-T) for 1 h at 37 °C and incubated at 4 °C overnight with the corresponding primary antibody. Following washing with TBS-T, membranes were further incubated for 90 min at 37 °C with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated (HRP) secondary antibodies. Later, membranes were washed with TBS-T, and the HRP activity was detected with the Immobilon Western kit (Millipore, MA, USA). Analysis of immunoblot films was made with the ImageJ software (NIH, Maryland, DC, USA).

2.6. Characterization of Proteins in Extracellular Media

Proteins BiP and XBP1s were characterized in extracellular media by WB. Further to Dox (500 nM) and Sal (25 μM) treatments, extracellular media were recovered and concentrated 10× times by centrifugation (4000 rpm) employing Amicon Ultra-15, 10 kDa disposals. Samples were processed by SDS-PAGE and WB. Loading controls were performed with Coomassie stain on PVDF membranes and β-actin in cellular lysates.

2.7. Immunoprecipitation Assays

Characterization of the complex PDCD4/eIF4A was evaluated by co-immunoprecipitation assay under several schemes. For these immuno-precipitation assays, cellular fractions (300 μg) were incubated with the anti-eIF4A (1:400) for 2 h at 4 °C. Next, immune complexes were precipitated with Protein G Agarose Fast Flow (Millipore) for 12 h at 4 °C, according to a previous protocol [38]. Immuno-precipitated proteins were washed 3 times and suspended in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE gels, and transferred to PVDF

membranes for WB analysis. This same process was corroborated, but now PDCD4 was immuno-precipitated, and eIF4A detection was made.

2.8. Nucleus Isolation

Nuclei separation was carried out using a sucrose (250 mM) and imidazole (3 mM) pH 7.4 buffer, supplemented with protease and phosphatase inhibitors. After the treatments, cells were scraped from culture dishes, and 21 passages were performed through a 22G syringe. For the recovery of nuclei, lysates were centrifuged at 3400 rpm for 15 min.

Two fractions (supernatant and pellet) were lysed for 25 min at 4 °C, and both fractions (20 µg/lane) were analyzed by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes.

Membranes were incubated with primary antibody, and after successive washes, membranes were incubated with specific secondary antibody. HRP activity was detected. β -actin was used as a loading control in several experiments. Lamin B1 and GAPDH were evaluated in the nucleus and cytoplasmic fraction, respectively.

2.9. Evaluation of Cellular Dox-Internalization

Considering the Dox fluorescent properties, this feature was used to quantify Dox concentrations in the cells and supernatant medium under different experiments, both in resistant variants and parental cells.

2.9.1. Cell Cytometer Assays

After 1 h of starvation, cell cultures were incubated under the different treatments in OptiMEM medium in 10 mm wells. Then, cell cultures were washed 2 times with PBS and recovered in a volume of 200 µL. Finally, in cellular characterization was used a Beckman-Coulter cytometer Cytoflex. Using the PC5.5 channel to record the Dox-associated fluorescence, 30,000 events were registered.

2.9.2. Dox Quantification in Supernatant Media

After experimentation, supernatant media were recovered and centrifuged at 5000 rpm for 10 min to eliminate cellular debris. Later, the extracellular media were processed in a Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer (Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA), considering Dox-fluorescent properties (λ_{exc} : 470 nm; and λ_{em} : 595 nm) [39].

2.10. Scratch-Wound Assay

After 2 h of starvation, cultures were washed twice with PBS. Next, cultures were treated with 12 µM mitomycin-C for 2 h to inhibit cell proliferation. Thus, culture dishes were scratch-wounded using a sterile 200-µL pipette tip and washed twice with PBS. Later, cells were exposed to the treatments for 36 h. Finally, cells were fixed and crystal-violet stained; the progress of cell migration into the wound was photographed using an inverted microscope coupled to a digital camera. Cell migration was evaluated by ImageJ software.

2.11. Cellular Invasion Assays

Experiments were performed with the modified Boyden chamber method in 24-well plates containing 12 cell culture inserts (8 µm pore size) (Corning, Inc., New York, NY, USA).

Briefly, 30 μL of matrigel (Corning) was added into culture inserts and kept at 37 °C to form a semisolid matrix. After 2 h of starvation, cells were pre-treated for 2 h with 12 μM mitomycin-C, then cells were seeded into the upper chamber of the Boyden chamber at 1×10^5 cells/well. Treatments were added to the lower chamber. Both the upper and lower chambers contained FBS-free DMEM. After 48 h of incubation, cells on the lower membrane surface were fixed in methanol for 5 min. Membranes were treated with triton 0.01% and stained with hematoxylin. Later, cells were photographed using an inverted microscope.

2.12. Zymography

Cells were incubated under different treatments, and the conditioned medium was collected. Volumes of 40 μL non-heated conditioned medium samples were mixed with 5 \times sample buffer (0.313 M Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glycerol, and 0.05% bromophenol blue) and loaded on 8% polyacrylamide gels copolymerized with gelatin (1% w/v). Gels were rinsed twice with 2.5% Triton X-100 and then incubated in a development buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM CaCl_2 , and 0.02% NaN_3) for 40 h at 37 °C. Gels were fixed and stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10% acetic acid and 30% methanol. Proteolytic activity was detected as clear bands against the background stain of the unprocessed substrate. Likewise, conditioned medium samples were processed by SDS-PAGE, further transferred to PVDF membranes, and MMP-9 WB was done.

2.13. Purification of Tanshinone Molecules

The root of *Salvia brandegeei* as part of the chaparral vegetation was collected in the coordinates 31° 6' 60" N and 116° 16' 9" W, Baja California, Mexico. The dry plant material was subjected to an extraction process by alcoholic maceration. Then, the raw extract was partitioned using solvents of increasing polarity, obtaining four partitions: n-hexane, methylene chloride, water, and butanol. The intermediate polarity extract (methylene chloride) was subjected to flash chromatography, using a mixture of n-hexane/ethyl acetate as eluent. Preparative chromatography on silica gel allowed the isolation of two secondary metabolites belonging to the terpene-tanshinone family: Cry (296.4 g/mol) and tanshinone IIA. Both molecules were identified and characterized by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, a previously reported method [32]. The Cry molecule was more abundant and evaluated in this work.

2.14. Isolation of LDL and Fluorescent Labeling

A human plasma sample was obtained from a healthy donor that signed informed consent. The protocol was designed and carried out according to the Declaration of Helsinki. In the first step, plasma density was adjusted to 1.019 g/mL with KBr and centrifuged at 345,500 \times g for 160 min using a S140-AT 2555 rotor, the VLDL and IDL-containing layer was discarded. Subsequently, density was adjusted to 1.053 g/mL and centrifuged at 377,000 \times g for 200 min; the upper fraction containing LDL was recovered. HDL was isolated, adjusting to a 1.21 g/mL density, and centrifuged at 377,000 \times g for 180 min. LDL preparation was dialyzed against 150 mM NaCl and filtered through 0.45 μm . LDL concentration was measured with the BCA method. The quality of the lipoproteins fraction was evaluated by apoB-100 and apoA1 characterization (data not shown).

LDL labeling was carried out with the dilC18 probe (D3911), which is incorporated in the phospholipid monolayer by incubation of 10 μ L of the probe (2 mg/mL) for each 1 mg of protein-LDL for 18 h at 37 °C, obtaining dil-LDL. Solution density was adjusted to 1.053 g/mL and centrifuged at 377,000 \times g for 3 h to recover fluorescent lipoproteins as previously described [40,41]. The fraction was recovered and dialyzed against PBS1X.

2.15. Molecular Docking eIF4A1 three-dimensional structure was obtained from the Protein Data Bank ID 5ZC9, which corresponds to the structure of human eIF4A1-ATP with a resolution of 2Å [42]. The structures of ligand molecules were obtained from the PubChem database [43], Cry (CID 160254) and rocaglamide (CID 331783). The protein structure was prepared by removing water and small molecules, leaving only the protein structure. Ligand and receptor were 3D-protonated, and energy minimization was performed using Molecular Operating Environment (MOE) software with default parameters under the AMBER89 force field. For the ligand, it generates different conformations by the use of a stochastic search in MOE default parameters. The active site was predicted by employing the site finder option of the MOE software [44]. Molecular docking was set at default parameters for MOE software, and the pre-conformations were employed. For the interpretation of docking results, MOE identifies salt bridges, hydrogen bonds, hydrophobic interactions, sulfur-LP, cation- π , and solvent exposure and gives the S score. Ligand interactions with target proteins were predicted on the basis of the S score [45].

2.16. Small Interfering RNA (siRNA)

Cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/plates and incubated overnight in a standard growth medium without antibiotics. eIF4AI siRNA (h) (sc-40554) and control siRNA-A (sc-37007) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Transfection was performed according to the manufacturer's protocol. After verifying the transfection efficiency by WB, experimentation with Dox and Cry was performed.

2.17. Overexpression of eIF4AI in MDA-MB-231 Variants

The human eIF4AI cDNA (gene accession number NM 001416.4) under the control of CMV-promotor in a pcDNA3.1(+) vector was acquired under the project ID: U533ZGE280-1, clone ID: HP4425A (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Plasmid DNA was transformed into *E. coli* strain DH5 α . Scrapings from colonies were used to inoculate 5 mL of culture medium LB containing 100 μ g/mL ampicillin; these mixtures were grown overnight at 37 °C with agitation. Plasmids were purified from the resulting cultures using E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-TEK) according to the manufacturer's protocol and verified through digestion with restriction enzymes HindIII (GibcoBRL, MD) and BamHI (BRL, MD). The purity and yield of DNA were determined by Nanodrop analysis. Transfections were performed using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Controls were evaluated by WB employing eIF4A monoclonal antibody (ID 2490). The effect of treatments with Dox (500 nM) and Cry (25 μ M) was performed.

2.18. eIF4AI Overexpression and Purification

The gene encoding for *eIF4AI* cDNA (NM 001416.4) under the control of CMVpromotor in a pcDNA3.1(+) vector was acquired under the project ID: U533ZGE280-1, clone ID: HP4425A (GenScript, Waltham, MA, USA). This vector encodes for a 10-His-tag protein and a PreScission Protease (GE, USA) cleavage site. The plasmid was transformed into *E. coli* cells strain Rosseta-Star (Novagen), harboring the pET19b-*eIF4AI* plasmid. Cultures were grown at 37 °C in 2XYT medium complemented with ampicillin (100 µg/mL) to reach an optical density (OD₆₀₀) of 0.6, followed by IPTG (1 mM) induction and further incubation for 12–20 h at 37 °C. After harvesting by centrifugation, cells were disrupted by sonication. The supernatant was obtained and washed with 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 10 mM imidazole buffer. Purification was performed by affinity chromatography (Ni-NTA Agarose resin QIAGEN, Germany). Column was washed with 20 column volumes of 20 mM imidazole, 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), and 600 mM NaCl buffer. The bound protein was eluted with 200 mM imidazole, 20 mM HEPES-KOH, and 100 mM NaCl buffer. The His-tag was removed from *eIF4AI* with PPS (PreScission Protease), the purified protein was dialyzed against PBS 1× buffer pH 8.0 following the manufacturer's protocol. PPS was eliminated by glutathione Sepharose (Merck, Darmstadt, Germany). eIF4AI homogeneity was confirmed by SDS-PAGE with coomassie blue staining and WB. All reactants were molecular biology grade and ultrapure water. Fluorescence measurements were performed with a Cary Eclipse fluorometer, using the following parameters, a scan from 250 to 350 nm at 25 °C in a synchronous mode. We evaluated the interaction protein-ligand, under eIF4A1 (12 µM) and cryptotanshinone (0–80 µM). Solutions were homogenized and incubated for 5 min at 25 °C, measurements were performed in a quartz cell with a path length of 1.0 cm and 500 µL volume.

2.19. Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD. The statistical analyses were conducted with oneway ANOVA. In MTT assays data are expressed as mean ± SD.

3. Results

3.1. Association between UPR and Dox-Induced Chemoresistance

TNBC is a highly aggressive and chemoresistant type of cancer [46], and MDA-MB-231 cell cultures represent an optimal model to evaluate the mechanisms that drive chemoresistance. Therefore, we characterized several protocols to obtain Dox-induced chemoresistant MDA-MB-231 cells (TNBC cells). Specifically, the cells were treated with a lethal Dox dose (0.5 µM) for 24 h, followed by a gradual decrease in Dox dose for 60 days until a dose of 12.5 nM was reached, which led to the generation of a variant that will hereinafter be referred to as “variant B.” As demonstrated by the MTT assay, variant B showed a resistant phenotype (Figure 1A). Upon evaluating Dox internalization through flow cytometry analysis, variant B exhibited a decrease in Dox internalization (Figure 1B). Moreover, higher concentrations of Dox were detected in the supernatant medium of variant B cells compared

with the parental cells according to spectrofluorometric characterization (Figure 1C).

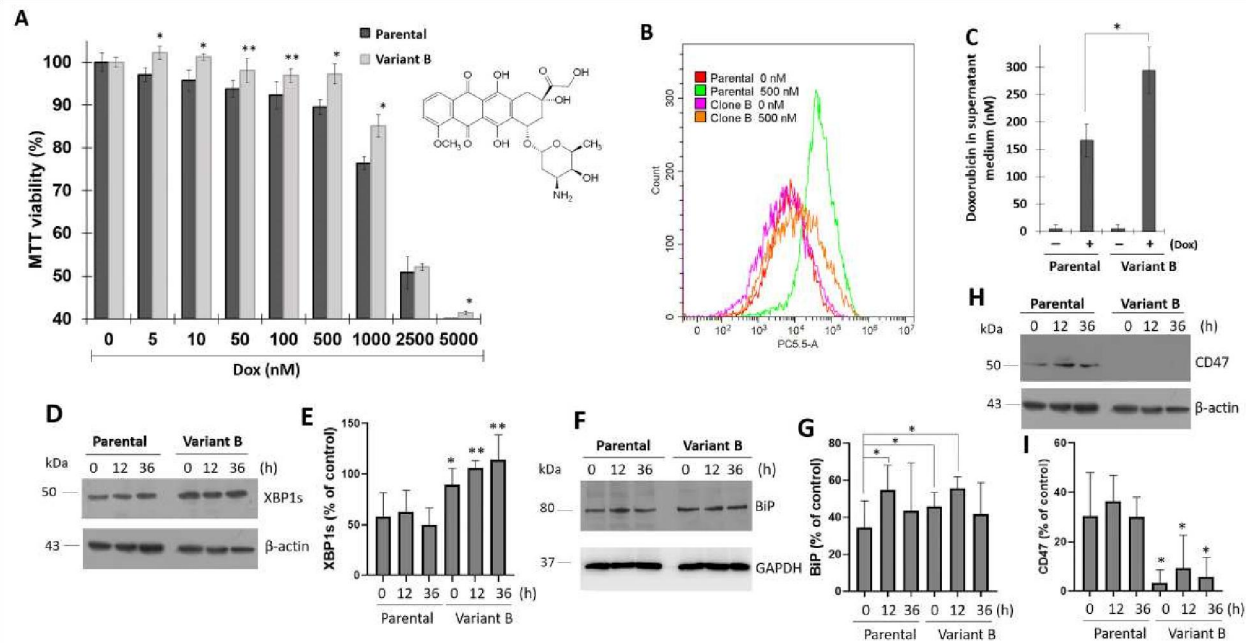


Figure 1. Chemoresistance induced by Doxorubicin (Dox) is associated with UPR activation. **(A)** MTT assay in parental and variant B cells, mean values are presented ($n = 6$, mean \pm SD), * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, respect to variant cells. Dox structure is shown. **(B)** Cytometer analysis under 500 nM of Dox-treatment in parental cells and variant B. Under the same condition, fluorometer analysis of Dox in supernatant medium **(C)**, mean values are presented ($n = 3$, mean \pm SD), * $p < 0.05$ compared to the control. **(D)** WB analysis of XBP1s in a Dox 500 Nm temporal course (0–36 h), densitometry analysis of XBP1s is shown **(E)**. Under the same temporal course, evaluation of BiP **(F,G)** and CD47 expression **(H,I)**. In densitometry analysis of proteins, mean values are presented ($n = 3$, mean \pm SD) and expressed as % of control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. β -actin and GAPDH were used as a loading control.

To gain insights into the role of the UPR in the chemoresistance process, cells were treated with Dox (500 nM) in a time-dependent way (0–36 h). Our findings suggested that transcription factor XBP1s is differentially regulated in variant B, as demonstrated by a significant increase in XBP1s protein expression (Figure 1D,E). When XBP1s becomes activated, this transcription factor translocates to the nucleus and triggers the expression of chaperones, lipid synthesis, and ER-associated degradation genes [47]. In variant B, we identified a strong activation of binding immunoglobulin protein (BiP), a UPR chaperone master regulator (Figure 1F,G). This was consistent with one of our previous studies, in which metabolic inflammation induced ER stress [48]. Chaperones such as heat shock proteins are associated with key cancer hallmarks such as cell proliferation, invasion, and metastasis [49]. Furthermore, this phenomenon was associated with a reduced expression of CD47 (Figure 1H,I), a target gene related to migratory and invasion hallmarks [50]. Although increased invasion is a common feature of drug resistance, recent evidence has demonstrated the occurrence of the opposite effect. Specifically, a previous study reported a reduction in the migratory capacity of docetaxel-resistant prostate cells compared to the parental cells [51]. Whether this behavior can be promoted or inhibited may depend mainly on the resistance mechanisms of a specific cell type and the tumor microenvironment. Therefore, migratory capacity could have been impaired in variant B.

3.2. Cell Migratory Capacity Is Associated with the Disruption of the PDCD4 Tumor

Suppressor Gene

Scratch-wound assays were conducted to characterize cell migration, as this is one of the main hallmarks of cancer onset and progression. The resistant variant B exhibited a marked decrease in migratory capacity compared to the parental cells. This was consistent with the UPR deregulation observed in resistant variant B (Figure 2A,D), according to CD47 expression. However, Dox treatment (500 nM) decreased the migratory capability of both variants (Figure 2B,E). Sal (25 μ M) ameliorated the chemoresistance-inducing effects of Dox (Figure 2C,F), as suggested by the results of a semi-quantitative analysis (Figure 2G). Additionally, MMP-9 activity was also evaluated in extracellular media, and our findings demonstrated a decrease in MMP-9-mediated collagen degradation in variant B. Gel silver stain was used as a loading control in our experiments (Figure 2H).

Next, the disruption of the IRE1 arm by XBP1s in the chemoresistant variant B was confirmed. Our results suggested a connection between the activation of XBP1s, the expression of chaperone BiP, and the effect of Sal-treatment in variant B (Figure 2I,J). The opposite was observed in another variant with a sensitive phenotype (variant F). Specifically, the cells did not exhibit XBP1s overexpression and their Dox internalization levels were similar to those of the parental cells (Supplementary Figure S1). These results indicated the induction of an adaptive UPR in chemoresistant variant B. As expected, when Dox intracellular levels were evaluated by flow cytometry, a high Dox signal was observed in the parental cells compared to variant B (Figure 2K,L), which could explain the chemoresistance of the latter. Sal treatment induced a slight reduction in intracellular Dox signals in both models (Figure 2K,L), which was associated with the protective results described above.

Moreover, our findings broadened the potential association between BiP and the ER stress response in instances of cell damage. Specifically, increased secretion of BiP has been associated with the depletion of ER calcium [52]. Here, we detected the presence of BiP in the extracellular medium of the parental and variant B cell cultures (Figure 2M). This response was cell-specific, with BiP levels being lower in the resistant variant. Tunicamycin (Tum), a potent ER stress inducer, was used as a control (Supplementary Figure S2). We have previously reported the importance of chaperones such as PDI in the process of chemoresistance [48], as well as the potential involvement of the transcription factor XBP1s, a transducer of the IRE1 arm (Supplementary Figure S3). Therefore, we are currently elucidating the role of these proteostasis elements in the extracellular environment in conjunction with BiP (personal communication). Given that protein translation is a crucial mechanism associated with the activation of the UPR [53] and potentially also chemoresistance, we evaluated the expression of eIF4A, a key translation initiation factor. No significant changes in eIF4A expression were observed in the parental and variant B cells even under Dox and Sal exposure (Figure 2N). The basal expression of the tumor suppressor gene PDCD4 remained consistently high in parental cells and our data suggested that cell division control mechanisms were still likely present. Although mainly Dox treatment could promote mechanisms that sensitize the chemoresistance, PDCD4 expression was not modified in the parental cells. In contrast, PDCD4 was markedly downregulated in variant B (Figure 2N,O).

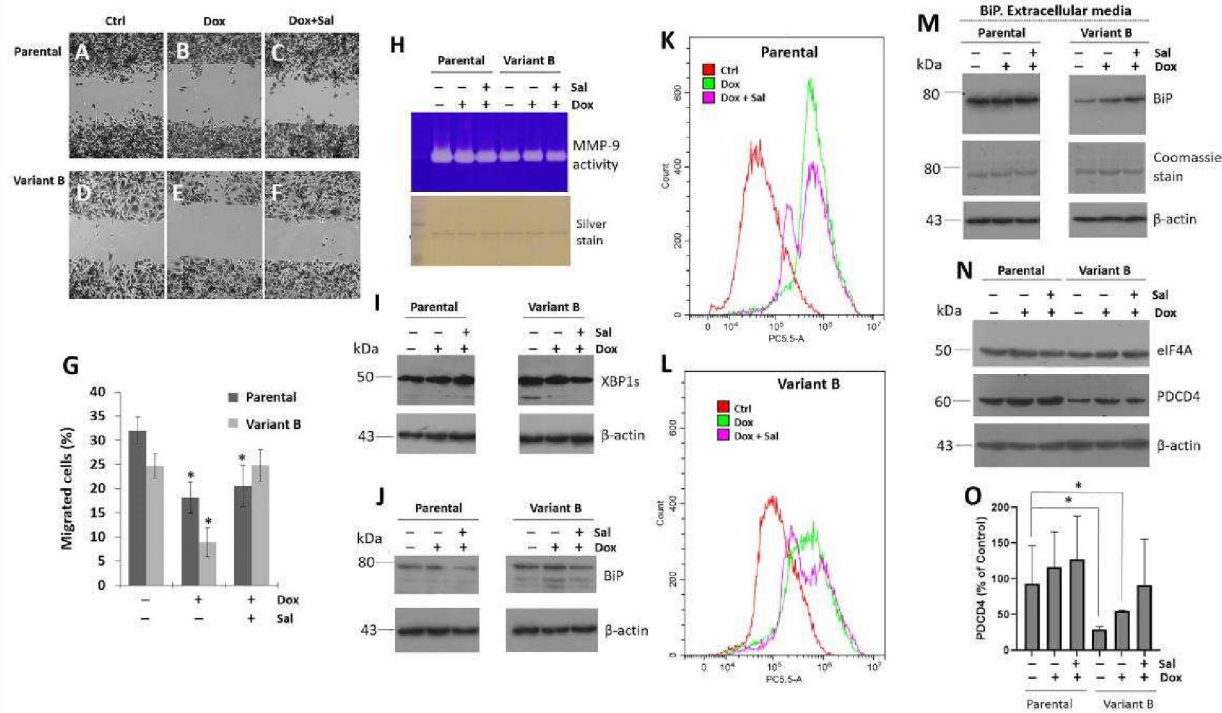


Figure 2. Chemoresistant cells showed a reduced migratory capacity coupled with PDCD4 dysregulation. Representative images of the wound-healing assay in parental cells corresponding to control (A), Dox treatment (500 nM) (B), and concomitant Dox (500 nM) and Sal (25 μ M) treatment (C). The same assay in variant B, control (D), Dox treatment (E), and concomitant Dox and Sal (F). (G) Wound-healing results expressed as percentage respect to controls in parental and variant B cells. Mean values are presented (n = 3, mean \pm SD); * $p < 0.01$ respect to controls. (H) Under the same conditions, MMP-9 secretion was analyzed on a conditioned medium using gelatin-substrate gels. The silver stain was employed as a loading control. WB analysis of XBP1s (I) and BiP (J) on parental cells and variant B, under treatment with Dox (500 nM) and Sal (25 μ M). Dox characterization by cytometer analysis in parental cells (K) and variant B (L) under Dox (500 nM) and Sal treatment (25 μ M). (M) BiP expression in extracellular media of parental cells and variant B under Dox (500 nM) and Sal treatment (25 μ M). β -actin and Coomassie stain on PVDF membranes were used as controls. (N) At the same conditions, WB of eIF4A and PDCD4. (O) Densitometry analysis of PDCD4, results are reported as mean \pm SD (n = 3) and expressed as % of control; * $p < 0.05$ respect to control. β -actin was used as a loading control in WB experiments.

3.3. Characterization of the Role of the Tumor Suppressor Gene PDCD4

To the best of our knowledge, no previous studies have characterized the role of PDCD4 on ER stress and its connection with cancer chemoresistance. PDCD4 deficiency has only been associated with low ER stress levels in a murine model [40]. The reduction of PDCD4 in variant B could alleviate ER stress or promote adaptations related to its tumor suppressor function. Therefore, we next sought to characterize the expression of PDCD4 and eIF4A under Dox treatment (0–100 nM). Specifically, we characterized the basal expression of eIF4A in both variants and confirmed that PDCD4 was exclusively downregulated in variant B (Figure 3A,B). Furthermore, upon exposing the cells to a broad range of Dox concentrations (0–2500 nM), PDCD4 was critically downregulated in both variants at 2500 nM (Figure 3C), which was possibly associated with extensive cellular damage. Under the same conditions, Dox dose-dependently induced a gradual reduction in MMP-9 activity, which coincided with the impairment of cellular migration and invasion (Figure 3D). In

turn, this confirmed the occurrence of cellular damage, with these effects being more evident in parental cells. Finally, we evaluated the interaction between PDCD4 and eIF4A by co-immunoprecipitation. In both variants, Dox decreased the protein interaction signal in a dose-dependent manner (Figure 3E).

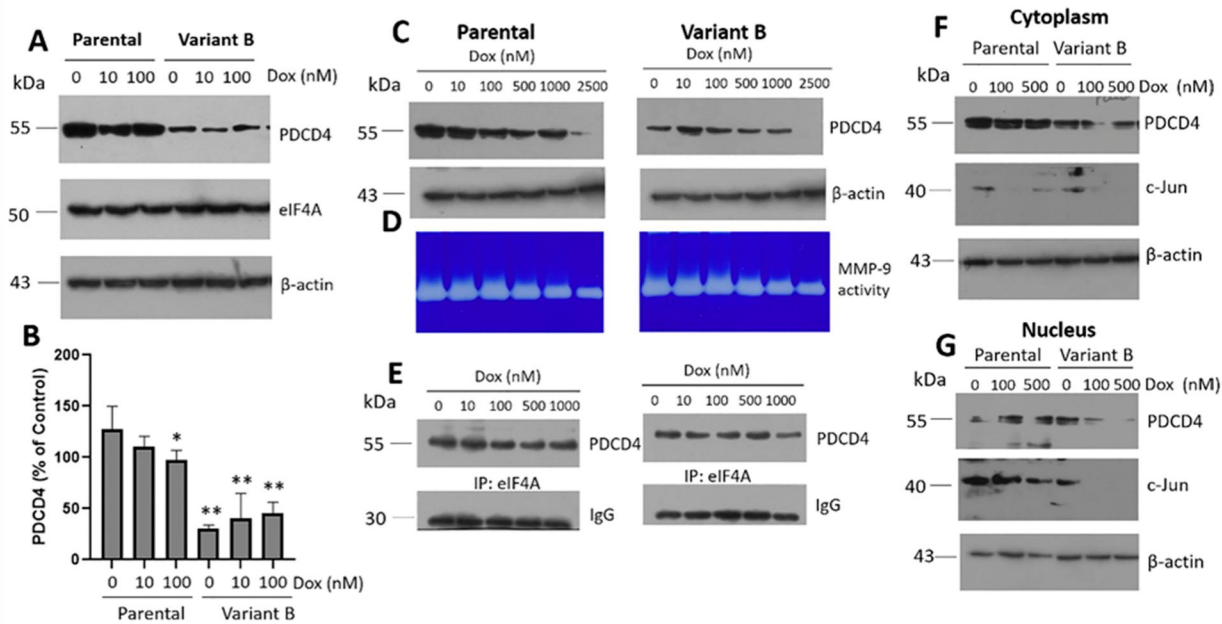


Figure 3. Doxorubicin (Dox) induces the disruption of PDCD4/eIF4A complex. **(A)** WB of PDCD4 and eIF4A under 10 and 100 nM Dox treatment in parental cells and variant B. **(B)** Densitometry analysis of PDCD4, results are reported as mean \pm SD ($n = 3$) and expressed as % of control; * $p < 0.1$, ** $p < 0.001$ respect to control of parental cells. **(C)** PDCD4 expression is affected by increasing doses of Dox (0–2500 nM) in both, parental and variant B cells. Under the same conditions, MMP-9 secretion was analyzed on a conditioned medium using gelatin-substrate gels **(D)** and the interaction of PDCD4/eIF4A complex **(E)**. **(F,G)** Cellular localization of PDCD4 and c-Jun in parental and variant B cells, under increasing concentrations of Dox (0–500 nM). β -actin was used as a loading control, and Lamin B1 in nucleus fractions.

Although low PDCD4 expression levels were observed in variant B, these effects were not related to changes in eIF4A interaction. PDCD4 expression was impaired in variant B, and previous studies have reported that chemoresistance is linked to PDCD4 depletion [54]. Therefore, the regulation of eIF4A expression and the downregulation of PDCD4 are critical during chemoresistance, as these mechanisms enable the maintenance of cellular latency. In this regard, PDCD4 expression in breast cancer cells could thus be regulated by non-coding RNAs, ubiquitin-proteasome activity, and inflammation [55].

Our study also characterized the cellular localization of PDCD4 in the cytoplasm and nucleus fractions under different Dox concentrations (0–500 nM) (Figure 3F,G). PDCD4 appeared to be mainly localized in the cytoplasmic fraction of both the parental and variant B cells, suggesting that the activity of this protein was primarily cytosolic. In cancer cells, decreases in nuclear PDCD4 have been correlated with tumor progression [56]. In line with this notion, MMP-9 expression could depend on the transcription factor AP-1, a heterodimer composed of c-Fos and c-Jun. Our results indicated that Dox dose-dependently decreased the expression of c-Jun in the nucleus extracts of both cellular variants (Figure 3F,G), which possibly explains the changes in MMP-9 secretion in the extracellular medium. Although a regulatory mechanism mediated by the AP-1 complex and, therefore c-Jun is carried out, other mechanisms could have also been involved, including the activity

of the tumor suppressor DACH1 (Dachshund Homolog 1) [57], miR-194-5p [58], and decreases in sirtuin 6 [59]. Moreover, a potential association between PDCD4 and c-Jun signaling was suggested by the expression of miR-21, which promotes the migration, invasion, and angiogenic capacity of renal carcinoma cells [60].

3.4. Small Molecule Treatment Can Desensitize the Chemoresistance of BC Cells

To counteract the chemoresistance of BC cells and elucidate the role of the eIF4F complex, the therapeutic and sensitizing effects of several molecules were evaluated under a low dose of Dox (100 nM) to avoid the side effects associated with high Dox doses [61], and proposing a potential sensitizing effect of candidate molecules. Considering the regulatory impacts of Cry on eIF4A [32], we next isolated this terpene from the root of *Salvia brandegeei*. Tum was used as a control. In our first experiment, we confirmed the decrease of PDCD4 expression in variant B (Figure 4A). Likewise, Cry treatment decreased the expression of the PDCD4-eIF4A complex in both variants. Moreover, Cry (25 μ M) and Dox (100 nM) synergistically affected cell viability (Figure 4B), which was likely due to an interaction between Cry on eIF4A, which in turn affects PDCD4/eIF4A interactions. This effect was not observed under Sal treatment (25 μ M) (Figure 4A,B), possibly associated with the inability to eIF4A binding. Finally, we examined the effect of Tum treatment (Figure 4A), and variant B was found to be more resistant to Tum than the parent cells (Figure 4B).

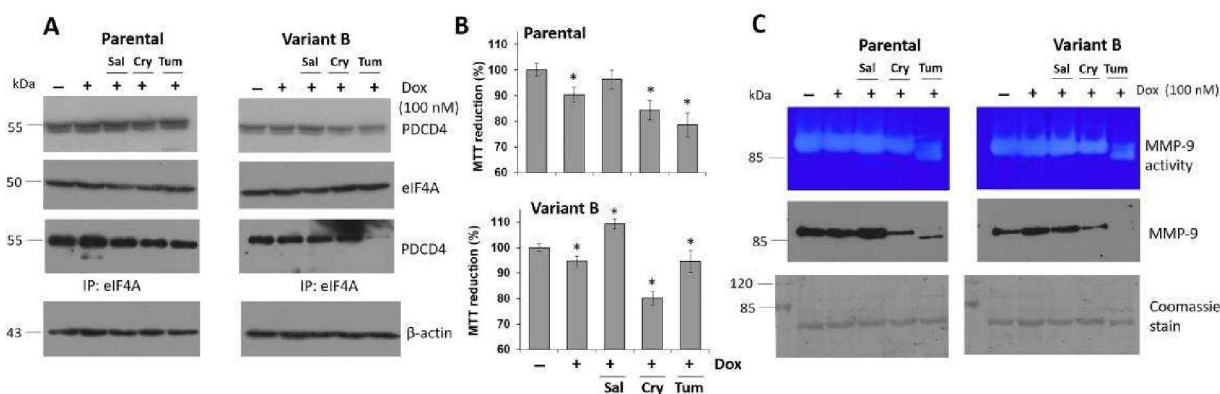


Figure 4. Chemoresistance is regulated by a terpene-derived molecule and ER-stress inducer compound. **(A)** Effect of concomitant Dox (100 nM) treatment with Salubrinal (Sal) (25 μ M), Cryptotanshinone (Cry) (25 μ M), and Tunicamycin (Tum) (1 μ g/mL) on the expression of eIF4A, PDCD4, and characterization of protein interaction. **(B)** Employing the same conditions, cellular viability was evaluated in parental and variant B cells under the Dox treatment with Sal, Cry, and Tum. Mean values are presented (n = 6, mean \pm SD), * $p < 0.005$ with respect to the control. **(C)** MMP-9 secretion was analyzed on supernatant medium using gelatin-substrate gels and the MMP-9 expression by WB. Membranes were processed by Coomassie stain as a loading control.

Next, we evaluated the impacts of the aforementioned treatments coupled with Dox on MMP-9 expression, which is associated with cell invasion. Cry and Tum treatments + Dox evidently affected MMP-9 activity (Figure 4C), as demonstrated by the quantification of MMP-9-mediated collagen degradation (Supplementary Figure S4A). Likewise, the cytotoxicity of Cry and Tum was confirmed by optical microscopy in both variants

(Supplementary Figure S4B–G), which was manifested as a reduction in cell density. Western blot analysis of MMP-9 in the extracellular media confirmed the zymogram results under Cry and Tum treatments coupled with Dox. Specifically, we identified changes in the glycosylation pattern of MMP-9 (90 kDa) in the samples treated with Tum, an inhibitor of protein Nglycosylation, with the parental variant showing a lower protein band of approximately 85 kDa, as well as the same molecular weight band on zymogram gels (Figure 4C). Similar patterns have been reported for other proteins such as cyclooxygenase-2 under inflammatory conditions induced by lipopolysaccharide treatment [41]. Sal incubation did not induce significant changes in MMP-9 activity and expression. In fact, MMP-9 levels were slightly higher compared to the controls, which confirms the protective properties of Sal.

3.5. Relevance of PERK/Nrf2 and Regulation by Terpene-Derived Molecules

We evaluated the effect of small molecules on the PERK-signaling by the expression of pro-survival Nrf2, results suggest an increased activation of the PERK arm in variant B (Figure 5A), which was likely a compensatory cellular response. Nrf2 triggers the expression of genes involved in stress resistance and mitochondrial biogenesis [62]. Critically, Nrf2 activation was suppressed under concomitant Dox (250 nM) + Cry (25 μ M) and Tum (1 μ g/mL) treatments. In lung tumor cells that overexpressed PDCD4, the transcriptional activation of Nrf2 was inhibited [19]. Importantly, these findings were consistent with our observations in chemoresistant variant B, wherein PDCD4 downregulation coincided with Nrf2 activation. Moreover, an increase in the activation of XBP1s in variant B was also confirmed as an experimental control (Figure 5A).

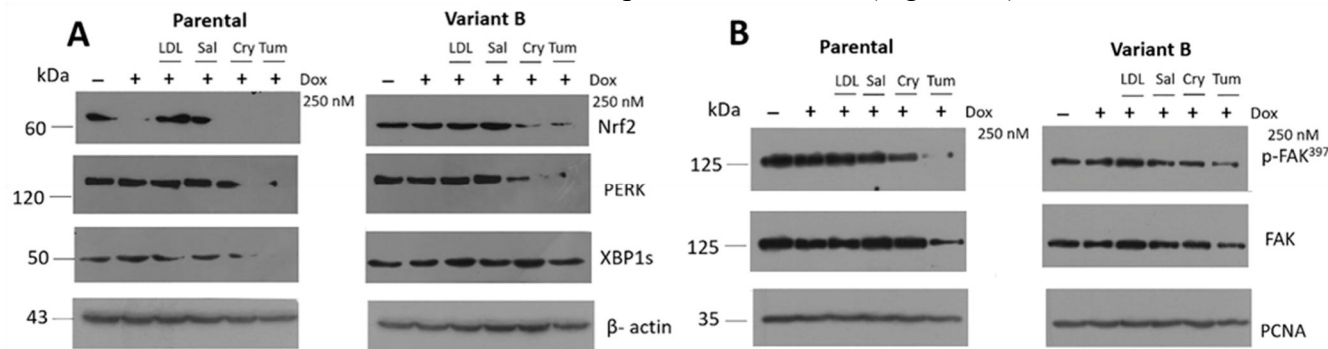


Figure 5. Doxorubicin (Dox) chemoresistance is associated with PERK/Nrf2 activation and regulated by cryptotanshinone (Cry). **(A)** Expression of Nrf2 under the Dox treatment (250 nM) and concomitant LDL (10 μ g/mL), Sal (25 μ M), Cry (25 μ M), and Tum (1 μ g/mL) in parental and variant B cells. In this experiment, XBPIs role was confirmed in variant B. β -actin was used as a loading control. **(B)** Under the same conditions, characterization of FAK pathway, evaluated by the expression of FAK and its phosphorylation at Tyr-397 (p-FAK³⁹⁷). PCNA was used as a loading control.

Several phenomena such as migration, adhesion, and proliferation have been associated with the overexpression of UPR-associated genes such as BiP, PERK, and the target of cellular adhesion FAK in a colorectal cancer model [50]. Similarly, FAK activation (pFAK³⁹⁷) was differentially regulated in our study (Figure 5B), with parental cells exhibiting higher levels of FAK expression and p-FAK activation, suggesting a higher migration activity (Figure 2) and possibly a higher invasion capacity. However, Cry

treatment significantly diminished p-FAK in both variants (Figure 5B). Our previous results indicated that chemotherapy resistance could modulate adaptive mechanisms associated with the UPR in cancer cells. This phenomenon coincided with MMP-9 secretion (Figures 2H and 4C) and FAK activation (Figure 5B), suggesting a crucial role of proteostasis and targets regulating translation initiation such as the translation initiation factor eIF4A.

3.6. Regulation of Cell Invasion by Cry Treatment

Considering the differential regulation of FAK in parental cells and variant B, we next characterized the invasion capacity of BC cells via the Boyden chamber method. We previously reported the critical impact of intracellular lipid pathways on BC development. Specifically, LDL cholesterol could promote cell invasion by triggering epithelial-mesenchymal transition [34,35]. Therefore, LDL treatments were performed to evaluate the putative role of LDL as a potentiator of cellular invasion. Our flow cytometry analyses demonstrated the occurrence of LDL endocytosis in parental and variant B cells (Figure 6A,B). In the control condition, the invasion capability of both clones remained at basal levels (Figure 6C,G).

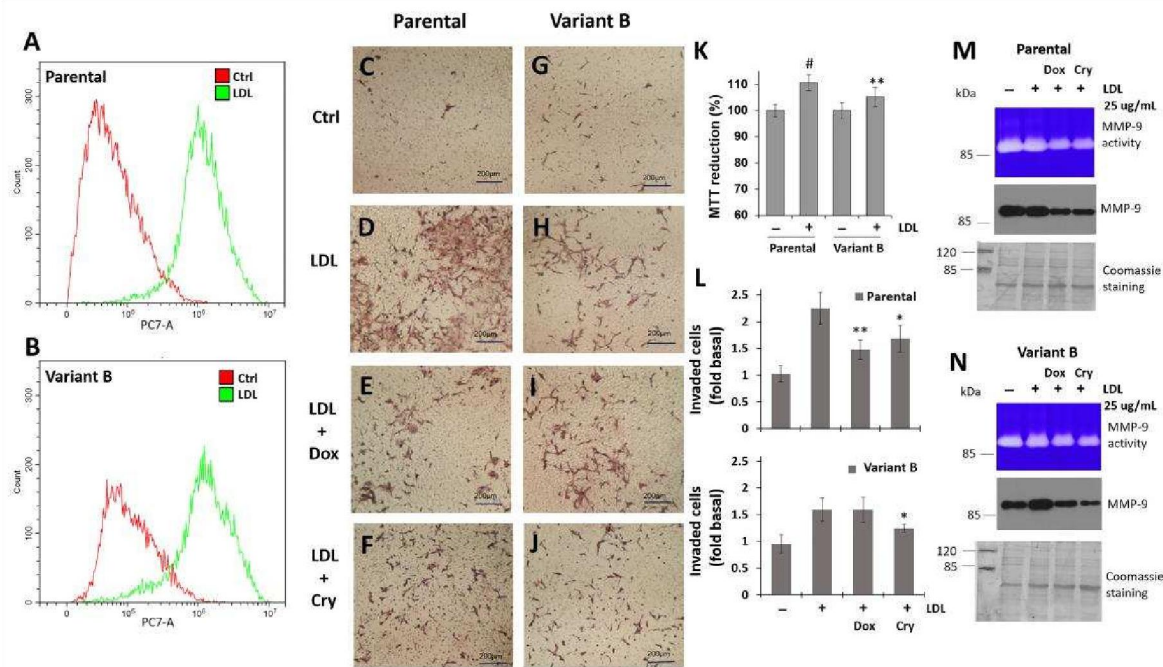


Figure 6. Cry treatment inhibits LDL-induced cellular invasion. DiI-LDL internalization by cytometer analysis in parental (A) and variant B (B) cells. Representative images of invasion experiments were obtained by optical microscopy, employing Boyden chambers. In parental cells, representative image corresponding to control (C), LDL treatment (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (D), LDL and Dox (500 nM) (E), LDL and Cry (25 μM) (F). The same assays showed in variant B, control (G), LDL treatment (H), LDL and Dox (I), LDL and Cry (J). Bars correspond to 200 μm . (K) Cellular viability in the two variants under the LDL treatment (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Mean values are presented ($n = 3$, mean \pm SD), # $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ with respect to control. (L) Semi-quantitative analysis of invasion experiments in parental and variant B cells, graphs are expressed as the fold of control. Mean values are presented ($n = 3$, mean \pm SD),

* $p < 0.05$ with respect to LDL treatment, ** $p < 0.01$ with respect to LDL treatment. Effect of Dox (500 nM) and Cry (25 μM) on LDL induced-MMP-9 secretion in parental (M) and variant B (N) cells, activity was analyzed on the supernatant

medium using zymogram gels and the expression of MMP-9 by WB. Membranes were processed with Coomassie stain as an experimental loading control.

LDL treatment increased the invasion capacity of the parental cells (Figure 6D) compared with the variant B cells (Figure 6H), which was attributed to an increase in the expression and activation of FAK according to our previous results. Critically, we observed an increase in cellular viability promoted by LDL treatment on both variants (Figure 6K). However, the concomitant Dox (Figure 6E,L) and Cry (Figure 6F,L) treatments significantly decreased the invasion capacity of the parental cells. Dox treatment did not affect the invasion capacity of variant B (Figure 6I,L), whereas Cry treatment did (Figure 6J,L). Moreover, to gain insights into the mechanisms through which Dox (500 nM) and Cry (25 μ M) modulate LDL-induced invasion, the critical MMP-9 target was characterized. Our findings indicated that LDL promoted an increase in MMP-9 secretion and activity (Figure 6M,N) in both the parental and variant B cells. In contrast, Cry treatment markedly decreased MMP-9 secretion in both variants (Figure 6M,N). Collectively, our results suggested that LDL treatment promotes the cellular invasion capacity of both parental and variant B cells, whereas Cry exerts the opposite effect on this key cancer hallmark by inhibiting MMP-9.

3.7. Modulation of eIF4A on Oncogenic Factor FAK

Upon exploring the impact of eIF4A1 (the main isoform) on the chemoresistance process and considering the regulatory role of therapeutic small molecules such as Cry, we next performed experiments to evaluate the effects of modulating eIF4A1 expression. Using siRNA (80 nM), eIF4A1 was successfully knocked-down after treating parental and variant B cells for 24 h (Figure 7A,B). Specifically, eIF4A expression was decreased by 55% and 40% in the parental and variant B cells, respectively (Figure 7B). As a complementary assay, lactate was quantified as an indicator of energetic metabolism; primarily, the siRNA effect takes place in parental cells (Figure 7C). Several studies have reported that cancer cells exhibit an increased glucose uptake and lactate secretion due to metabolic abnormalities, which is referred to as the Warburg effect [63]. Here, siRNA-affectation in lactate secretion was coupled with modifications of cellular density mainly in parental cells (Figure 7D,E) compared to variant-B cells (Figure 7F,G).

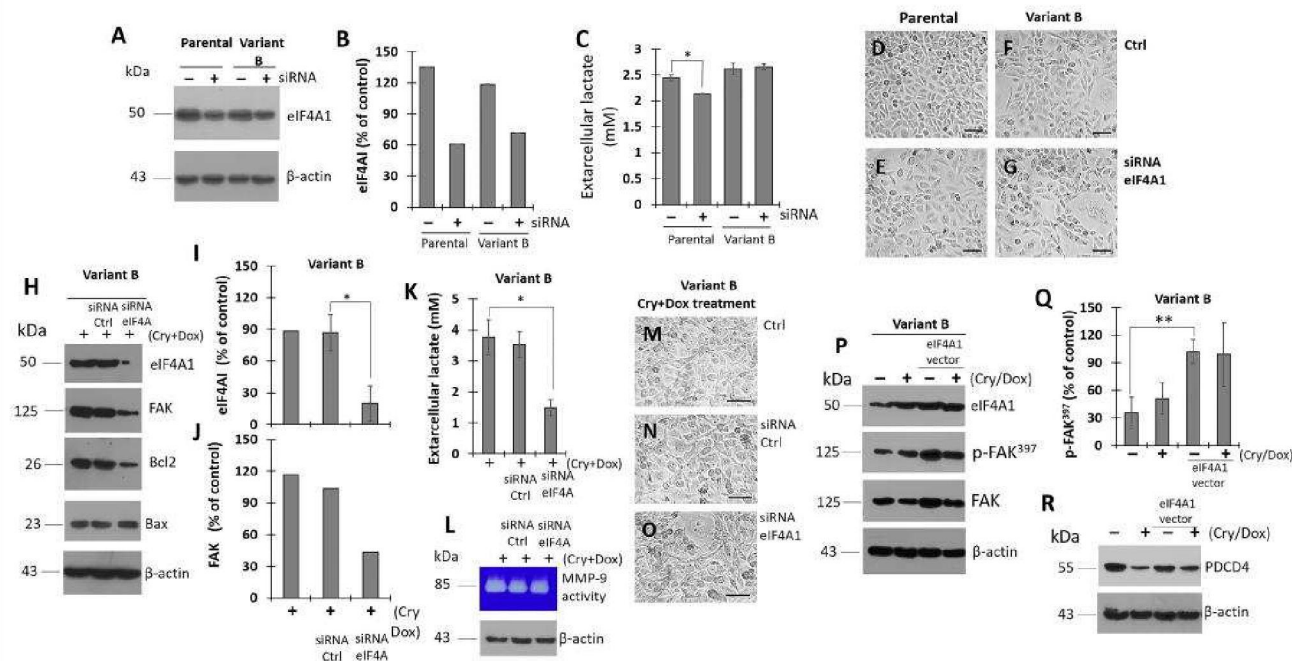


Figure 7. Regulation of eIF4A on FAK is inhibited by concomitant treatment of Dox and Cry. Efficiency of siRNA incubation (80 nM) on the expression of eIF4A1 in parental and variant B at 24 h. **(A)** WB of eIF4A1 in parental cells and variant B and densitometry analysis of eIF4A1 **(B)**; **(C)** under the same conditions, lactate concentrations in supernatant media, results are reported as mean \pm SD (n = 3), * $p < 0.01$, respect to control. Optical microscopy images corresponding to control **(D)** and siRNA-eIF4A treated parental cells **(E)**; for variant B, control cells **(F)** and siRNA-eIF4A1 treatment **(G)**. In controls, the transfection vehicle was evaluated. Bars correspond to 200 μ m. **(H)** Effect of siRNA-eIF4A1 on the expression of FAK, Bcl2 and Bax under the concomitant treatment of Cry (25 μ M) and Dox (500 nM) for 60 h in variant B; densitometry analysis of eIF4A1 **(I)** and FAK **(J)**, results are reported as mean \pm SD (n = 3) and expressed as % of control; * $p < 0.01$ respect to control. Under the same transfection conditions and concomitant Cry and Dox treatment, evaluation of lactate in supernatant media (* $p < 0.01$ respect to control) **(K)**, MMP-9 activity **(L)**, and representative cellular images of control **(M)**, siRNA control **(N)**, and eIF4A1-siRNA **(O)**. Bars correspond to 200 μ m. **(P)** Effect of the eIF4A1 overexpression on FAK expression and activity (p-FAK³⁹⁷) employing an eIF4A1 vector (GenScript, ID: U533ZGE280-1). Results showed the effect of Cry (25 μ M) and Dox (500 nM) treatment for 24 h. **(Q)** densitometry analysis of p-FAK³⁹⁷, results are reported as mean \pm SD (n = 3) and expressed as % of control; ** $p < 0.05$ respect to control. **(R)** Under the same conditions, WB of factor PDCD4. In panels A, H, L, P, and R, β -actin was used as a loading control.

To gain insights into the regulation of chemoresistance and the role of eIF4A, we next focused on the characterization of the chemoresistant variant B. Our data suggested that concomitant Cry (25 μ M) and Dox (500 nM) treatment (Figure 7H) resulted in an almost complete knockdown of eIF4A, reaching a residual expression level (22%) compared with the control (Figure 7I). Critically, this result was consistent with the expression of FAK (Figure 7H,J). Moreover, eIF4A knockdown was linked to cell damage, as evidenced by changes in lactate levels (Figure 7K), MMP-9 activity (Figure 7L), and optical microscopy (Figure 7M–O). Additionally, eIF4A1 was overexpressed to corroborate the association between eIF4A and FAK. eIF4A overexpression was achieved after 25 h of treatment (Figure 7P). Importantly, eIF4A levels were correlated with FAK expression and activation (Figure 7P,Q). Afterward, we confirmed the effect of Cry (25 μ M) and Dox (500 nM) treatment on eIF4A expression. Based on our previous results, we identified an inverse

association between PDCD4 and eIF4A (Figure 7R). Therefore, our findings confirmed that eIF4A, a regulator of protein translation, is crucial for proteostasis.

3.8. Cryptotanshinone Mechanism Is Mediated by eIF4A Interaction

We next sought to characterize the regulatory effect of Cry on eIF4A (Figure 8). Therefore, the overexpression of eIF4A was evaluated in several strains of *E. coli* under a variety of experimental conditions. The BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3), and Rosetta-Start *E. coli* strains harboring plasmid pET-19b-mod-eIF4A were examined to select the optimal host for protein production. The Rosetta-Star strain had the best protein production yield. Proteins were obtained from the soluble fraction and purified by affinity chromatography, after which the PreScission protease was used to remove His tags (Figure 8A). Our process was validated through western blot analyses in several samples, confirming a pure fraction corresponding to eIF4A1. The purity of the isolated soluble protein was higher than 90% (Figure 8A). Therefore, we next performed protein-ligand interaction assays using a fluorescence-based method. Purified eIF4A protein (12 μ M) and Cry (0–80 μ M) were incubated at 25 °C for fluorescent synchronic characterization, and an emission peak was detected near 285 nm. Incubation with Cry resulted in a quenching phenomenon, suggesting that Cry interacted with eIF4A1 (Figure 8B). Particularly, a critical reduction in fluorescence values was observed at a Cry concentration of 20 μ M and quenching was evident at a Cry/eIF4A molar ratio of 4:1.

Based on the evaluation of the crystal structure of the human eIF4A1-ATP-rocaglamide (RocA)-polypurine RNA complex (PDB: 5ZC9), our docking results indicated that the Cry interaction site was highly similar to the Rocaglamide (RocA), a selective eIF4A inhibitor [64]. Specifically, RocA and Cry shared several interaction residues including Arg₁₁₀, Thr₁₅₈, Phe₁₉₂, and Gly₃₀₄ (Figure 8C–F), thus explaining their interaction with eIF4A. Our analyses indicated that the Cry binding site is similar to the RocA interaction domain on the eIF4A structure, thus inhibiting the RNA binding capability of eIF4A [47]. The Phe₁₉₂ and Thr₁₅₈ residues could establish hydrophobic interactions, whereas Arg₁₁₀ and Arg₃₁₁ promoted ionic interactions on the Cry structure (Figure 8D). In turn, these interactions are critical to maintaining a high binding capability, and explain the changes in the spectroscopic properties of eIF4A1 (Figure 8B). According to our molecular docking results, the S score of Cry was lower (–8.19) than that of RocA (–10.04). Moreover, crystallographic data suggested the critical role of hydrogen bonds and strong π - π and CH/ π interactions between RocA-Gln₁₉₅ and RocA-G₈, which significantly contributed to complex formation, as well as the stabilizing role of Phe₁₉₂ [64]. Critically, both Gln₁₉₅ and Phe₁₉₂ could stabilize the Cry interactions in the eIF4A1 structure (Figure 8C,D). Therefore, our results suggest that Cry interacts with the RNA-binding domain of eIF4A1, which could serve as a basis for the development of novel therapeutic molecules based on the structure of Cry.

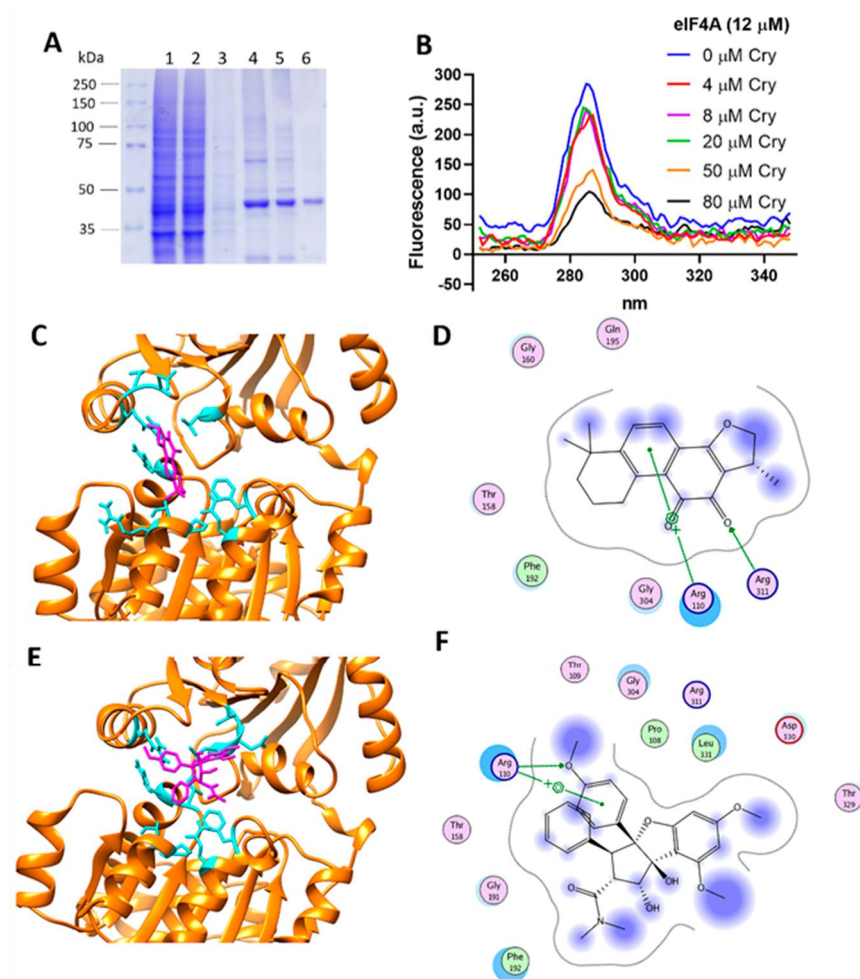


Figure 8. Cryptotanshinone (Cry) binds to translation initiation factor eIF4A1. **(A)** SDS-PAGE electrophoresis of eIF4A1 purification showing the affinity chromatography results. Lane 1: overexpression of eIF4A1; lane 2, flow-through fraction; lane 3 washing buffer with an imidazole 20 mM, lane 4 purified protein, Lane 5 and 6: His-tag cleavage with PPS after 16 h incubation. Protein of lane 6 was used in the experiments. **(B)** Binding experimentation evaluated by a synchronic mode fluorescence. A scan from 250 to 350 nm at 25 °C is showed, under eIF4A1 (12 μM) and Cry (0–80 μM) incubation. **(C)** Representative snapshot corresponding to the crystallographic structure of the eIF4A1·ATP PDB ID: 5ZC9 (yellow) under the Cry (magenta) interaction, obtained by molecular docking. Interaction showed a -8.19 S value. **(D)** Residues that define the eIF4A/Cry interactions. **(E)** As a control, a representative snapshot of the eIF4A1·ATP (yellow) under the RocA (magenta) interaction. Interaction showed a -10.04 S value. **(F)** Residues that define the eIF4A/RocA interactions.

4. Discussion

The accelerated proliferation of tumor cells combined with an inflammatory microenvironment leads to an impairment of protein synthesis. In these cases, the activation of UPR arms has been found to drive chemoresistance in several types of tumors [65]. Our results confirmed an association between UPR and chemoresistance. In the chemoresistant variant B, we observed changes in the transcription factors XBP1s and Nrf2 associated with IRE1 and PERK arms of UPR, respectively. Although a previous study characterized XBP1s in cells exhibiting the luminal/ER+ BC subtype [66], the role of XBP1s in TNBC models has not been described in detail. Moreover, chaperone BiP overexpression has been implicated in cancer cell survival, proliferation, migration, and

chemoresistance [67]. Additionally, the silencing of chaperone BiP can decrease the efflux activity of ABC transporters and the antioxidant response, thereby impairing the chemoresistant phenotype [68]. This evidence supports the results described in chemoresistant variant B, and, therefore, the UPR and chaperones may be contributing factors to the acquisition of Dox-induced chemoresistance. Sal has been evaluated as a promising anti-neoplastic therapy. In previous reports, Sal treatment increased cell death in BC cells. This mechanism could be dependent on the maintenance of p-eIF2 α phosphorylation, thereby blocking protein translation [69]. Likewise, Sal treatment enhanced the radiation sensitivity of estrogen receptor cells [70]. Notably, we observed the opposite response in Sal-treated chemoresistant TNBC cells, which was attributed to compensatory mechanisms that can lead to a subtle inhibition in protein translation. A previous study reported that the anticancer properties of Sal are mediated by an upregulation of PDI, a multifunctional redox chaperone of the ER [71]. Likewise, Sal reduced the apoptotic CHOP levels induced by lithocholic acid in prostate cancer cells [72]. The downregulation of PDCD4 was one of the critical factors determining the chemoresistant capabilities of BC cells. Our results demonstrated that Dox-induced chemoresistance was linked to the downregulation of PDCD4 in variant B cells, which promotes the invasion and metastasis of tumor cells. A recent study characterized the dynamic relationship between PDCD4 and EMT-associated proteins, and the suppression of PDCD4 was correlated with increased cell invasion, a key cancer hallmark [73]. Additionally, the deletion of PDCD4 contributed to the development of chemoresistance in models of glioblastoma multiforme [54]. These findings are consistent with the results of our TNBC model. Specifically, PDCD4 could regulate the expression of Sin1, p53, E-cadherin, CMyb, and AMyb, which are targets involved in controlling neoplastic processes such as motility, invasion, and cell growth [42–44]. These observations could explain the results of our TNBC model experiments. Moreover, our results indicated that PDCD4 was mainly localized in the cytoplasm, and the subtle regulation of the interactions of eIF4A suggests that this process was highly regulated even at high Dox concentrations. Similarly, a reduction in the levels of nuclear PDCD4 in lung carcinoma cells was linked to tumor progression [56], which was consistent with our findings. Ubiquitination and proteasome degradation of PDCD4 through E3 ubiquitin ligase has been described in ovarian and endometrial cancer cells [16]. Likewise, HER2 activation could promote the loss of PDCD4 by activating MAPK, AKT, and miR-21 in aromatase inhibitor-resistant BC cells [55]. Therefore, these mechanisms could contribute to sustaining the expression of PDCD4. Our research group is currently characterizing the impact of the mTOR/p70S6K signaling pathway on PDCD4 expression. There is a potential association between cancer hallmarks (e.g., migration and invasion), ER stress and the UPR, and this connection could be mediated by chaperones such as BiP and the triggering of transcription factors such as Nrf2 and XBP1s. Here, we demonstrated that the chaperone BiP was localized in the extracellular media. Furthermore, our data suggest the role of regulation on FAK activation and MMP-9 secretion; moreover, these phenomena could be driven by high LDL concentrations. Likewise, we evaluated the regulatory role of Cry using Sal and Tum as references. In this regard, the potential role of eIF4A is the novel data. In this regard, the significance of the eIF4A approach is supported by the pro-oncogenic and pro-survival mRNAs dependent on eIF4A processing [74]. For instance, the activation of CXCR4 signaling, one of the most significant chemokine receptors involved in BC metastasis, increased the

reliance on eIF4A translation of the oncoproteins ROCK1, survivin, Mdm2, and cyclin D1 [75]. Critically, eIF4A could mediate EMT, which is associated with tumor cell invasion and metastasis [76]. Aberrant activation of FAK signal transduction in tumor cells is correlated with their invasion ability and potential effects on metastasis. Our results suggested that eIF4A affects the expression and activation of FAK, as demonstrated by siRNA knockdown and overexpression experiments in the TNBC variants (Figure 7). This association suggests that FAK expression depends on the activation of eIF4A. In turn, this phenomenon could be mediated by the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. These data are highly relevant, as metastasis remains the primary cause of morbidity and mortality in cancer patients [77].

Moreover, ApoB-lipoproteins (VLDL, IDL, and LDL) and their components modulate intracellular metabolism and have been associated with the development of neoplastic phenomena such as proliferation, anchorage-independent growth, epithelial-mesenchymal transition, and cancer invasion [34].

In gastric tumor cells, FAK-silencing accentuated the effect of 5-fluorouracil, which was associated with the activation of caspase-3 activity [78]. Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells have been reported to exhibit high activation of p-FAK (Tyr³⁹⁷), and inhibitory RNAi treatment increases gemcitabine-induced cytotoxicity [79]. In our conditions, concomitant Dox/Cry and Dox/Tum treatments synergistically inhibited p-FAK³⁹⁷.

Particularly, Dox/Cry treatment exhibited the strongest inhibitory effects on the FAK expression of both parental and variant B cells. Co-treatment with Cry (25 μ M) and low Dox concentrations (250–500 nM) thus constitutes a promising sensitizing treatment for regulating FAK signaling. Therefore, FAK-regulated mechanisms impact the sensitivity of anti-tumoral treatments. This highlights the relevance of our data, as cancer relapse after chemotherapy remains one of the leading causes of death [80]. Importantly, our study was the first to describe the dependence of FAK on eIF4A. eIF4A overexpression induced malignant progression in an acute lymphocytic leukemia model [81]. Moreover, given that the Sal treatments rendered unpromising results, we explored alternatives to sensitize cancer cells. Several small molecules known to disrupt eIF4A RNA helicase have been reported to possess anticancer activity both in vitro and in vivo, including rocaglates, hippuristanol, rohinitib, and pateamine A (PatA) [82,83]. PatA, a macrolide marine compound, could slightly inhibit cap-dependent translation in chronic lymphocytic leukemia cells [84], thus highlighting the promising therapeutic potential of molecules derived from natural products. In our study, the novel combination of Cry and Dox exhibited synergistic anticancer activity against TNBC cells, re-establishing the sensitivity of Dox-resistant cells and impairing the viability of parental cells. This suggests the importance of pharmacologic eIF4A inhibition mediated by Cry. Moreover, selective compounds inhibit the translation of oncogenic gene drivers by increasing the affinity between eIF4A and specific polypurine sequence motifs in the 5'UTR [17].

The chemosensitization of Cry and the effect on FAK regulation have important implications in crucial processes such as migration and invasion, both of which are associated with metastasis. Previous studies have suggested that the chemoresistance phenotype could modify the migratory and invasion capacities of cancer cells. In this regard, FAK is a non-receptor protein kinase involved in tumor migration, adhesion, invasion, and metastasis [85]. Therefore, FAK Tyr³⁹⁷ phosphorylation maximizes its

catalytic activity, thus inducing the phosphorylation of several downstream targets [86], which could be modulated by eIF4A.

Our group previously characterized the role of LDL hypercholesterolemia on the process of epithelial-mesenchymal transition and its connection with cancer hallmarks such as metastasis and chemoresistance [34]. LDL endocytosis and the induction of invasion capability dependent on LDL were observed in both variants. We have previously discussed the role of targets that regulate cholesterol metabolism, including de novo synthesis, endocytosis, and oxidation, which contribute to cancer development. Specifically, we discussed the mechanisms associated with sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2)/mevalonate, as well as metabolites derived from cholesterol oxidation, such as oxysterols and epoxy-cholesterols [34].

According to our findings, high levels of pro-atherogenic LDL could promote invasiveness and chemoresistance, which we have characterized in other subtypes. Previous studies have also proposed that metabolic alterations play a central role in the chemoresistance of cancer cells [34]. Therefore, LDL dyslipidemia is a critical condition to consider during the establishment of regime treatments and its efficacy evolution.

Cry is one of the primary active constituents isolated from the root of *Salvia brandegeei*, and our findings demonstrated that Cry + Dox co-exposure could effectively sensitize TNBC cell variants, even more, when eIF4A was overexpressed in variant B cells. Our data confirmed the interaction between Cry and eIF4A through fluorescence characterization. Additionally, our molecular docking analyses suggested that this interaction likely interferes with the RNA binding domain. These findings have critical implications for the expression of oncogenic drivers. Therefore, our data suggest that the specific disruption of protein synthesis is a promising therapeutic strategy for the treatment of aggressive cancers such as TNBC.

5. Conclusions

Our results suggest that the UPR is an adaptive mechanism that is crucial for the acquisition of chemoresistance. Therefore, the PDCD4/eIF4A/FAK signaling pathway constitutes a crucial basis for the discovery and characterization of novel cancer drug targets. Moreover, new therapeutic strategies could be developed based on the structure of cryptotanshinone derived from natural sources. Metabolic factors such as LDL dyslipidemia could also potentiate the development of chemoresistance and impact the efficacy of anti-cancer treatments. More importantly, the chemoresistance of variant B in our study confirmed that novel therapeutic approaches can be developed based on the regulation of protein translation initiation factors.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11244069/s1>, Supplementary Figure S1. Behavior of sensitive variant F. Supplementary Figure S2. Localization of BiP in extracellular media of parental and variant B cells. Supplementary Figure S3. Localization of XBP1s in extracellular media of parental and variant B cells. Supplementary Figure S4. Phenotypic characterization of parental and variant B cells under concomitant Cry/Dox and Tum/Dox.

Author Contributions: Conceptualization, O.G.-H., R.D.-M. and V.G.-G.; Methodology, A.P.-C., C.Y.C.-S., E.I.-L., M.A.C.-F., L.Y.L.-C. and B.C.-V.; Investigation, A.G.-O., A.P.-C., C.Y.C.-S., E.I.-L., M.A.C.-F., L.Y.L.-C., B.C.-V., N.S.-H., I.C.-G. and V.G.-G.; Writing—original draft, A.G.-O., O.G.-H., R.D.-M. and V.G.-G.; Project administration,

A.G.-O. and B.C.-V.; Funding acquisition, V.G.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CB 2017-2018 (A1-S-28653/SEP/CONACYT); 21a. Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación (Coordinación General de Posgrado e Investigación/UABC).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from one subject involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: A.G.-O., C.Y.C.-S., E.I.-L., M.A.C.-F. and L.Y.L.-C. are medical degree, they performed their social-service in Biochemistry Department, Facultad de Medicina Mexicali. The authors recognize the administrative support of Josue Villegas Sandoval and Liliana García-Hernández, as well as Roberto León-Gutierrez for editorial services. Authors recognize the antibody donations of Sta. Cruz Biotechnology Inc (anti-PCNA, anti-BECN1 and anti-PERK).

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

References

1. Rigracciolo, D.C.; Nohata, N.; Lappano, R.; Cirillo, F.; Talia, M.; Scordamaglia, D.; Gutkind, J.S.; Maggiolini, M. IGF-1/IGF1R/FAK/YAP Transduction Signaling Prompts Growth Effects in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Cells. *Cells* **2020**, *9*, 1010. [[CrossRef](#)]
2. Nedeljkovic, M.; Damjanovic, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells* **2019**, *8*, 957. [[CrossRef](#)]
3. Vagia, E.; Mahalingam, D.; Cristofanilli, M. The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers* **2020**, *12*, 916. [[CrossRef](#)]
4. Shen, M.; Pan, H.; Chen, Y.; Xu, Y.H.; Yang, W.; Wu, Z. A review of current progress in triple-negative breast cancer therapy. *Open Med.* **2020**, *15*, 1143–1149. [[CrossRef](#)]
5. Hua, Z.; White, J.; Zhou, J. Cancer stem cells in TNBC. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *82*, 26–34. [[CrossRef](#)]
6. Diaz-Villanueva, J.F.; Diaz-Molina, R.; Garcia-Gonzalez, V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 17193–17230. [[CrossRef](#)]
7. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **2011**, *334*, 1081–1086. [[CrossRef](#)]
8. Plygawko, A.T.; Kan, S.; Campbell, K. Epithelial-mesenchymal plasticity: Emerging parallels between tissue morphogenesis and cancer metastasis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2020**, *375*, 20200087. [[CrossRef](#)]
9. Liang, D.; Khoonkari, M.; Avril, T.; Chevet, E.; Kruyt, F.A.E. The unfolded protein response as regulator of cancer stemness and differentiation: Mechanisms and implications for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *192*, 114737. [[CrossRef](#)]
10. Lehman, S.L.; Wilson, E.D.; Camphausen, K.; Tofilon, P.J. Translation Initiation Machinery as a Tumor Selective Target for Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10664. [[CrossRef](#)]
11. Zindy, P.; Berge, Y.; Allal, B.; Filleron, T.; Pierredon, S.; Cammas, A.; Beck, S.; Mhamdi, L.; Fan, L.; Favre, G.; et al. Formation of the eIF4F translation-initiation complex determines sensitivity to anticancer drugs targeting the EGFR and HER2 receptors. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 4068–4073. [[CrossRef](#)]
12. Yang, H.S.; Jansen, A.P.; Komar, A.A.; Zheng, X.; Merrick, W.C.; Costes, S.; Lockett, S.J.; Sonenberg, N.; Colburn, N.H. The transformation suppressor Pcdcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 26–37. [[CrossRef](#)]
13. Waters, L.C.; Strong, S.L.; Ferlemann, E.; Oka, O.; Muskett, F.W.; Veverka, V.; Banerjee, S.; Schmedt, T.; Henry, A.J.; Klempnauer, K.H.; et al. Structure of the tandem MA-3 region of Pcdcd4 protein and characterization of its interactions with eIF4A and eIF4G: Molecular mechanisms of a tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17270–17280. [[CrossRef](#)]
14. Moustafa-Kamal, M.; Kucharski, T.J.; El-Assaad, W.; Abbas, Y.M.; Gandin, V.; Nagar, B.; Pelletier, J.; Topisirovic, I.; Teodoro, J.G. The mTORC1/S6K/PDCD4/eIF4A Axis Determines Outcome of Mitotic Arrest. *Cell Rep.* **2020**, *33*, 108230. [[CrossRef](#)]
15. Wen, Y.H.; Shi, X.; Chiriboga, L.; Matsahashi, S.; Yee, H.; Afonja, O. Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast. *Oncol. Rep.* **2007**, *18*, 1387–1393. [[CrossRef](#)]

16. Yu, H.; Wan, L.; Tang, Z.; Yao, C.; Zhang, D.; Jiang, M.; Wang, C.; Liu, Y.; Xue, C.; Wang, X.; et al. TRIM27 regulates the expression of PDCD4 by the ubiquitin-proteasome pathway in ovarian and endometrial cancer cells. *Oncol. Rep.* **2022**, *48*, 120. [[CrossRef](#)]
17. Gerson-Gurwitz, A.; Young, N.P.; Goel, V.K.; Eam, B.; Stumpf, C.R.; Chen, J.; Fish, S.; Barrera, M.; Sung, E.; Staunton, J.; et al. Zotatifin, an eIF4A-Selective Inhibitor, Blocks Tumor Growth in Receptor Tyrosine Kinase Driven Tumors. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 766298. [[CrossRef](#)]
18. Cullinan, S.B.; Diehl, J.A. Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 317–332. [[CrossRef](#)]
19. Hwang, S.K.; Jeong, Y.J.; Chang, Y.C. PDCD4 inhibits lung tumorigenesis by the suppressing p62-Nrf2 signaling pathway and upregulating Keap1 expression. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, *10*, 424–439.
20. Chen, Y.; Brandizzi, F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 547–555. [[CrossRef](#)]
21. Ajzashokouhi, A.H.; Bostan, H.B.; Jomezadeh, V.; Hayes, A.W.; Karimi, G. A review on the cardioprotective mechanisms of metformin against doxorubicin. *Hum. Exp. Toxicol.* **2020**, *39*, 237–248. [[CrossRef](#)]
22. Pilco-Ferreto, N.; Calaf, G.M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 753–762. [[CrossRef](#)]
23. Chen, C.; Lu, L.; Yan, S.; Yi, H.; Yao, H.; Wu, D.; He, G.; Tao, X.; Deng, X. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer. *Anticancer Drugs* **2018**, *29*, 1–9. [[CrossRef](#)]
24. Al-Malky, H.S.; Al Harthi, S.E.; Osman, A.M. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **2020**, *26*, 434–444. [[CrossRef](#)]
25. Martin, M.; Villar, A.; Sole-Calvo, A.; Gonzalez, R.; Massuti, B.; Lizon, J.; Camps, C.; Carrato, A.; Casado, A.; Candel, M.T.; et al. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: A study by the GEICAM group. *Ann. Oncol.* **2003**, *14*, 833–842. [[CrossRef](#)]
26. Isakoff, S.J. Triple-negative breast cancer: Role of specific chemotherapy agents. *Cancer J.* **2010**, *16*, 53–61. [[CrossRef](#)]
27. Akman, M.; Belisario, D.C.; Salaroglio, I.C.; Kopecka, J.; Donadelli, M.; De Smaele, E.; Riganti, C. Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: Dangerous liaisons. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2021**, *40*, 28. [[CrossRef](#)]
28. Xu, Y.; Lou, Z.; Lee, S.H. Arctigenin represses TGF-beta-induced epithelial mesenchymal transition in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 934–939. [[CrossRef](#)]
29. Giacomelli, C.; Daniele, S.; Natali, L.; Iofrida, C.; Flamini, G.; Braca, A.; Trincavelli, M.L.; Martini, C. Carnosol controls the human glioblastoma stemness features through the epithelial-mesenchymal transition modulation and the induction of cancer stem cell apoptosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15174. [[CrossRef](#)]
30. Oblinger, J.L.; Burns, S.S.; Huang, J.; Pan, L.; Ren, Y.; Shen, R.; Kinghorn, A.D.; Welling, D.B.; Chang, L.S. Overexpression of eIF4F components in meningiomas and suppression of meningioma cell growth by inhibiting translation initiation. *Exp. Neurol.* **2018**, *299*, 299–307. [[CrossRef](#)]
31. Sufian, H.B.; Santos, J.M.; Khan, Z.S.; Halim, S.A.; Khan, A.; Munir, M.T.; Zahid, M.K.; Al-Harrasi, A.; Gollahon, L.S.; Hussain, F.; et al. Parthenolide reverses the epithelial to mesenchymal transition process in breast cancer by targeting TGFbeta1: In vitro and in silico studies. *Life Sci.* **2022**, *301*, 120610. [[CrossRef](#)]
32. Galindo-Hernandez, O.; Cordova-Guerrero, I.; Diaz-Rubio, L.J.; Pulido-Capiz, A.; Diaz-Villanueva, J.F.; Castaneda-Sanchez, C.Y.; Serafin-Higuera, N.; Garcia-Gonzalez, V. Protein translation associated to PERK arm is a new target for regulation of metainflammation: A connection with hepatocyte cholesterol. *J. Cell Biochem.* **2019**, *120*, 4158–4171. [[CrossRef](#)]
33. Chen, L.; Aktas, B.H.; Wang, Y.; He, X.; Sahoo, R.; Zhang, N.; Denoyelle, S.; Kabha, E.; Yang, H.; Freedman, R.Y.; et al. Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation. *Oncotarget* **2012**, *3*, 869–881. [[CrossRef](#)]
34. 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* **2021**, *12*, 4307–4321. [[CrossRef](#)]

35. Garcia-Gonzalez, V.; Diaz-Villanueva, J.F.; Galindo-Hernandez, O.; Martinez-Navarro, I.; Hurtado-Ureta, G.; Perez-Arias, A.A. Ceramide Metabolism Balance, a Multifaceted Factor in Critical Steps of Breast Cancer Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2527. [[CrossRef](#)]
36. Carlisi, D.; De Blasio, A.; Drago-Ferrante, R.; Di Fiore, R.; Buttitta, G.; Morreale, M.; Scerri, C.; Vento, R.; Tesoriere, G. Parthenolide prevents resistance of MDA-MB231 cells to doxorubicin and mitoxantrone: The role of Nrf2. *Cell Death Discov.* **2017**, *3*, 17078. [[CrossRef](#)]
37. Garcia-Gonzalez, V.; Mas-Oliva, J. Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2019–2035. [[CrossRef](#)]
38. Garcia-Gonzalez, V.; Mas-Oliva, J. A Novel beta-adaptin/c-Myc Complex Formation Modulated by Oxidative Stress in the Control of the Cell Cycle in Macrophages and its Implication in Atherogenesis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13442. [[CrossRef](#)]
39. Shah, S.; Chandra, A.; Kaur, A.; Sabnis, N.; Lacko, A.; Gryczynski, Z.; Fudala, R.; Gryczynski, I. Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *J. Photochem. Photobiol. B* **2017**, *170*, 65–69. [[CrossRef](#)]
40. Damian-Zamacona, S.; Garcia-Gonzalez, V.; Avila-Barrientos, L.P.; Delgado-Coello, B.; Reyes-Grajeda, J.P.; Mas-Oliva, J. Cell survival regulation during receptor-mediated endocytosis of chemically-modified lipoproteins associated to the formation of an Amphiphysin 2 (Bin1)/c-Myc complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *505*, 365–371. [[CrossRef](#)]
41. Acosta-Montano, P.; Rodriguez-Velazquez, E.; Ibarra-Lopez, E.; Frayde-Gomez, H.; Mas-Oliva, J.; Delgado-Coello, B.; Rivero, I.A.; Alatorre-Meda, M.; Aguilera, J.; Guevara-Olaya, L.; et al. Fatty Acid and Lipopolysaccharide Effect on Beta Cells Proteostasis and its Impact on Insulin Secretion. *Cells* **2019**, *8*, 884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B.A.; Thiessen, P.A.; Yu, B.; et al. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D1102–D1109. [[CrossRef](#)]
44. Soga, S.; Shirai, H.; Kobori, M.; Hirayama, N. Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 400–406. [[CrossRef](#)]
45. Clark, A.M.; Labute, P. 2D depiction of protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 1933–1944. [[CrossRef](#)]
46. Kumar, D.; Haldar, S.; Gorain, M.; Kumar, S.; Mulani, F.A.; Yadav, A.S.; Miele, L.; Thulasiram, H.V.; Kundu, G.C. Epoxyazadiradione suppresses breast tumor growth through mitochondrial depolarization and caspase-dependent apoptosis by targeting PI3K/Akt pathway. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 52. [[CrossRef](#)]
47. He, Y.; Sun, S.; Sha, H.; Liu, Z.; Yang, L.; Xue, Z.; Chen, H.; Qi, L. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr.* **2010**, *15*, 13–25. [[CrossRef](#)]
48. Martinez-Navarro, I.; Diaz-Molina, R.; Pulido-Capiz, A.; Mas-Oliva, J.; Luna-Reyes, I.; Rodriguez-Velazquez, E.; Rivero, I.A.; Ramos-Ibarra, M.A.; Alatorre-Meda, M.; Garcia-Gonzalez, V. Lipid Modulation in the Formation of beta-Sheet Structures. Implications for De Novo Design of Human Islet Amyloid Polypeptide and the Impact on beta-Cell Homeostasis. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1201. [[CrossRef](#)]
49. Saini, J.; Sharma, P.K. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. *Curr. Drug Targets* **2018**, *19*, 1478–1490. [[CrossRef](#)]
50. Uluckan, O.; Becker, S.N.; Deng, H.; Zou, W.; Prior, J.L.; Piwnicka-Worms, D.; Frazier, W.A.; Weilbaecher, K.N. CD47 regulates bone mass and tumor metastasis to bone. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3196–3204. [[CrossRef](#)]
51. Corcoran, C.; Rani, S.; O'Brien, K.; O'Neill, A.; Prencipe, M.; Sheikh, R.; Webb, G.; McDermott, R.; Watson, W.; Crown, J.; et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: Evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Blackwood, E.A.; Thuerauf, D.J.; Stastna, M.; Stephens, H.; Sand, Z.; Pentoney, A.; Azizi, K.; Jakobi, T.; Van Eyk, J.E.; Katus, H.A.; et al. Proteomic analysis of the cardiac myocyte secretome reveals extracellular protective functions for the ER stress response. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2020**, *143*, 132–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Manie, S.N.; Lebeau, J.; Chevet, E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: An update. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *307*, C901–C907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Liwak, U.; Jordan, L.E.; Von-Holt, S.D.; Singh, P.; Hanson, J.E.; Lorimer, I.A.; Roncaroli, F.; Holcik, M. Loss of PDCD4 contributes to enhanced chemoresistance in Glioblastoma multiforme through de-repression of Bcl-xL translation. *Oncotarget* **2013**, *4*, 1365–1372. [[CrossRef](#)]

55. Cai, Q.; Yang, H.S.; Li, Y.C.; Zhu, J. Dissecting the Roles of PDCD4 in Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 855807. [[CrossRef](#)]
56. Vikhрева, P.N.; Kalinichenko, S.V.; Korobko, I.V. Programmed cell death 4 mechanism of action: The model to be updated? *Cell Cycle* **2017**, *16*, 1761–1764. [[CrossRef](#)]
57. Aman, S.; Li, Y.; Cheng, Y.; Yang, Y.; Lv, L.; Li, B.; Xia, K.; Li, S.; Wu, H. DACH1 inhibits breast cancer cell invasion and metastasis by down-regulating the transcription of matrix metalloproteinase 9. *Cell Death Discov* **2021**, *7*, 351. [[CrossRef](#)]
58. Yen, Y.T.; Yang, J.C.; Chang, J.B.; Tsai, S.C. Down-Regulation of miR-194-5p for Predicting Metastasis in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *23*, 325. [[CrossRef](#)]
59. Hong, O.-Y.; Jang, H.-Y.; Lee, Y.-R.; Jung, S.H.; Youn, H.J.; Kim, J.-S. Inhibition of cell invasion and migration by targeting matrix metalloproteinase-9 expression via sirtuin 6 silencing in human breast cancer cells. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 12125. [[CrossRef](#)]
60. Fan, B.; Jin, Y.; Zhang, H.; Zhao, R.; Sun, M.; Sun, M.; Yuan, X.; Wang, W.; Wang, X.; Chen, Z.; et al. MicroRNA-21 contributes to renal cell carcinoma cell invasiveness and angiogenesis via the PDCD4/c-Jun (AP-1) signalling pathway. *Int. J. Oncol.* **2020**, *56*, 178–192. [[CrossRef](#)]
61. Saeki, T.; Nomizu, T.; Toi, M.; Ito, Y.; Noguchi, S.; Kobayashi, T.; Asaga, T.; Minami, H.; Yamamoto, N.; Aogi, K.; et al. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 411–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. de Cabo, R.; Mattson, M.P. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2541–2551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Samec, M.; Liskova, A.; Koklesova, L.; Samuel, S.M.; Zhai, K.; Buhrmann, C.; Varghese, E.; Abotaleb, M.; Qaradakhi, T.; Zulli, A.; et al. Flavonoids against the Warburg phenotype-concepts of predictive, preventive and personalised medicine to cut the Gordian knot of cancer cell metabolism. *EPMA J.* **2020**, *11*, 377–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Iwasaki, S.; Iwasaki, W.; Takahashi, M.; Sakamoto, A.; Watanabe, C.; Shichino, Y.; Floor, S.N.; Fujiwara, K.; Mito, M.; Dodo, K.; et al. The Translation Inhibitor Rocaglamide Targets a Bimolecular Cavity between eIF4A and Polypurine RNA. *Mol. Cell* **2019**, *73*, 738–748.e739. [[CrossRef](#)]
65. Khaled, J.; Kopsida, M.; Lennernas, H.; Heindryckx, F. Drug Resistance and Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatocellular Carcinoma. *Cells* **2022**, *11*, 632. [[CrossRef](#)]
66. Gupta, A.; Hossain, M.M.; Miller, N.; Kerin, M.; Callagy, G.; Gupta, S. NCOA3 coactivator is a transcriptional target of XBP1 and regulates PERK-eIF2alpha-ATF4 signalling in breast cancer. *Oncogene* **2016**, *35*, 5860–5871. [[CrossRef](#)]
67. Banach, A.; Jiang, Y.P.; Roth, E.; Kuscu, C.; Cao, J.; Lin, R.Z. CEMIP upregulates BiP to promote breast cancer cell survival in hypoxia. *Oncotarget* **2019**, *10*, 4307–4320. [[CrossRef](#)]
68. Dauer, P.; Sharma, N.S.; Gupta, V.K.; Nomura, A.; Dudeja, V.; Saluja, A.; Banerjee, S. GRP78-mediated antioxidant response and ABC transporter activity confers chemoresistance to pancreatic cancer cells. *Mol. Oncol.* **2018**, *12*, 1498–1512. [[CrossRef](#)]
69. Bennett, R.L.; Carruthers, A.L.; Hui, T.; Kerney, K.R.; Liu, X.; May, W.S., Jr. Increased expression of the dsRNA-activated protein kinase PKR in breast cancer promotes sensitivity to doxorubicin. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46040. [[CrossRef](#)]
70. Tuval-Kochen, L.; Paglin, S.; Keshet, G.; Lerenthal, Y.; Nakar, C.; Golani, T.; Toren, A.; Yahalom, J.; Pfeffer, R.; Lawrence, Y. Eukaryotic Initiation Factor 2 α -a Downstream Effector of Mammalian Target of Rapamycin-Modulates DNA Repair and Cancer Response to Treatment. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77260. [[CrossRef](#)]
71. Alsterda, A.; Asha, K.; Powrozek, O.; Repak, M.; Goswami, S.; Dunn, A.M.; Memmel, H.C.; Sharma-Walia, N. Salubrinal Exposes Anticancer Properties in Inflammatory Breast Cancer Cells by Manipulating the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 654940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gafar, A.A.; Draz, H.M.; Goldberg, A.A.; Bashandy, M.A.; Bakry, S.; Khalifa, M.A.; AbuShair, W.; Titorenko, V.I.; Sanderson, J.T. Lithocholic acid induces endoplasmic reticulum stress, autophagy and mitochondrial dysfunction in human prostate cancer cells. *PeerJ* **2016**, *4*, e2445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Xu, Y.T.; Chen, R.Q.; Lin, G.B.; Fang, X.L.; Yu, S.J.; Liang, X.H.; Zhang, R. Defining the regulatory role of programmed cell death 4 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Biochem. Cell Biol.* **2018**, *96*, 522–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Steinberger, J.; Shen, L.; Kiniry, S.J.; Naineni, S.K.; Cencic, R.; Amiri, M.; Aboushawareb, S.A.E.; Chu, J.; Maiga, R.I.; Yachnin, B.J.; et al. Identification and characterization of hippuristanol-resistant mutants reveals eIF4A1 dependencies within mRNA 5' leader regions. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 9521–9537. [[CrossRef](#)]
75. Howard, C.M.; Bearss, N.; Subramanian, B.; Tilley, A.; Sridharan, S.; Villa, N.; Fraser, C.S.; Raman, D. The CXCR4-LASP1-eIF4F Axis Promotes Translation of Oncogenic Proteins in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 284. [[CrossRef](#)]
76. Xue, C.; Gu, X.; Li, G.; Bao, Z.; Li, L. Expression and Functional Roles of Eukaryotic Initiation Factor 4A Family Proteins in Human Cancers. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 711965. [[CrossRef](#)]
77. Chaffer, C.L.; Weinberg, R.A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **2011**, *331*, 1559–1564. [[CrossRef](#)]
78. Hou, J.; Tan, Y.; Su, C.; Wang, T.; Gao, Z.; Song, D.; Zhao, J.; Liao, Y.; Liu, X.; Jiang, Y.; et al. Inhibition of protein FAK enhances 5-FU chemosensitivity to gastric carcinoma via p53 signaling pathways. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 125–136. [[CrossRef](#)]
79. Huanwen, W.; Zhiyong, L.; Xiaohua, S.; Xinyu, R.; Kai, W.; Tonghua, L. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 125. [[CrossRef](#)]
80. Ohta, Y.; Fujii, M.; Takahashi, S.; Takano, A.; Nanki, K.; Matano, M.; Hanyu, H.; Saito, M.; Shimokawa, M.; Nishikori, S.; et al. Cell-matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells. *Nature* **2022**, *608*, 784–794. [[CrossRef](#)]
81. Wolfe, A.L.; Singh, K.; Zhong, Y.; Drewe, P.; Rajasekhar, V.K.; Sanghvi, V.R.; Mavrakis, K.J.; Jiang, M.; Roderick, J.E.; Van der Meulen, J.; et al. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature* **2014**, *513*, 65–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Naineni, S.K.; Itoua Maiga, R.; Cencic, R.; Putnam, A.A.; Amador, L.A.; Rodriguez, A.D.; Jankowsky, E.; Pelletier, J. A comparative study of small molecules targeting eIF4A. *RNA* **2020**, *26*, 541–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Nishida, Y.; Zhao, R.; Heese, L.E.; Akiyama, H.; Patel, S.; Jaeger, A.M.; Jacamo, R.O.; Kojima, K.; Ma, M.C.J.; Ruvolo, V.R.; et al. Inhibition of translation initiation factor eIF4a inactivates heat shock factor 1 (HSF1) and exerts anti-leukemia activity in AML. *Leukemia* **2021**, *35*, 2469–2481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Chen, R.; Zhu, M.; Chaudhari, R.R.; Robles, O.; Chen, Y.; Skillern, W.; Qin, Q.; Wierda, W.G.; Zhang, S.; Hull, K.G.; et al. Creating novel translation inhibitors to target pro-survival proteins in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2019**, *33*, 1663–1674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Walker, S.; Foster, F.; Wood, A.; Owens, T.; Brennan, K.; Streuli, C.H.; Gilmore, A.P. Oncogenic activation of FAK drives apoptosis suppression in a 3D-culture model of breast cancer initiation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 70336–70352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Castillo-Sanchez, R.; Villegas-Comonfort, S.; Galindo-Hernandez, O.; Gomez, R.; Salazar, E.P. Benzo-[a]-pyrene induces FAK activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* **2013**, *29*, 303–319. [[CrossRef](#)]