



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**NUEVOS COMPUESTOS SINTÉTICOS SIMILARES
A XESTOSPONGINA B: EVALUACIÓN DEL
EFECTO ANTI-MIGRATORIO Y ANTI-INVASIVO
EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

POR PAULA ISADORA FARÍAS CARTES

Plan de trabajo de Tesis presentado a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía: Dr. J. César Cárdenas
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa de Anatomía y Biología del
Desarrollo
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante: Dr. Ariel Castro
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía: Dr. Ulises Ahumada-
Castro
Laboratorio de Bioenergética Celular y
Metabolismo
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Julio, 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2019, Paula Isadora Farías Cartes.

A mi familia

Agradecimientos

El camino que he recorrido para llegar hasta aquí no ha sido fácil, y pienso que no habría podido lograrlo de no ser por el apoyo y cariño de quienes siempre creyeron en mí y me dieron fuerzas para salir adelante.

Quisiera agradecer a todos quienes fueron parte de este proceso, e hicieron posible este trabajo y este capítulo final de mis estudios de Bioquímica.

A mi profesor guía J. César Cárdenas, y mi profesor patrocinante Ariel Castro, gracias por el apoyo, los consejos y por orientarme para darle una buena forma a mi trabajo de tesis. Estoy muy agradecida por haber tenido esta experiencia y aprendizaje, y de la oportunidad para comenzar mi formación científica.

A mi profesor co-guía Ulises Ahumada Castro, mentor, compañero de laboratorio y amigo, muchas gracias por tanto apoyo, por los consejos, la ayuda y la buena onda siempre. Por ser una inspiración como académico y como persona.

A todo el grupo del laboratorio CMBL, gracias por la buena onda, los consejos, y por todos los bonitos recuerdos que me llevo y que hicieron esta experiencia tan enriquecedora.

De igual forma quiero agradecer a mi amada familia, quienes han sido mi motor y mi apoyo constante. A mi mami, gracias por la paciencia y el amor incondicional, por todo el esfuerzo y fortaleza para entenderme y apoyarme cuando más lo he necesitado. A mi papá, gracias por los consejos y palabras de aliento, por la comprensión, por escucharme y brindarme siempre tu cariño y apoyo. A mi hermanita Javi, a mi familia, gracias, gracias, gracias por todo el cariño.

A mi amor, Hernán, gracias por tanto, por ser mi soporte y mi confidente durante estos años, por la comprensión, la paciencia, y por motivarme siempre a seguir caminando en los buenos y malos momentos.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales.....	1
1.2 Cáncer y metabolismo mitocondrial	3
1.3 Señalización de Ca ²⁺ mitocondrial y Receptores de IP3	7
1.4 Rol del Ca ²⁺ en migración e invasión	12
1.5 Xestospongina B e inhibición de IP3R	14
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVO GENERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4.1 Determinar el efecto sobre la viabilidad y proliferación de los cuatro compuestos similares a XeB sobre la línea celular de mama no-tumoral MCF10A y en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF7, ZR75-1, MDA-MB231 y BT549, identificando el compuesto con mayor selectividad en su efecto.	20
4.2 Analizar el efecto de los compuestos sintéticos similares a XeB sobre la señalización intracelular de Ca ²⁺ en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.	21
4.3 Evaluar el efecto de los cuatro compuestos sintéticos similares a XeB sobre la bioenergética mitocondrial en la línea celular de mama normal MCF10A y en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF7, MDA-MB231 y BT549.....	21
4.4 Evaluar el efecto de los compuestos similares a XeB sobre la migración e invasión celular en líneas celulares de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 y BT-549.	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Reactivos y Anticuerpos	22
5.2 Cultivo Celular	23

5.3	Ensayo de viabilidad celular	24
5.4	Medición de señales de Ca^{2+} citoplásmico	25
5.5	Ensayo de migración transwell	25
5.6	Ensayo de invasión celular	26
5.7	Medición del metabolismo en tiempo real	28
5.8	Expresión de resultados y análisis estadístico.....	30
6.	RESULTADOS	31
6.1	Caracterización del efecto de compuestos similares a XeB sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama	31
6.2	Los compuestos sintéticos similares a XeB presentan actividad inhibitoria de la señal de Ca^{2+} inducida por ATP en células de cáncer de mama MDA-MB-231 34	
6.3	El compuesto 10B reduce el potencial clonogénico en líneas celulares de cáncer de mama.....	37
6.4	Evaluación del efecto de compuestos similares a XeB sobre la bioenergética mitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama.....	39
6.5	El compuesto 10B disminuye la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.....	41
6.6	El compuesto 10B disminuye la invasión celular en la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.....	42
7.	DISCUSIÓN	45
8.	CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	50
9.	GLOSARIO	51
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
5-1 Clasificación molecular de las líneas de cáncer de mama utilizadas.	24
6-2 Cuantificación de células fluorescentes en respuesta a estímulo de Ca^{2+}	37

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

	Pág.
1-1 Transferencia de Ca^{2+} entre RE-mitocondria a través de IP3R	8
1-2 Estructuras químicas de XeB y XeC	17
5-3 Ensayo de migración e invasión en transwell	28
5-4 Perfil de bioenergética celular obtenido usando Seahorse	31

RESUMEN

El cáncer es un gran conjunto de enfermedades, todas caracterizadas como un desorden celular, en el cual células transformadas crecen y proliferan anormalmente y tienen el potencial de diseminarse e invadir tejidos sanos en el cuerpo. Estas células poseen 8 características biológicas adquiridas durante el proceso de progresión tumoral, dentro de las que se encuentra alterada la bioenergética celular. Las células cancerosas tienen una alta capacidad para reprogramar su metabolismo frente a cambios en la disponibilidad de sustratos o estrés metabólico, siendo una respuesta adaptativa que promueve la supervivencia celular. La anomalía metabólica mejor caracterizada en células tumorales es el efecto Warburg, que limita la producción de energía principalmente a glucólisis en presencia de oxígeno. Sin embargo, se ha demostrado que el metabolismo oxidativo mitocondrial también tiene un papel fundamental en la tumorigénesis. Existe poca información respecto al rol del metabolismo mitocondrial en los procesos de migración e invasión de la cascada metastásica. Evidencia reciente demuestra que al interferir el metabolismo mitocondrial dependiente de calcio (Ca^{2+}) se puede reducir la migración e invasión a la matriz circundante de células tumorales. Los receptores de IP_3 (IP_3R) son los principales canales de Ca^{2+} responsables de su liberación desde el retículo endoplásmico (RE) y de la comunicación de éste con la mitocondria, en donde el Ca^{2+} permite el mantenimiento de la bioenergética celular. La disrupción de esta comunicación RE-mitocondria genera una crisis bioenergética que activa una respuesta autofágica, y que reduce la capacidad de supervivencia y proliferación de células tumorales. Para estos estudios se ha utilizado un inhibidor competitivo del IP_3R llamado Xestospongina B (XeB), un compuesto natural de difícil obtención y purificación, por lo que se han sintetizado nuevos compuestos similares, cuyo efecto sobre células tumorales permanece aún sin estudiar. El propósito de este trabajo es determinar si estos compuestos muestran propiedades similares a XeB. Para esto se evaluarán sus efectos sobre respiración celular, viabilidad, migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama. Se espera que tal como XeB natural, los compuestos sintéticos reduzcan la migración e invasión de manera específica en células de cáncer de mama.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, y es responsable de un estimado de 10 millones de muertes en 2020. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer [1]. Se proyecta un crecimiento significativo en las cifras hacia el final de la siguiente década, debido principalmente al crecimiento y envejecimiento de la población mundial. En este contexto, se espera que, al no existir una mejora sustancial en el control del cáncer, la cifra de defunciones aumente a 16.3 millones de muertes a nivel mundial en el año 2040 [2]. Aunque el cáncer es considerado como una enfermedad propia de países desarrollados, el 74.9% del total de las muertes por esta enfermedad ocurren en países de bajos y medianos ingresos, los cuales se encuentran principalmente en África, Asia y América Latina [3]. En Chile, los tumores malignos son la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares (27,9% del total de muertes en 2018). Sin embargo, en regiones como Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta, Maule, Biobío, Los Lagos y Aysén, la mortalidad por cáncer es la primera causa de muerte. Se proyecta que para el año 2023, el cáncer será la primera causa de muerte en el país [4].

El cáncer de mama es el cáncer más común en el mundo (en términos de nuevos casos diagnosticados), y es el más común en mujeres con 2,26 millones de nuevos casos diagnosticados en 2020. Esto representa aproximadamente el

12% de todos los nuevos casos de cáncer y el 25% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres [5]. En el mundo, el cáncer de mama es la quinta causa más común de muerte por cáncer, con 685.000 muertes aprox. en 2020. En Chile es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres [6].

El cáncer de mama es considerado un cáncer muy heterogéneo en términos genéticos y clínicos. Existe un alto grado de diversidad entre y dentro de los tumores, así como también entre los pacientes de cáncer, y todos estos factores en conjunto determinan el riesgo de progresión de la enfermedad y la resistencia terapéutica [7]. Clínicamente, los cánceres de mama se clasifican en tres tipos basados en sus propiedades inmunohistoquímicas. Estos tipos son los cánceres de mama positivos para receptores de hormonas (receptores de estrógeno positivos (ER+)/receptores de progesterona positivos (PR+)), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 positivos (HER2+) y cánceres de mama triple negativos (ER-, PR-, HER2-) [8]. Las estrategias terapéuticas tradicionales se guían por el estado de expresión de estos receptores, ya que el crecimiento de los cánceres de mama está estrechamente regulado por las hormonas que interactúan con los receptores de estrógeno y progesterona, así como por factores de crecimiento que interactúan con los receptores HER-2 [9].

La mayoría de las muertes por cáncer de mama y por otros tipos de cáncer no se deben al tumor primario en sí, sino que son el resultado de la metástasis a otros órganos del cuerpo como pulmón, hígado, huesos y cerebro [10]. Es esta

naturaleza sistémica de la enfermedad y la resistencia de las células tumorales diseminadas a los agentes terapéuticos existentes lo que explica que más del 90% de las muertes por cáncer sean atribuibles a metástasis [11].

La cascada metastásica consiste en una serie de pasos secuenciales que incluyen: (i) infiltración local de células tumorales en el tejido adyacente, (ii) intravasación o migración transendotelial de células cancerosas en vasos sanguíneos y linfáticos, (iii) evasión de la respuesta inmune y supervivencia de las células tumorales circulantes, (iv) extravasación o migración en capilares distantes e (v) invasión y luego proliferación en tejido normal que conduce a la colonización [12]. El campo de la investigación de la metástasis tiene más de 100 años. Establecer los mecanismos biológicos del proceso metastásico de principio a fin es crucial para encontrar ventanas terapéuticas abiertas para intervenciones exitosas. Comprender mejor la dinámica y evolución de este proceso ayudará a identificar los objetivos de las terapias moleculares que pueden detener o posiblemente revertir el crecimiento y la metástasis del cáncer [13].

1.2 Cáncer y metabolismo mitocondrial

Comprender los cambios metabólicos relacionados con la metástasis es fundamental, ya que el metabolismo no sólo implica la generación de energía e intermediarios biosintéticos, sino que desempeña un rol central en la señalización

celular [14], en la regulación epigenética [15] y en la interacción con el microambiente celular [16].

Bajo condiciones fisiológicas y en presencia de oxígeno, las células no tumorales metabolizan glucosa para formar piruvato, a través de la glicólisis en el citosol, y posteriormente el piruvato es oxidado a dióxido de carbono en el ciclo de Krebs, generando equivalentes reducidos, como nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH), que son utilizados por la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna [17]. Este proceso genera un gradiente de protones entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial, que produce un potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), el cual finalmente permite el funcionamiento del complejo enzimático productor de adenosín trifosfato (ATP), la ATP sintasa. Este proceso es llamado fosforilación oxidativa (OXPHOS) [18]. La OXPHOS es responsable de producir cerca del 90% del ATP en la mayoría de las células [19]. En cambio, en condiciones anaerobias, las células favorecen la glicólisis, en la cual se reduce la glucosa hasta lactato en el citosol. Este proceso genera ATP de manera poco eficiente, ya que se produce casi 20 veces menos ATP por unidad de glucosa que la cantidad que se puede producir a través de su oxidación completa a CO₂ en las mitocondrias [20].

En el caso de las células tumorales de muchos tipos de cáncer, aún en presencia de oxígeno muestran una alta dependencia de glicólisis para mantener los niveles de ATP intracelulares, mediante una alta velocidad de captación de

glucosa. Este fenómeno descrito por Otto Warburg en 1956 es conocido como “efecto Warburg” [21] [22] [23]. Esta alteración del metabolismo energético celular en células cancerosas, que afecta la función mitocondrial, es un aspecto primario y fundamental para promover la transformación maligna, la invasión y la metástasis, y es considerada una de las características distintivas (“hallmarks”) del cáncer [24].

Warburg formuló la hipótesis de que esta alteración del metabolismo era específica de las células cancerosas, y que de esta manera el cáncer se origina de defectos mitocondriales irreversibles que llevan a un aumento compensatorio de la glicólisis aún en presencia de oxígeno [25], pero la creciente evidencia reciente indica que la mayoría de las células cancerosas dependen de la reprogramación del metabolismo mitocondrial, de la regulación de la homeostasis redox y de la biogénesis y dinámica mitocondrial para la supervivencia y progresión tumoral [26] [27] [28].

La reprogramación metabólica en el cáncer consiste en una alteración en la utilización de metabolitos y en la síntesis de componentes celulares, que surge como una respuesta adaptativa ante la hipoxia y baja disponibilidad de nutrientes, promoviendo el crecimiento continuo y la proliferación descontrolada que caracterizan al cáncer [29]. Algunos de los cambios más notables de la bioenergética celular tumoral incluyen el aumento en la tasa glicolítica, aumento en el flujo glutaminolítico, aumento del metabolismo de aminoácidos y lípidos,

potenciación de la biogénesis mitocondrial, inducción de la vía de la pentosa fosfato y biosíntesis de macromoléculas [30] [31].

Además de su papel en la producción de ATP, las mitocondrias tienen un rol crítico en la biosíntesis de componentes celulares, en el control de la homeostasis redox y de calcio (Ca^{2+}), en la regulación transcripcional y en procesos de muerte celular, esenciales en la tumorigénesis [32]. La mantención del metabolismo oxidativo mediante una alta captación de glutamina, que contribuye con la mayor parte del carbono al ciclo de Krebs en cáncer, mantiene una cantidad sustancial de citrato y malato para la biosíntesis de lípidos y nucleótidos, respectivamente, además de proporcionar un suministro adicional de poder reductor (NADH). Además, la activación con glutamina del ciclo de Krebs ayuda a mantener el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), evitando la apertura del poro de transición de permeabilidad y la liberación de factores pro-apoptóticos [33]. Por otra parte, el metabolismo oxidativo mitocondrial genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que son necesarias para la activación óptima de las vías de señalización necesarias para la proliferación y migración celular [34] [35].

Además, hasta ahora se ha determinado que muchos de los principales supresores de tumores y oncogenes tienen conexiones fundamentales con las enzimas y vías metabólicas asociadas con el metabolismo mitocondrial para la mantención de la progresión tumoral [36] [37] [38] [39]. Por lo tanto, las

mitocondrias constituyen un blanco prometedor para el desarrollo de nuevos agentes contra el cáncer.

1.3 Señalización de Ca^{2+} mitocondrial y Receptores de IP3

La homeostasis del Ca^{2+} es fundamental para el metabolismo celular, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular [40]. La regulación del Ca^{2+} por las mitocondrias es un aspecto clave en la fisiología celular; ya que tiene un rol en la producción de energía para procesos celulares, en tamponar y controlar aumentos de Ca^{2+} citosólicos, y también en la determinación del destino celular al desencadenar o prevenir la apoptosis [41]. Cada vez más estudios describen que la homeostasis del Ca^{2+} intracelular está alterada en las células cancerosas, y que este juega un papel importante en la progresión del cáncer al promover la proliferación, la angiogénesis, la migración y la resistencia a la apoptosis [42] [43] [44].

El Ca^{2+} es el segundo mensajero más abundante en el cuerpo humano, cumplen diversos roles en la fisiología celular, incluyendo la regulación de la expresión génica, el control del ciclo celular, la motilidad celular, autofagia y apoptosis entre otros [45]. Las señales de Ca^{2+} están altamente reguladas temporal y espacialmente dentro de los compartimentos celulares. Ya que el Ca^{2+} citosólico libre se mantiene en muy bajas concentraciones (~100 nM), una

pequeña fracción de Ca^{2+} , ya sea mediante la liberación desde organelos intracelulares como el RE, lisosomas y aparato de Golgi ($>100 \mu\text{M}$) o por la entrada desde la reserva extracelular ($\sim 1 \text{ mM}$) puede generar señales marcadas que activan cascadas de señalización río-abajo [46] [47]. De esta manera, las señales de Ca^{2+} pueden regular diversos procesos celulares mediante la generación de microdominios de Ca^{2+} , es decir altas concentraciones localizadas en sitios donde el Ca^{2+} ingresa al citoplasma, ya sea en la superficie celular o desde reservas internas [48]. Estos microdominios se encuentran inmediatamente alrededor de aperturas intracelulares de canales de Ca^{2+} , como es el caso de los microdominios cercanos a los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R) presentes principalmente en el retículo endoplásmico [49] [50].

El Ca^{2+} intracelular se almacena principalmente en el lumen del RE, desde donde se libera al citoplasma a través de IP3Rs y receptores de rianodina (RyR), estos últimos presentes principalmente en células excitables como neuronas y células musculares [51]. La transferencia eficiente de Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria es posible gracias a la proximidad espacial dinámica que existe entre estos dos organelos, que permite el acoplamiento estructural y funcional que se conoce como sitios de contacto mitocondria – retículo endoplásmico (MAM, del inglés mitochondria associated membranes) [52] [53] [54]. Estas MAM se definen como regiones de membrana del RE que se encuentran en una aposición cercana (10–50 nm) a las mitocondrias [55], distancia que permite a las proteínas del RE asociarse directamente con proteínas y lípidos de la membrana

mitocondrial externa. Es en estos sitios de contacto donde se pueden generar altas concentraciones localizadas de Ca^{2+} que facilitan su transporte hacia la mitocondria [56].

De esta manera, cuando se libera del RE a través del IP3R, el Ca^{2+} primero atraviesa la membrana mitocondrial externa a través del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) [57] [58], pasa al espacio intermembrana y luego el complejo uniportador mitocondrial de calcio (MCUC) [59] [60] lo transporta a través de la membrana mitocondrial interna hacia la matriz mitocondrial (Figura 1).

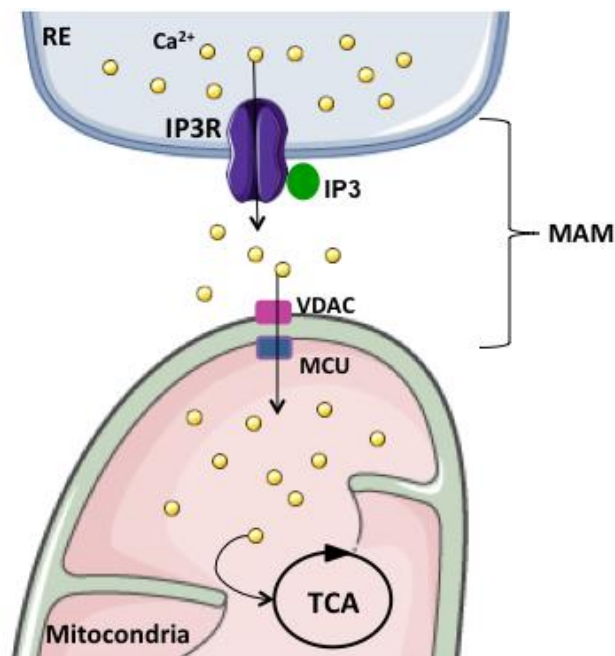


Figura 1: Transferencia de Ca^{2+} entre RE-mitocondria a través de IP3R. El receptor de IP3 (IP3R) se activa al unirse IP3, generando la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (RE) al citosol. Debido a la proximidad del RE y la mitocondria, dada por

los sitios de contacto mitocondria – retículo endoplásmico (MAM), se forman microdominios altamente localizados y concentrados de Ca^{2+} , que facilitan su transferencia a la mitocondria. El Ca^{2+} primero ingresa a la mitocondria a través del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana mitocondrial externa y luego el uniportador de calcio mitocondrial (MCUC) lo transporta a través de la membrana mitocondrial interna.

Los IP3R constituyen una familia de canales activados por inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3), un segundo mensajero que se activa río abajo de la activación de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Los IP3R presentan tres isoformas (IP3R tipo 1, 2 y 3) [61] y son uno de los principales canales de liberación intracelular de Ca^{2+} en células no excitables, incluidas muchas células cancerosas [62]. La liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico a través de los IP3R regula numerosas funciones celulares, como la transcripción génica, proliferación celular, autofagia, secreción y motilidad [63] [64].

La señalización de Ca^{2+} mediada por IP3R también regula el metabolismo celular y la bioenergética, principalmente por la entrada del Ca^{2+} liberado a la mitocondria, el cual es un cofactor de enzimas limitantes de la velocidad del ciclo de Krebs como la isocitrato deshidrogenasa (IDH), la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDH), y activa indirectamente al complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) mediante la regulación de su estado de fosforilación al

estimular la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP) [65]. Así, se requiere la presencia de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial para una suficiente producción de NADH y ATP [66].

Se ha descrito que bajos niveles de la liberación constitutiva de Ca^{2+} mediada por IP3R son esenciales para la mantención de niveles basales de OXPHOS y producción de ATP en una gran variedad de tipos celulares, incluidas líneas celulares de cáncer [67] [68].

En ausencia de esta transferencia constitutiva de Ca^{2+} desde ER a mitocondria, se induce un estrés metabólico en el cual disminuyen los niveles de ATP, y que es compensado mediante la inducción de la autofagia como un mecanismo esencial de supervivencia, que es independiente de mTOR [69] pero dependiente de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) [70].

Esto ocurre debido a que en todos los tipos de células, la inhibición de la captación constitutiva de Ca^{2+} por la mitocondria induce un estado de estrés bioenergético que resulta en una reprogramación del metabolismo, similar al que se produce por disminución de nutrientes, a pesar de la disponibilidad de éstos y al aumento de su asimilación [67].

En células tumorales, se ha demostrado que la interrupción de esta comunicación RE-mitocondria, ya sea bloqueando la liberación de Ca^{2+} mediada por IP3R o bloqueando la captación de Ca^{2+} mitocondrial, induce un estrés

metabólico similar al generado en células normales; sin embargo, la activación de la autofagia como mecanismo de supervivencia, es insuficiente en células cancerosas cuando existe el bloqueo de esta comunicación, de modo que mueren por necrosis al continuar el proceso de mitosis [68]. De esta manera, la transferencia constitutiva de Ca^{2+} a la mitocondria mediada por IP3R es esencial en el mantenimiento de la viabilidad de las células cancerosas.

1.4 Rol del Ca^{2+} en migración e invasión

El Ca^{2+} es un regulador crucial de la migración celular, un proceso esencial para una serie de funciones fisiológicas que incluyen el desarrollo embrionario [69], la inmunidad [71] y la cicatrización de heridas [72]. Este proceso está controlado por diferentes efectores reguladores, que orquestan la remodelación de la arquitectura del citoesqueleto [73].

Se ha establecido que el Ca^{2+} citoplasmático es un regulador clave de la migración celular ya que las oscilaciones en el Ca^{2+} citosólico activan la remodelación del citoesqueleto, la contracción de la actina y las adhesiones focales necesarias para el movimiento celular [74] [75]. Durante la migración, las células se polarizan y exhiben un gradiente citosólico de Ca^{2+} con una baja concentración de Ca^{2+} en el borde anterior de la célula [75] [76]. Esta baja concentración de Ca^{2+} permite que los diferentes componentes de la maquinaria

de migración celular respondan a pulsos locales de cambios intracelulares de Ca^{2+} . Estudios recientes han mostrado que los microdominios transitorios y localizados de altas concentraciones de Ca^{2+} son más activos en la parte frontal de las células en migración [77].

Las vías de señalización reguladas por Ca^{2+} citoplásmico son críticas también para regular la migración e invasión celular en células tumorales, en las cuales esta señalización se remodela de una manera que promueve la renovación de las adherencias focales, favorece las fuerzas contráctiles y facilita la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular (MEC) [78]. Aunque el papel del Ca^{2+} citosólico en la migración celular está bien establecido, la función del Ca^{2+} mitocondrial y la dinámica RE-mitocondria en migración e invasión solo han surgido recientemente [79] [80] [81]*.

A nivel de RE y mitocondrias, los niveles de expresión de proteínas que regulan la señalización de Ca^{2+} , incluyendo VDAC1, IP3R y SERCA, a menudo se alteran en las células cancerosas [82].

Por ejemplo, los niveles de expresión de VDAC1 están correlacionados con el crecimiento tumoral y la invasión en varios tipos de cáncer [83], como el cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de cuello uterino [84] [85]. Por otro lado, estudios sugieren que la sobreexpresión de IP3R tipo 3 en carcinoma colorrectal y en glioblastoma se correlaciona con la metástasis y la supervivencia del paciente [86] [87] [88]. Además, varios estudios han descrito

que la expresión de MCU se correlaciona con un mal pronóstico, comportamiento invasivo y metástasis en cáncer de mama [89]. Recientemente, Tosatto et al. demostraron que el silenciamiento de MCU disminuye la migración y la metástasis a través de un mecanismo que implica directamente una reducción de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria [90], y que incluye un aumento en la relación NAD(P)H/NADH, cambiando la capacidad antioxidante de la célula y disminuyendo los niveles de ROS mitocondrial [91].

1.5 Xestospongina B e inhibición de IP3R

Actualmente existen diferentes estrategias utilizadas en el tratamiento del cáncer, las cuales se aplican dependiendo del tipo de cáncer y su etapa de avance. Los tratamientos más comunes hoy en día consisten en cirugía de tumores, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia; los que pueden aplicarse únicamente o en combinación dependiendo del caso. La quimioterapia y la radioterapia pueden causar efectos adversos severos ya que afectan no solo a las células cancerosas sino también a las sanas [92]. Para desarrollar terapias anticancerígenas efectivas, se debe considerar el microambiente del tumor, ya que comprende no solo las células cancerosas sino también a los tejidos sanos circundantes. Es por ello que se propone el uso de tratamientos de origen natural con baja toxicidad sobre tejidos sanos como una posibilidad para desarrollar estrategias más efectivas con menos efectos secundarios [93].

En este campo, el entorno marino, con su rica variedad de organismos, es una inmensa fuente de potenciales nuevos compuestos con actividad antitumoral [94]. Entre esta diversidad de organismos marinos, las esponjas son actualmente una de las fuentes más ricas de compuestos activos contra el cáncer que se encuentran en los ecosistemas marinos [95]. Para sobrevivir en el complejo ambiente marino, la mayoría de las especies de esponjas han desarrollado mecanismos químicos para defenderse de la depredación. Dicha adaptación química produce muchos metabolitos secundarios biológicamente activos con actividad citotóxica en células tumorales [96].

Las Xestosponginas son un grupo de alcaloides macrocíclicos bis-1-oxaquinolizidinas extraídos desde esponjas marinas del género *Xestospongia* [97] [98]. Estos compuestos han sido estudiados por ser potentes inhibidores, permeables a la membrana, de la liberación de Ca^{2+} mediada por IP3 desde el RE [99] [100]. Existen varios isómeros de xestospongina (xestospongina A, B C, D, y demetilxestospongina B), todos con propiedades inhibitorias similares presentando IC_{50} que varían desde 358 nM hasta 5,9 μM [99]. Sin embargo, el uso de estos compuestos ha sido limitado principalmente a la xestospongina C (XeC) (Figura 2) [101] [102] .

Entre estos compuestos derivados estructuralmente relacionados, XeC es el inhibidor más potente de la liberación de Ca^{2+} desde el RE, mediada por el IP3R [99] [103], con un IC_{50} de 358 nM, el cual es 30 veces menor que el IC_{50}

para el receptor de rianodina, un canal liberador de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico [100]. Se ha descrito que bloquea reversiblemente el eflujo de Ca^{2+} inducido por bradiquinina y carbacol desde las reservas del RE [99].

El sitio de acción exacto de las xestosponginas no ha sido bien definido. De hecho, se ha descrito que XeC bloquea la señalización de Ca^{2+} mediada por IP3, pero sin interactuar con el sitio de unión de IP3 (96). Además, varios estudios han evidenciado que XeC tiene poca especificidad, ya que actúa inhibiendo la Ca^{2+} ATPasa [97], y también inhibe los canales de Ca^{2+} y K^{+} voltaje-dependientes de la membrana plasmática a concentraciones similares a las cuales inhibe al receptor de IP3, por lo que sólo se considera como un inhibidor selectivo del IP3R en células permeabilizadas y no en células con membrana plasmática intacta [98] [104].

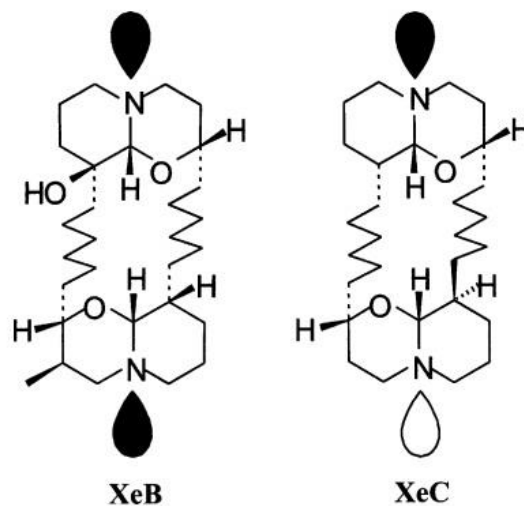


Figura 2: Estructuras químicas de XeB y XeC. XeB difiere de XeC por la estereoquímica de los anillos (cis en XeB y trans en XeC). XeB también tiene un grupo hidroxilo en uno de los anillos de oxaquinolizidina y un metilo en el otro. Fuente: Imagen tomada desde Jaimovich et al., 2005.

Por otro lado, en un estudio realizado por Jaimovich, et al. se ha descrito que la xestospongina B (XeB) (Figura 2) interactúa con el sitio de unión de IP3 de manera concentración-dependiente [105]. De esta manera, XeB, dependiendo de la dosis, bloquea las señales de Ca^{2+} inducidas por bradiquinina, y también bloquea selectivamente la señal intracelular de Ca^{2+} lenta inducida por la depolarización de membrana con altas concentraciones externas de K^+ en células musculares. Esta lenta señal de Ca^{2+} involucra receptores de IP3, los

cuales son inhibidos por XeB. También se demostró que XeB no afecta a la bomba de Ca^{2+} . De esta manera se determinó que XeB es un inhibidor competitivo de receptores de IP3, efectivo y permeable a la membrana, tan potente como la XeC y que actúa de manera específica [105].

En trabajos recientes ha sido descrito que la inhibición farmacológica de IP3R con XeB induce muerte celular selectiva de células cancerosas [68] [106]. Esto es debido a que como se mencionó anteriormente, en células no tumorales la inducción de autofagia, mediante la generación de una crisis bioenergética luego de la inhibición de IP3R, es suficiente para sostener la supervivencia celular; sin embargo, en células cancerosas el aumento en la autofagia no es suficiente para la supervivencia celular, resultando en muerte mediada por necrosis [68].

Este efecto anti-tumoral de XeB deriva de su efecto al reducir la respiración celular, producto de la disminución en la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria; no obstante, dada la complejidad de su extracción y purificación al ser un compuesto natural de origen marino, su uso experimental es bastante limitado. Debido a esto, en el laboratorio del Dr. Armen Zakarian se han desarrollado cuatro nuevos compuestos sintéticos con estructuras químicas similares conteniendo pequeñas modificaciones respecto de la molécula parental (XeB) [107]; sin embargo, no se ha realizado un estudio de relación estructura-actividad y del efecto anti-tumoral de estos compuestos.

Es por esto que el principal objetivo de este trabajo es determinar si estos compuestos sintéticos similares a XeB, que serán mencionados en este trabajo como “xestoides”, presentan propiedades similares al de XeB natural en células de cáncer, lo cual aún no ha sido descrito. Para esto, se estudiarán en su efecto sobre la respiración celular y la viabilidad, migración e invasión celular en células de cáncer de mama.

2. HIPÓTESIS

Los compuestos sintéticos similares a XeB inhiben la salida de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, alteran la bioenergética mitocondrial e inducen un efecto citotóxico, anti-migratorio y anti-invasivo selectivo en líneas celulares derivadas de cáncer de mama.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los compuestos sintéticos similares a XeB sobre la viabilidad, migración e invasión en líneas celulares de cáncer de mama.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1 Determinar el efecto sobre la viabilidad y proliferación de los cuatro compuestos similares a XeB sobre la línea celular de mama no-tumoral MCF10A y en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF7, ZR75-1, MDA-MB231 y BT549, identificando el compuesto con mayor selectividad en su efecto.

- 4.2 Analizar el efecto de los compuestos sintéticos similares a XeB sobre la señalización intracelular de Ca^{2+} en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
- 4.3 Evaluar el efecto de los cuatro compuestos sintéticos similares a XeB sobre la bioenergética mitocondrial en la línea celular de mama normal MCF10A y en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF7, MDA-MB231 y BT549.
- 4.4 Evaluar el efecto de los compuestos similares a XeB sobre la migración e invasión celular en líneas celulares de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 y BT-549.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y Anticuerpos

Los reactivos que se utilizaron en este estudio como FCCP, Oligomicina A, Rotenona y Antimicina A fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Todas las soluciones de los compuestos en este estudio fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO), a menos que se indique lo contrario. Para fijar las concentraciones a las que son observados los efectos sobre la viabilidad celular y estado bioenergético se realizaron curvas dosis-respuesta, con concentraciones crecientes del compuesto (1-5-7,5-10-20 μ M).

El compuesto Xestospongina B (XeB), extraído y purificado de la esponja marina *Xestospongia exigua*, fue obtenido mediante una donación del Dr. Jordi Molgó (CNRS, Francia).

Los compuestos sintéticos similares a Xestospongina B (denominados “xestoides” en este trabajo) fueron sintetizados en la Universidad de California por el Dr. Armen Zakarian [107], y sus códigos de uso para este trabajo son: 54a, 52c, 52a, 297b.

5.2 Cultivo Celular

Para todos los experimentos propuestos en los objetivos se usaron líneas celulares derivadas de cáncer de mama de origen humano MCF7, MDA-MB-231, ZR75-1 y BT549, las cuales retienen características moleculares de los fenotipos encontrados en mujeres con esta patología (**Tabla 1**). Por otra parte, se utilizó la línea celular de epitelio mamario no-tumoral humano MCF10A como control de células no-malignas derivadas del mismo tejido que las líneas tumorales. Todas las líneas celulares fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC).

Tabla 1: Clasificación molecular de las líneas de cáncer de mama utilizadas.

Línea celular	Inmunoperfil	Clasificación
ZR75-1	ER+, PR+/-, HER2+	Luminal B
MCF7	ER+, PR+/-, HER2-	Luminal A
MDA-MB-231	ER-, PR-, HER2-	Basal
BT549	ER-, PR-, HER2-	Basal

ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; HER2, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Holliday & Spiers, 2011).

Para todos los experimentos, las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, Logan, UT, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Hyclone), 1mM 1% de L-glutamina (Invitrogen Santa Fe, México DF, México) y 1mM 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). Este medio de cultivo fue cambiado cada 3 días o bien fuera necesario, y las células se incubaron con 5% CO₂ a 37°C.

5.3 Ensayo de viabilidad celular

La muerte celular se determinó mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI, Molecular Probes ®) por citometría de flujo. Se colectó el medio de cultivo de cada pocillo en un tubo eppendorf para preservar las células muertas presentes en el medio. Las placas fueron lavadas con PBS, siendo colectado en los tubos eppendorf respectivos. Cada tubo se centrifugó a 2500 rpm por 5 min a 4°C y el sobrenadante se descarta. A cada pocillo, se agregó tripsina para desprender las células adheridas y posteriormente se colectaron en los tubos eppendorf respectivos. Las células fueron resuspendidas en una solución de PI (5 mg/mL) en PBS 1X y se traspasaron a tubos BD para citómetro. La fluorescencia fue detectada mediante un citómetro de flujo BD FACSaria III.

5.4 Medición de señales de Ca^{2+} citoplásmico

Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 25 mm y se cargaron con Fluo-4/AM 5 μM (30 min) en medio extracelular sin Ca^{2+} como ha sido descrito previamente (Madesh et al., 2005). Los cubreobjetos se montan en un microincubador de perfusión abierto (PDMI-2; Harvard Apparatus) a 37°C y se toman imágenes en microscopio confocal. Después de 10 segundos de medición de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal, se agrega al medio extracelular ATP-Mg (100 μM) y se registra el aumento transitorio de fluorescencia mediante imágenes cada 3 s (510 Meta; Carl Zeiss, Inc.) a una excitación de 488 y 561 nm utilizando un objetivo de aceite de 63X. Las imágenes se analizaron y cuantificaron usando ImageJ (NIH) (Hawkins et al., 2010; Madesh et al., 2005; Mallilankaraman et al., 2011).

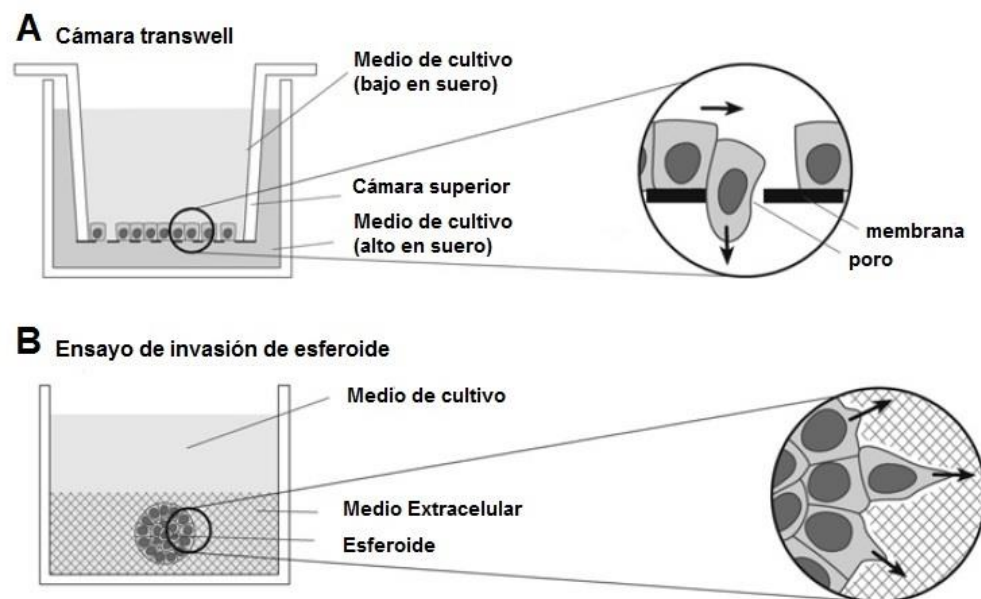
5.5 Ensayo de migración transwell

El ensayo se realizó en cámaras de Boyden según lo descrito por Torres et al [108]. Brevemente, las células (5×10^4) se resuspenden en medio libre de suero y se siembran en la parte superior de una cámara de Boyden. En la parte inferior de la cámara se agrega medio suplementado con 10% de FBS. La membrana de la cámara de Boyden fue pre-tratada con fibronectina 2 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h previo al ensayo. Luego de 2 h, la cámara se removi6, lav6 y se marcaron las membranas

con cristal violeta 0,1% en metanol para fijar y teñir las células, luego se contaron en un microscopio invertido (Figura 3) [109].

5.6 Ensayo de invasión celular

Para generar los esferoides celulares se siembran 10.000 células/200 μ l en medio de cultivo con 10 μ g/mL colágeno I, en placas de 96 pocillos pre-tratadas con una solución de agarosa al 1%. Luego las placas se centrifugan a 1000 rpm por 10 min para formar agregados celulares, que luego de entre 4 a 7 días dan forma a esferoides. Para implantar los esferoides se pre-tratan placas de 12 pocillos con 2,2 mg/mL colágeno I, y luego se agregan 500 μ l de una solución de 3 mg/mL colágeno I, con MEM 10X y NaOH 0,1 M en hielo. Los esferoides se depositan sobre esta matriz de colágeno en frío, luego se completa la gelificación a 37°C por 20 min. Se agregan 500 μ L de medio de cultivo sobre el gel formado, de manera de tener 1 mL de volumen final por pocillo. El ensayo se realiza por 96 h en presencia de 5 y 7.5 μ M de xestoide y 5 y 7.5 μ M de XeB, registrándose el progreso de la invasión obteniendo fotos cada 24 h (Figura 3) [110].



Adaptado desde: Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. Journal of visualized experiments : JoVE, (88), 51046.

Figura 3: Ensayo de migración e invasión en transwell. En la figura 3A se observa un esquema del ensayo de migración en transwell o cámara de Boyden. Para ello se ponen en la parte superior, células en medio libre de FBS, y en la parte inferior, medio suplementado con 10% FBS. Las células migran hacia la parte inferior de la cámara a través de una membrana porosa. En la figura 3B se observa un esquema del ensayo de invasión de esferoide en matriz 3D. Esferoides multicelulares se insertan en una matriz similar a MEC, y luego se les agrega medio de cultivo por sobre el gel. Las células invasivas se separan del agregado celular dando forma a proyecciones que crecen hacia diferentes direcciones.

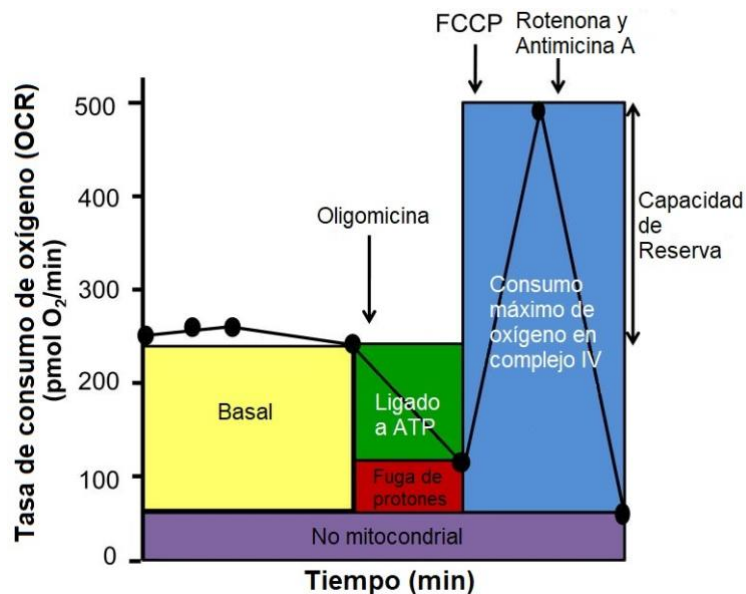
5.7 Medición del metabolismo en tiempo real

Seahorse XF96e Extracellular Flux Analyzer (Seahorse, Biosciences) fue usado para medir el efecto de los compuestos similares de XeB sobre el metabolismo de las líneas de cáncer de mama y no-tumorales. XF96e puede medir simultáneamente el consumo de oxígeno (Oxygen Consumption Rate, OCR), un indicador de la respiración mitocondrial y la acidificación del medio extracelular (ECAR), un indicador de la acidificación por formación de lactato reflejando la actividad de la glicólisis.

Un día antes de iniciar los experimentos, las células fueron sembradas según la densidad establecida previamente (1×10^4 o 2×10^4 células) en placas de cultivo XF96 e incubadas por 24 h a 37°C. Posteriormente, se estimularon con los cuatro xestoides 1, 5, 7.5, 10 y 20 μM o con el vehículo etanol por 24 h. Luego, cada pocillo se lavó 3 veces con medio Seahorse (pH 7,4), y se dejará por 1 h en incubadora sin CO_2 a 37°C. Luego de la incubación, el medio de cultivo fue retirado, las células se lavan dos veces con medio Seahorse (pH 7,4), y se dejó por 1 h en incubadora sin CO_2 a 37°C. Luego, fue iniciado el experimento.

Se agregaron a los puertos A, B y C oligomicina 1 mM, FCCP 0,25 μM y antimicina 1 mM más rotenona 1 mM, respectivamente. Pasado el tiempo, se ponen las placas en el analizador de flujo extracelular Seahorse Bioscience.

OCR y ECAR fueron medidos durante 3 minutos, seguido por 3 min de mezclado y re-oxigenación del medio. Tres mediciones de la velocidad basal fueron realizadas previas a la inyección de los inhibidores o estimuladores de la respiración celular como se muestra en la Figura 4. De estas condiciones, los siguientes parámetros respiratorios se calcularon según literatura (Hill et al. 2012): Respiración basal, Respiración acoplada a la síntesis de ATP mitocondrial, Máxima respiración mitocondrial y Capacidad de reserva mitocondrial.



Adaptado de: Hill, B. G., Benavides, G. A., Lancaster, J. R., Jr, Ballinger, S., Dell'Italia, L., Jianhua, Z., & Darley-Usmar, V. M. (2012). Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological chemistry*, 393(12), 1485–1512.

Figura 4: Perfil de bioenergética celular obtenido usando Seahorse. Se observan en el gráfico los parámetros fundamentales para medir la función mitocondrial: Respiración Basal, Fuga de Protones y Capacidad de Reserva. OCR: Velocidad de consumo de oxígeno; Oligomicina: inhibidor de la ATP sintasa; FCCP: Protonóforo, desacoplador de la fosforilación oxidativa; Antimicina A y Rotenona: inhibidores de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

5.8 Expresión de resultados y análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el software Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Los datos experimentales son expresados como el promedio $\pm$ desviación estándar o promedio $\pm$ error estándar medio ($X \pm SEM$) de tres experimentos independientes ($N=3$). Los análisis estadísticos fueron realizados usando ANOVA de dos colas con posterior test de Bonferroni o *t*-student para comparaciones de diferentes condiciones. Los datos se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización del efecto de compuestos similares a XeB sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama

Como primer acercamiento a evaluar los efectos de los análogos de XeB sobre células tumorales de mama, se procedió a evaluar la viabilidad de las células después de un tratamiento con los compuestos a distintas concentraciones.

Líneas celulares de cáncer de mama triple positivo (MCF-7, ZR-75-1), de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231, BT-549), y de tejido mamario no tumorigénico (MCF10A) fueron tratadas con cada compuesto a concentraciones crecientes de 1 a 20 μ M por 24h. La viabilidad celular fue determinada por citometría de flujo mediante incorporación de yoduro de propidio, debido a que la inhibición de la liberación de calcio mediada por IP3 produce muerte por necrosis (Cárdenas et al., 2016). De forma similar a XeB (Figura 1A), los compuestos 297B y 10B inducen muerte celular estadísticamente significativa en las líneas de cáncer de mama a 10 μ M, sin afectar la viabilidad en la línea no tumorigénica (Figuras 1B y 1C).

Respecto de los otros compuestos analizados, 52A no produce muerte celular, y 54A tiene efecto citotóxico sólo en una condición y en una línea celular (Figuras 1D y 1E).

Además, a 5 y 7.5 μ M los compuestos 297B y 10B no producen muerte en las líneas de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y BT-549, a diferencia de las líneas de cáncer de mama triple positivo MCF-7 y ZR-75-1, las cuales comienzan a morir significativamente desde los 7.5 μ M (Figuras 1B y 1C).

Es por esto que, para evitar que los fenómenos de migración e invasión evaluados en los siguientes objetivos sean interferidos por señalización asociada a muerte, y así esta no enmascare eventuales alteraciones de estos fenómenos, se trabajará con estos compuestos en las líneas triple negativas que son más resistentes a la muerte celular.

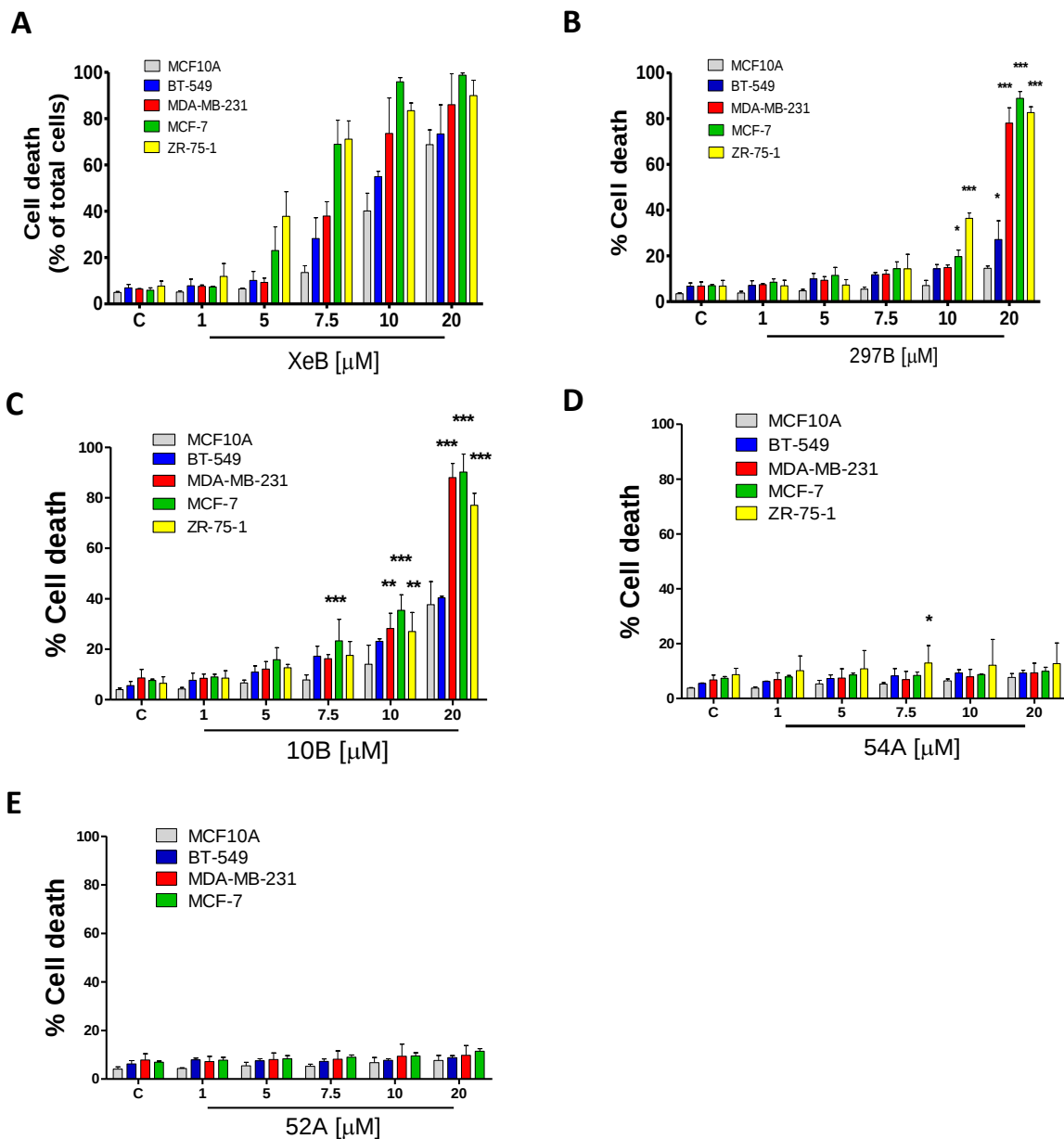


Figura 1. Los compuestos 297B y 10B reducen la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama. (A) Efecto de XeB sobre la viabilidad en líneas de mama no-tumorigénicas y tumorigénicas. **(B)** Efecto de 297B sobre la viabilidad en líneas de mama no-tumorigénicas y tumorigénicas. Los datos se muestran como $X \pm \text{SEM}$, $N = 3$. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ comparado al control respectivo. **(C)** Efecto de 10B sobre la viabilidad en

líneas de mama no-tumorigénicas y tumorigénicas. Los datos se muestran como $X \pm \text{SEM}$, $N = 3$. $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ comparado al control respectivo. **(D)** Efecto de 54A sobre la viabilidad en líneas de mama no-tumorigénicas y tumorigénicas. Los datos se muestran como $X \pm \text{SEM}$, $N = 3$. $*p < 0.05$ comparado a su respectivo control. **(E)** Efecto de 52A sobre la viabilidad en líneas de mama no-tumorigénicas y tumorigénicas. La incorporación de yoduro de propidio (PI) fue determinada por citometría de flujo a 24h de exposición a cada compuesto. Los datos se muestran como $X \pm \text{SEM}$, $N = 3$.

6.2 Los compuestos sintéticos similares a XeB presentan actividad inhibitoria de la señal de Ca^{2+} inducida por ATP en células de cáncer de mama MDA-MB-231

Para caracterizar el efecto de los compuestos sintéticos similares a XeB en la señalización de Ca^{2+} intracelular, se utilizó el indicador de $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmico fluorescente Fluo-4AM y las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. Cuando las células se pretratan con XeB $5 \mu\text{M}$ durante 1 h, la estimulación con ATP no logra inducir la liberación de Ca^{2+} transitoria característica observada en los experimentos de control como se muestra en la Figura 2, obteniéndose un porcentaje de células con respuesta positiva a ATP de sólo 2.1% (Tabla 2). Un efecto similar se observa al pre-incubar las células con el compuesto 10B, que muestra un porcentaje de células positivas de 4.1%, y en menor medida con el compuesto 297B, con un porcentaje de células positivas de

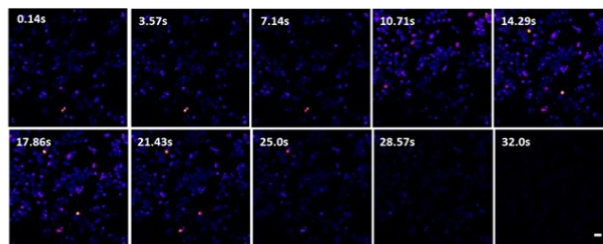
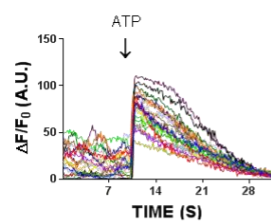
56.7%, y es posible observar esa disminución en la señal de Ca^{2+} inducida por ATP (Figura 2). El compuesto 54A a su vez, es capaz de disminuir el flujo de Ca^{2+} con un porcentaje de células con respuesta positiva a ATP de 68.8%. En cambio, con el compuesto 52A no se observa una inhibición significativa de esta señal.

Tabla 2: Cuantificación de células fluorescentes en respuesta a estímulo de Ca^{2+}

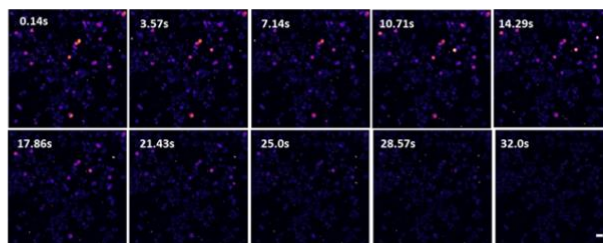
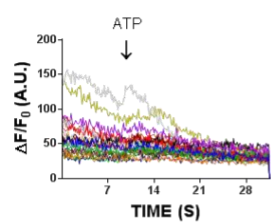
Condición experimental	Porcentaje de células con respuesta positiva a ATP
Control	96.1 $\pm$ 0.68
XeB	2.1 $\pm$ 0.37 ***
10b	4.1 $\pm$ 0.39***
52a	93.8 $\pm$ 1.7 NS
54a	68.8 $\pm$ 9.67 *
297b	56.7 $\pm$ 6.47***

Células MDA-MB-231 fueron incubadas por 1h con un determinado compuesto a 7.5 μM , y luego estimuladas con ATP-Mg a 10 μM en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Los datos se representan como $X \pm \text{SEM}$ de 3 experimentos independientes. En cada experimento se analizaron 200 células por condición. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, NS=no significativo relativo al control.

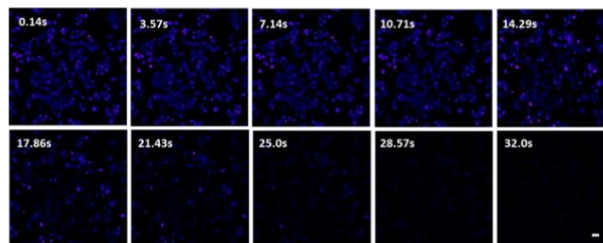
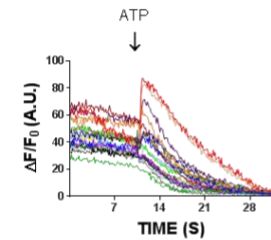
Control



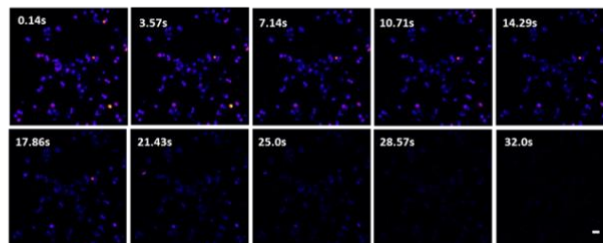
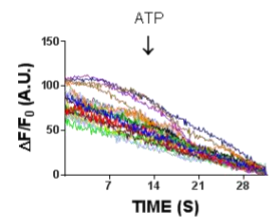
XeB



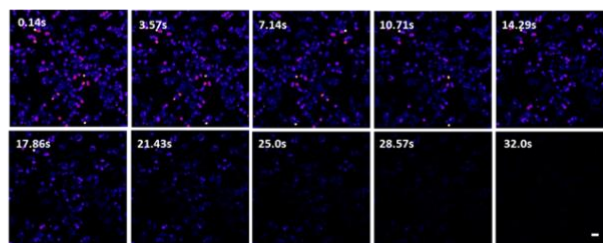
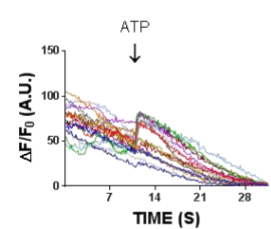
297B



10B



54A



52A

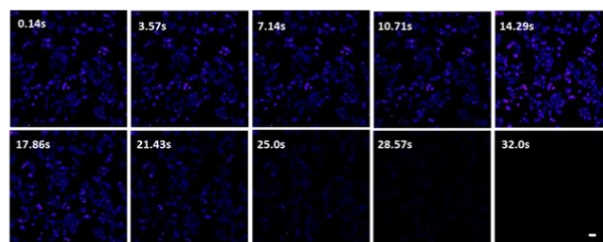
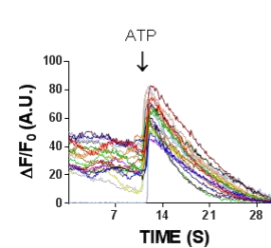


Figura 2: Los compuestos 10B y 297B disminuyen la señal de Ca^{2+} inducida por ATP en células de cáncer de mama. Células MDA-MB-231 fueron incubadas por 1h con XeB, 297B, 10B, 54a y 52a a 7.5 μM , y luego estimuladas con ATP-Mg a 10 μM en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Los datos se representan como $X \pm \text{SEM}$ de 3 experimentos independientes. En cada experimento se analizaron 200 células por condición. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, NS=no significativo relativo al control.

6.3 El compuesto 10B reduce el potencial clonogénico en líneas celulares de cáncer de mama

Una aproximación que nos permite ver el efecto de los compuestos sobre la proliferación es el análisis del potencial clonogénico de las células tratadas. Además, podemos evaluar el efecto que tiene la muerte causada por los compuestos sobre la proliferación de estas células.

La formación de colonias es un hallmark de las células cancerosas que refleja su habilidad de proliferar indefinidamente (Munshi et al., 2005). Al igual que XeB, el compuesto 10B (5 y 7.5 μM , 14 días) disminuye la formación de colonias en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 (Figura 3).

Los compuestos 54A y 52A no afectan la capacidad clonogénica en estas líneas celulares.

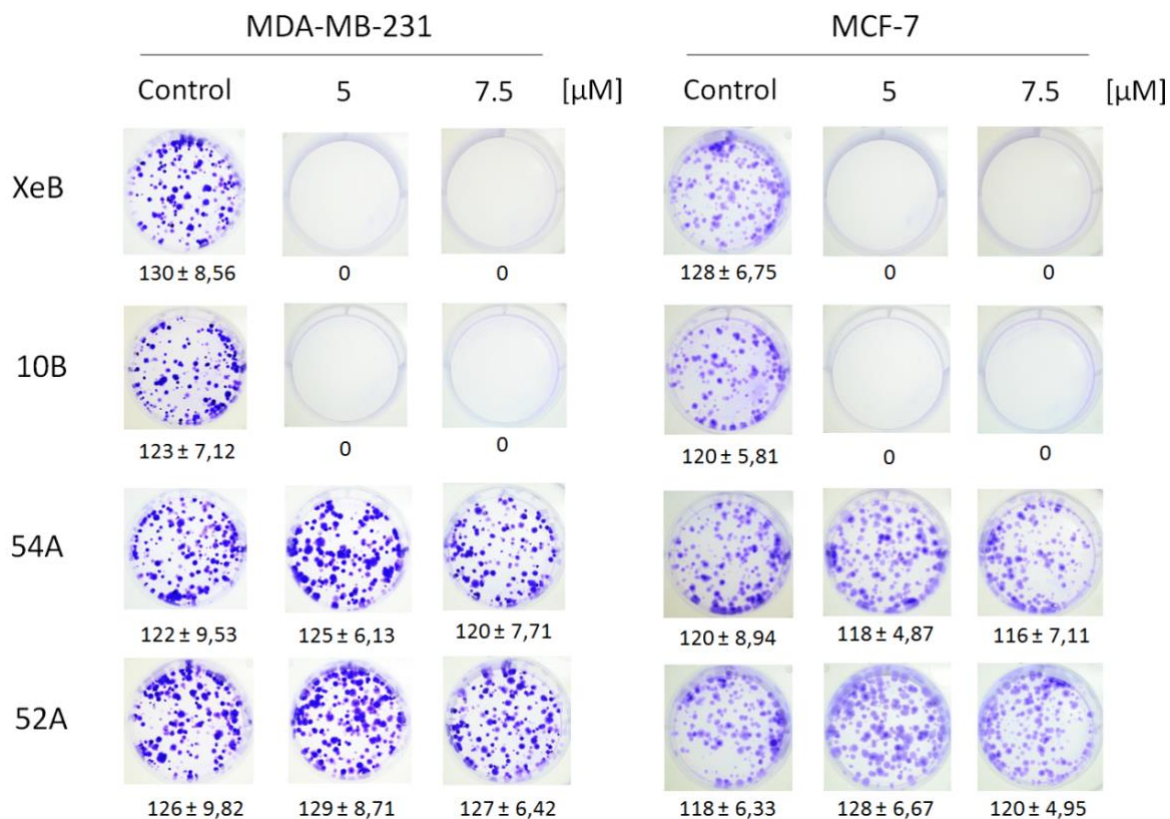


Figura 3: El compuesto 10B disminuye el potencial clonogénico en las líneas celulares de cáncer de mama. Placas representativas de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con concentraciones crecientes de XeB, 10B, 54A o 52A, junto al análisis cuantitativo del número de colonias (abajo). Las células fueron incubadas con el compuesto por 14 días, y luego fueron teñidas con cristal violeta 0,2%. Los datos se muestran como $X \pm SEM$, $N = 2$.

6.4 Evaluación del efecto de compuestos similares a XeB sobre la bioenergética mitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama

Otro factor crucial para evaluar el efecto de los compuestos sobre las células cancerosas en relación a XeB, es el estudio del consumo de oxígeno de estas células tratadas, ya que se conoce que XeB disminuye el consumo de oxígeno basal en células tumorales de mama (Cárdenas et al., 2016).

Para caracterizar el perfil bioenergético de las líneas celulares de cáncer de mama en presencia de cada inhibidor, las células fueron tratadas con los compuestos a concentraciones crecientes por 24h, luego se utilizó el analizador de flujo extracelular Seahorse XF96e para determinar la velocidad de consumo de oxígeno (OCR) en condiciones de sustratos estándar (en presencia de glucosa, glutamina y piruvato según el requerimiento de cada línea celular). Como se muestra en la Figura 4, de los cuatro compuestos, dos mostraron un efecto reduciendo del OCR basal mitocondrial (297B y 10B), de manera similar a XeB. En cambio, los otros dos compuestos (54A, 52A) no generan un efecto en el consumo de oxígeno a las concentraciones utilizadas.

El efecto de estos compuestos activos en el consumo de oxígeno basal mitocondrial fue dosis dependiente, con 7.5 μ M como la mínima concentración requerida para reducir significativamente el OCR basal.

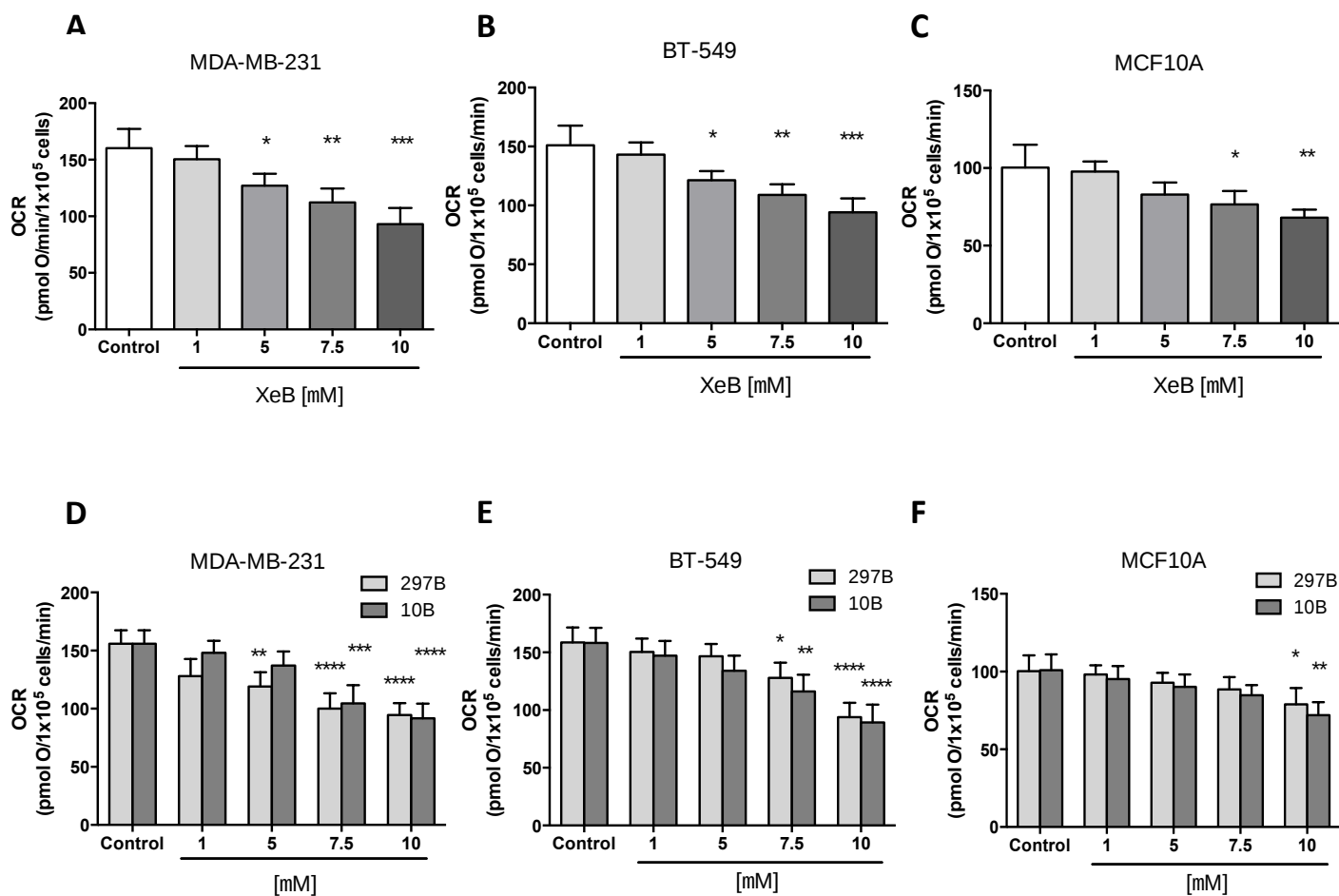


Figura 4. Efecto de los compuestos sintéticos en respiración mitocondrial basal de células de cáncer de mama. (A) OCR basal de células MDA-MB-231 incubadas con XeB. (B) OCR basal de células BT-549 incubadas con XeB. (C) OCR basal de células MCF10A incubadas con XeB. (D) OCR basal de células MDA-MB-231 incubadas con los compuestos 297B y 10B. (E) OCR basal de células BT-549 incubadas con los compuestos 297B y 10B. (F) OCR basal de células MCF10A incubadas con los compuestos 297B y 10B. Las células de mama fueron incubadas con los compuestos por 24h y el OCR fue medido utilizando Seahorse XF96e Extracellular Flux Analyzer. Los datos se muestran como $X \pm SEM$, $N = 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ respecto al control respectivo.

6.5 El compuesto 10B disminuye la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la migración e invasión, se seleccionaron los compuestos que mostraron tener actividad similar a XeB en su efecto sobre citotoxicidad y proliferación, disminución del flujo de Ca^{2+} y en bioenergética mitocondrial, es decir los compuestos 10B y 297B. Con fin de estudiar la migración celular se utilizó la aproximación experimental de transwell. Líneas celulares de cáncer de mama triple negativo fueron estimuladas con el compuesto activo 10B por 24h, luego fueron sembradas en placas transwell y se dejaron migrar por 2h. De forma similar a XeB, 10B a 7.5 μM disminuye significativamente la migración celular en las líneas altamente migratorias MDA-MB-231 y BT-549 (Figura 5).

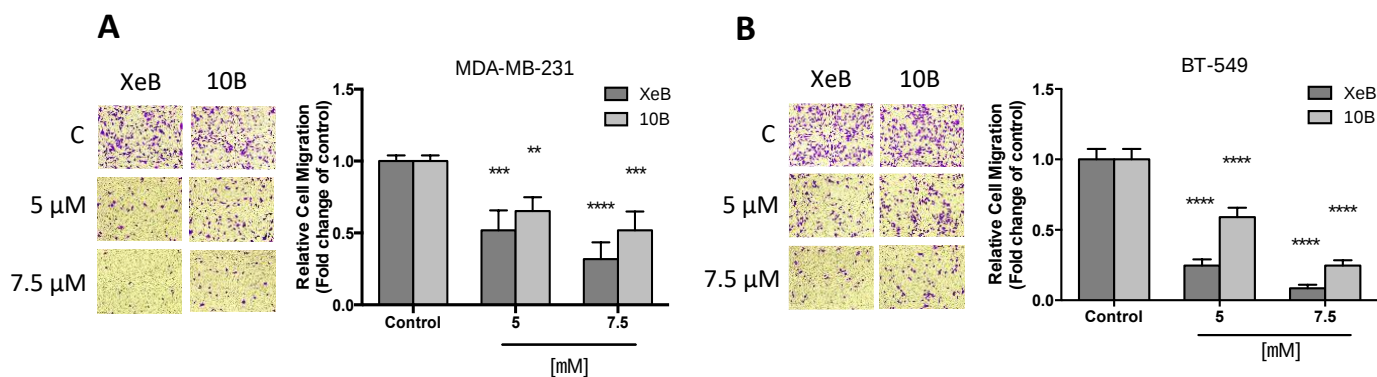


Figura 5: Efecto del compuesto 10B en migración de células de cáncer de mama triple negativo. (A) Efecto de XeB y 10B en migración celular de células MDA-MB-231.

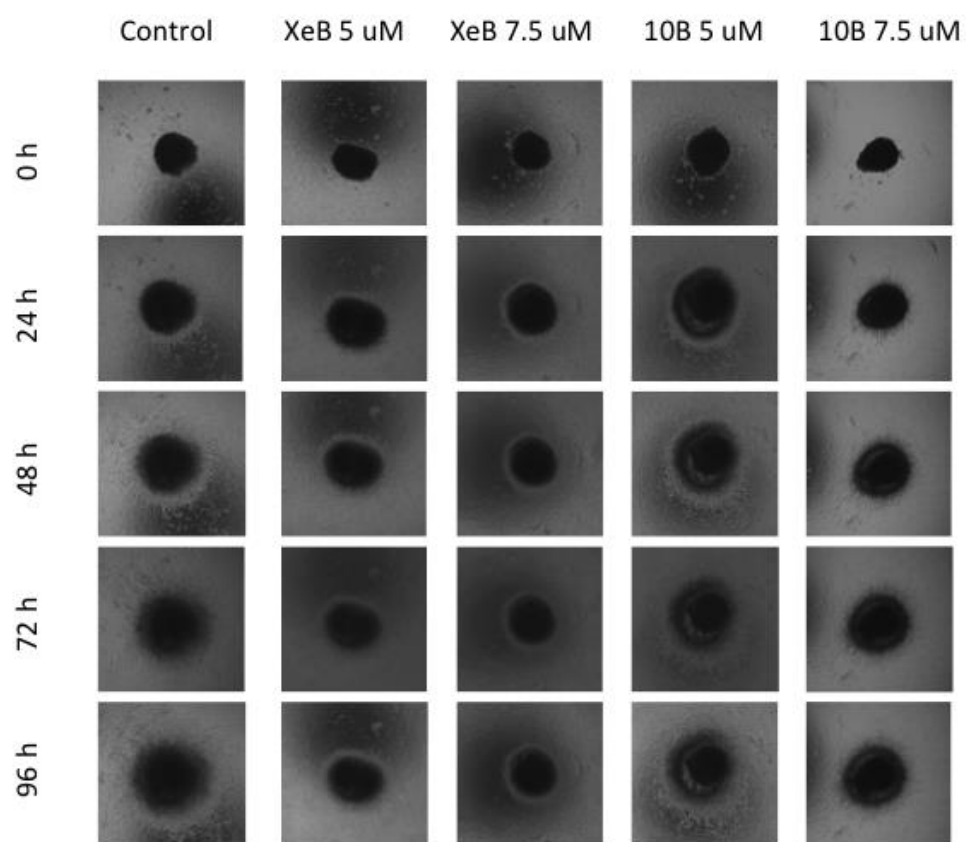
(B) Efecto de XeB y 10B en migración celular de células BT-549. Las células fueron incubadas con XeB o con 10B por 24h, luego se sembraron en placas transwell y se dejaron migrar durante 2h, luego de las cuales se tiñeron con cristal violeta 0.2%. Los datos se muestran como $X \pm \text{SEM}$, $N = 3$.

6.6 El compuesto 10B disminuye la invasión celular en la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231

Para estudiar la invasión de células cancerosas, se han desarrollado y utilizado diversos ensayos in vitro. Muchos ensayos in vitro comunes para evaluar la invasión del cáncer son bidimensionales (2D), los cuales no pueden replicar las condiciones observadas en el entorno tridimensional (3D) del cuerpo humano. Además, la monocapa de células utilizadas en los ensayos 2D no refleja las interacciones dinámicas entre las células cancerosas del tumor primario y entre las células tumorales y la MEC. Es por esto que se realizó un ensayo de invasión de esferoides en matriz 3D, que es cuantificable y dependiente de la degradación en un entorno que imita el microambiente tumoral.

Esferoides multicelulares de células MDA-MB-231 fueron generados en un medio con agarosa 1% y luego implantados en una matriz (gel) de colágeno, posteriormente fueron tratados con el compuesto 10B y XeB por 96 horas y cada 24 horas se documentó el crecimiento mediante imágenes.

A



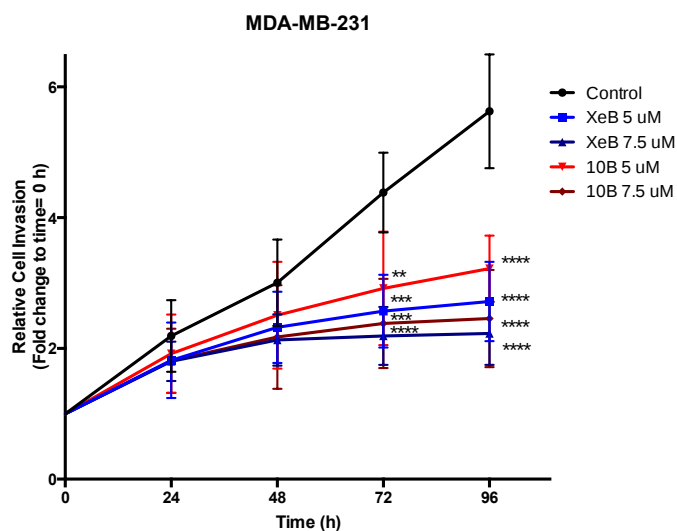
B

Figura 6: Efecto del compuesto 10B en invasión en células de cáncer de mama triple negativo. (A) Imágenes representativas del efecto de XeB y 10B a 5 y 7.5 μ M en invasión de esferoides en la línea celular MDA-MB-231. **(B)** Cuantificación de la invasión de esferoides de células MDA-MB-231 estimuladas con XeB y 10B a 5 y 7.5 μ M. Los esferoides fueron incubados por 96 h con XeB o 10B, y cada 24 h se registró la invasión en la matriz de colágeno mediante imágenes. Los datos se muestran como $X \pm \text{SEM}$, $N = 3$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ respecto al control respectivo.

7. DISCUSIÓN

Uno de los principales resultados de este estudio es la identificación de un nuevo compuesto sintético estructuralmente similar a XeB, que al igual que esta molécula produce muerte celular selectiva en células de cáncer de mama.

Como se mencionó anteriormente, se considera a XeB como inhibidor competitivo del receptor de IP3 [105], por lo que se espera que interaccione con el receptor en el dominio de unión a IP3 (IP3BD). La interacción entre IP3 y el IP3BD es dada por una serie de puentes de hidrógeno, formados por la interacción entre los grupos fosfato de IP3 y residuos cargados positivamente dentro del IP3BD, e interacciones hidrofóbicas, por la interacción del anillo inositol de IP3 con residuos hidrofóbicos en el IP3BD [111]. A su vez, la molécula de XeB también tiene grupos funcionales que le permiten interactuar con el IP3BD mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, como lo son su grupo hidroxilo, sus grupos éter, aminas y ciclos. La presencia de estos grupos en los compuestos sintéticos similares a XeB, y sus variaciones estructurales como lo son la apertura de ciclos, los hacen interactuar con IP3BD de manera similar a XeB.

La transferencia constitutiva de Ca^{2+} RE-mitocondria permite un estado bioenergético celular óptimo, manteniendo el flujo a través del ciclo de Krebs para sostener la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. La reducción de esta

transferencia de Ca^{2+} se traduce en una disminución en la producción de ATP y en la activación de AMPK, lo que promueve la autofagia como un mecanismo de supervivencia. (Cárdenas et al. 2010).

Esta transferencia constitutiva de Ca^{2+} a la mitocondria es un requerimiento esencial para la sobrevivencia de células tumorales. En ausencia de esta comunicación, ya sea como consecuencia de un bloqueo en la salida de Ca^{2+} mediada por IP3R o por un bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, se genera una crisis bioenergética que es similar en células normales y en tumorales. En respuesta a esta crisis se activa la autofagia, que permite a las células normales sobrevivir, sin embargo, esta respuesta es insuficiente en células tumorales, las cuales mueren por necrosis cuando atraviesan mitosis. La muerte específica de células cancerosas fue observada en líneas celulares tumorigénicas humanas derivadas de cáncer de mama, próstata, cérvix, hueso, colon, riñón, piel y cerebro; además, la inhibición del IP3R redujo el crecimiento de tumores *in vivo* (Cárdenas et al. 2016).

Estos datos sugieren que las células cancerosas, debido a su dependencia de OXPHOS y el ciclo de Krebs para su viabilidad, tienen una dependencia fundamental en la transferencia de Ca^{2+} de RE a mitocondrias a través de la activación de deshidrogenasas dependientes de Ca^{2+} que mantienen pasos clave en el ciclo de Krebs y OXPHOS.

Las células normales también dependen de OXPHOS y del ciclo de Krebs, pero, a diferencia de las células cancerosas examinadas, la interrupción de la transferencia constitutiva de Ca^{2+} desde RE a mitocondria tiene poco efecto sobre su viabilidad. Las células normales activan la autofagia como un mecanismo de supervivencia en estas condiciones [67]. Asimismo, las células tumorales también activan la autofagia en estas condiciones, sin embargo, esta inhibición tiende a inducir la muerte celular [112]. Entonces, ¿cuál es la diferencia entre células tumorigénicas y no tumorigénicas, que lleva a la dependencia de Ca^{2+} mitocondrial específicamente en células cancerosas?

La inhibición de la captación de Ca^{2+} mitocondrial en células normales disminuye la proliferación, mientras que en células tumorales no lo hace, causando la muerte celular durante la citocinesis. Esta falla de las células tumorales para disminuir la proliferación celular, aun cuando se encuentran en un estado energéticamente comprometido, parece ser el principal mecanismo que las distingue de las células no tumorigénicas y explica su susceptibilidad a la muerte celular.

Otro resultado principal de este trabajo es la demostración de que ambos compuestos, XeB y 10B disminuyen la migración y la invasión celular en células de cáncer de mama triple negativo. Muchos estudios han mostrado reiteradamente una correlación entre el flujo de Ca^{2+} RE-mitocondria, con la invasión y metástasis de células tumorales, mostrando *in vitro* e *in vivo* la

disminución de la migración al intervenir la transferencia de Ca^{2+} a nivel de IP3Rs, MCU, y VDAC [78] [81] [83]. Aunque no fue descrito por Cárdenas et. al, se espera que una crisis bioenergética inducida de manera similar también pueda inhibir la invasión de células cancerosas y la metástasis, basado en el requerimiento de fosforilación oxidativa funcional en la metástasis tumoral [33] [106] [108], así como en las demandas bioenergéticas limitadas espacialmente necesarias para la migración celular [23] [31] [109].

Es de importancia destacar que, a pesar de que en este trabajo se induce una crisis bioenergética de manera similar a la inducida por Cárdenas et. al, al escoger una concentración de inhibidor de IP3R a la cual no se afecta significativamente la viabilidad, se espera que el efecto al disminuir la migración e invasión no sea derivado de un mecanismo de muerte como el descrito en ese trabajo, sino que sea un mecanismo independiente y relativo únicamente a procesos de migración e invasión celular.

Este mecanismo es objeto de estudio actualmente en el Laboratorio de Metabolismo Celular y Bioenergética dirigido por el Dr. César Cárdenas, donde se realizó este trabajo, teniendo como posibles vías la activación de AMPK y la autofagia como causas de la disminución de los procesos de migración e invasión celular en células cancerosas cuando se interrumpe la liberación de Ca^{2+} reticular a través de IP3R (Cárdenas et al., 2010, 2016). Ambos focos se han relacionado con una disminución de la migración e invasión en distintos modelos celulares,

en el caso de AMPK, al ser activada por estrés metabólico resulta en un mecanismo que induce la inhibición de la quinasa de adhesiones focales (FAK), un regulador esencial del ensamblaje de los complejos macromoleculares que unen al citoesqueleto de actina con la matriz extracelular y que permiten la motilidad celular (Caino et al., 2013). Por otro lado, la autofagia también podría considerarse causal de este fenómeno, al haberse descrito que modula la migración celular mediante el reciclaje de integrinas $\beta 1$, receptores transmembrana que interaccionan con el citoesqueleto y la matriz extracelular (Tuloup-Minguez et al., 2013).

8. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

En este trabajo se caracterizaron cuatro nuevos compuestos sintéticos estructuralmente similares a XeB, un inhibidor específico del receptor de IP3. Se identificaron dos con efectos similares a XeB al ser capaces de disminuir la respiración basal mitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama, disminuir el potencial clonogénico y la viabilidad selectivamente en células tumorales y no en células no tumorigénicas.

A partir de uno de los compuestos más activos (10B) se determinó el efecto de la inhibición de la transferencia de Ca^{2+} RE-mitocondria en migración e invasión celular, mostrando que esta inhibición disminuye significativamente la migración y la invasión celular en líneas de cáncer de mama triple negativo.

Estos nuevos compuestos emergen como potenciales nuevos inhibidores de la transferencia de Ca^{2+} RE-mitocondria mediada por IP3R con actividad anti-tumorigénica. Estos resultados contribuyen a la creciente evidencia que apunta a esta transferencia de Ca^{2+} entre ER y mitocondria como una oportunidad para desarrollar posibles tratamientos contra la metástasis, además, sugiere que estrategias terapéuticas originalmente diseñadas para promover la muerte celular también pueden ser útiles en el control de la metástasis.

9. GLOSARIO

- Adhesiones focales: Sitios de adhesión entre célula y matriz extracelular, son grandes conjuntos macromoleculares asociados a membrana plasmática conectados al citoesqueleto de actina, mediante la interacción de proteínas transmembrana (integrinas) con sus ligandos extracelulares. Además, son sitios de transducción de señales bioquímicas y mecánicas en respuesta a la adhesión.

- AMPK (Proteína quinasa activada por AMP): Complejo enzimático altamente conservado entre especies por ser un regulador central del metabolismo celular. Se activa ante un estrés energético cuando los niveles de ATP disminuyen y aumentan niveles de ADP y AMP. En respuesta, AMPK activa vías catabólicas para generar ATP, es decir, induce la captación de glucosa y estimula la glicólisis, induce la captación y oxidación de ácidos grasos y activa la autofagia, e inhibe vías anabólicas como procesos biosintéticos que consumen ATP.

- Angiogénesis: Formación de vasos sanguíneos y capilares nuevos a partir del crecimiento de vasos sanguíneos preexistentes. Es un proceso fisiológico normal que ocurre durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas, sin embargo es fundamental durante el crecimiento tumoral y es necesario para su diseminación en la metástasis.

- Autofagia: Proceso de degradación celular regulada de material citoplásmico, es decir moléculas y organelos, en lisosomas para su posterior reciclaje, produciendo nuevos bloques de construcción para la renovación de componentes celulares y la homeostasis celular. Es inducido ante diferentes tipos de estrés, previniendo el daño celular y promoviendo la supervivencia.

- Ciclo celular: Serie de sucesos controlados que conducen al crecimiento de una célula y su división en dos células hijas. Estos eventos incluyen la duplicación de su ADN (replicación del ADN) y algunos de sus organelos, y posteriormente la

partición de su citoplasma y otros componentes en dos células hijas en un proceso llamado división celular.

- Ciclo de Krebs: También llamado ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo del ácido cítrico, es una serie de reacciones químicas utilizada por los organismos aeróbicos para generar energía celular e intermediarios para las vías biosintéticas. Esta serie de reacciones no solo es capaz de suplir gran parte de las necesidades energéticas en organismos complejos, sino que las moléculas que se producen en estas reacciones pueden usarse como bloques de construcción para una gran cantidad de procesos importantes, incluida la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos para la construcción de proteínas, y purinas y pirimidinas utilizadas en la síntesis de ADN.

- Citotoxicidad: Es el grado en que un estímulo endógeno o exógeno puede dañar una célula. Una sustancia o proceso que causa daño o muerte celular se denomina citotóxico. Las células expuestas a compuestos citotóxicos pueden sufrir necrosis (muerte celular), apoptosis (muerte celular programada), autofagia como mecanismo de supervivencia, o dejar de crecer y dividirse activamente disminuyendo la proliferación celular.

- Efecto Warburg: Describe el fenómeno en el cual las células tumorales obtienen energía metabolizando la glucosa principalmente de forma anaeróbica mediante glicólisis, y no de forma aeróbica a pesar de estar en presencia de oxígeno. Fue descrito por Otto Warburg en 1924 al observar que los tumores consumen enormes cantidades de glucosa en relación con la mayoría de los tejidos normales, y que gran parte de la glucosa consumida por los tumores se fermenta a lactato, en lugar de oxidarse en vías que requieren respiración.

- Estrés metabólico: Resulta de un agotamiento u exceso de nutrientes, desencadenando una serie de diferentes respuestas adaptativas para restaurar la homeostasis dinámica y mantener la función celular. Esto es, diversas vías de señalización que detectan y posteriormente ajustan alteraciones en el metabolismo de intermediarios o energético (ATP, NAD⁺, oxígeno).

- Fosforilación oxidativa (OXPHOS): Es la vía metabólica final en la producción de ATP. La energía almacenada en nutrientes como la glucosa es liberada en el ciclo de Krebs, produciendo dióxido de carbono y los donantes de electrones NADH y FADH. La fosforilación oxidativa utiliza estas moléculas junto al O₂, transportando iones H⁺ y electrones a los complejos proteicos que conforman la cadena de transporte de electrones, generando el potencial de membrana mitocondrial que permite la síntesis de ATP.

- Glicólisis: Es una serie de reacciones que extraen energía de la glucosa para el metabolismo celular. Consiste en diez reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir otras vías metabólicas para la obtención de energía en forma de ATP y NADH. No requiere oxígeno, y se encuentra en una gran cantidad de especies, por lo que se ha determinado como una vía metabólica antigua.

- “Hallmarks” del cáncer: En el año 2000, Hanahan y Weinberg publican el artículo “The hallmarks of cancer” en el cual organizan capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo del cáncer, incluyendo: (1) mantención de la señalización proliferativa, (2) evasión de supresores de crecimiento, (3) resistencia a la muerte celular, (4) potencial replicativo ilimitado, (5) inducción de angiogénesis, e (6) invasión de tejidos y metástasis. Una década más tarde, se añadieron dos características: (7) reprogramación del metabolismo energético y (8) evasión de la respuesta inmune, y además se agregaron dos características habilitadoras: (1) inestabilidad genómica y mutación, y (2) inflamación promotora de tumores.

- Homeostasis: Capacidad de un organismo para mantener las variables internas físicas y químicas del cuerpo dentro de los límites que le permiten sobrevivir. La homeostasis también se define como los procesos de autorregulación para el funcionamiento óptimo del organismo, que abarca diversas variables, como la temperatura corporal, el balance de fluidos, el pH del líquido extracelular, las concentraciones de iones de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, el nivel de azúcar en sangre, entre muchas otras.

- IC50: O concentración media inhibitoria máxima, es una medida que indica la cantidad de una sustancia inhibidora particular (por ejemplo, un fármaco) que se

necesita para inhibir, in vitro, un proceso biológico o componente biológico determinado a la mitad. Proporciona una medida de la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica.

- Invasión celular: La invasión celular se relaciona con la migración celular, y consiste en la capacidad de las células para volverse móviles y navegar a través de la matriz extracelular dentro de un tejido o para infiltrarse en tejidos vecinos. Las células cancerosas que se vuelven invasivas pueden diseminarse a sitios secundarios y formar metástasis.

- Metástasis: Propagación del cáncer a una parte del cuerpo distante del tumor maligno primario original, mediante la diseminación de células cancerosas a través del sistema linfático o sanguíneo. Las nuevas apariciones de cáncer en otros órganos o tejidos del cuerpo se denominan metástasis. El curso de la metástasis tumoral conlleva una serie de eventos denominada cascada metastásica, y es en gran medida responsable de la mortalidad y morbilidad del cáncer.

- Migración celular: Movimiento de una sola célula o un grupo de células en respuesta a señales químicas y/o mecánicas. Es un proceso fisiológico fundamental que ocurre durante el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, homeostasis de tejidos y las respuestas inmunitarias. Sin embargo, las células en movimiento pueden desregularse y contribuir a muchos procesos patológicos como la inflamación y la metástasis del cáncer.

-mTOR: Por la sigla en inglés Mammalian Target Of Rapamycin, es una proteína quinasa que controla el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a nutrientes, factores de crecimiento, energética celular y estrés.

- Poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP): Poro proteico que se forma en la membrana mitocondrial interna bajo ciertas condiciones patológicas, tales como estrés oxidativo (ROS), exceso de iones Ca^{2+} , entre otras. La apertura

del poro de transición de permeabilidad, puede provocar inflamación mitocondrial y muerte celular por apoptosis o necrosis.

- Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): Las mitocondrias mantienen la fosforilación oxidativa creando un potencial eléctrico en la membrana interna, generado por un gradiente de protones (iones H^+) impulsado por la cadena transportadora de electrones para la síntesis de ATP.

- Respiración celular: Un conjunto de reacciones catabólicas y procesos metabólicos que tienen lugar dentro de una célula en los que la energía se obtiene a partir de nutrientes (azúcares, aminoácidos y ácidos grasos) y se almacena en moléculas transportadoras de energía (por ejemplo, ATP) para su uso en procesos celulares que requieren energía. Hay tres etapas principales en la respiración celular: glicólisis, ciclo de Krebs y transporte de electrones/ fosforilación oxidativa.

- ROS (Especies reactivas de oxígeno): Son un conjunto de moléculas químicas y radicales libres altamente reactivos derivados del O_2 , que se forman por reacciones de reducción-oxidación (redox) o por excitación electrónica. En un contexto biológico, las ROS son subproductos del metabolismo normal del oxígeno. Tienen funciones en la señalización celular y la homeostasis. Los ROS son intrínsecos al funcionamiento celular y están presentes en niveles bajos y constantes dentro de las células. Una acumulación de ROS puede dañar el ADN, el ARN y las proteínas, y puede causar la muerte celular.

- Vías de señalización celular: La señalización celular orquesta las actividades celulares básicas y dirige los procesos celulares a través de una compleja coordinación de respuestas al microambiente celular. Se le denomina señalización celular o transducción de señales a la compleja interacción de un receptor activado ante un estímulo, con otras proteínas dentro de la célula formando una serie o “cascada” de eventos moleculares, para finalmente producir una respuesta celular.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [2] Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, 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.
- [3] Lortet-Tieulent, J, Georges, D, Bray, F, Vaccarella, S. Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. *Int. J. Cancer.* 2020; 147: 3029– 3036.
- [4] Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2019). Plan Nacional del Cáncer 2018-2028.
- [5] Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149, 778– 789.
- [6] Icaza, G., Núñez, I., & BuGueño, H. (2017). Descripción epidemiológica de la mortalidad por cáncer de mama en mujeres en Chile Epidemiological analysis of breast cancer mortality in women in Chile. *Salud Pública Rev Med Chile* 145(145), 1.
- [7] Stingl, J., & Caldas, C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature Reviews Cancer*, 7, 791.
- [8] Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights. Pathology*, 8, 23–31.
- [9] Godone, R. L. N., Leitão, G. M., Araújo, N. B., Castelletti, C. H. M., Lima-Filho, J. L., & Martins, D. B. G. (2018). Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 14–34.
- [10] Weigelt, B., Peterse, J. L., & van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 591–602.

- [11] Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4), 679–695.
- [12] Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292.
- [13] Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H. et al. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther* 5, 28.
- [14] Metallo, C. M., & Vander Heiden, M. G. (2010). Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling. *Genes & Development*, 24(24), 2717–2722.
- [15] Lu, C., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metabolism*, 16(1), 9–17.
- [16] Bailey, K. M., Wojtkowiak, J. W., Hashim, A. I., & Gillies, R. J. (2012). Targeting the Metabolic Microenvironment of Tumors. *Advances in Pharmacology* (San Diego, Calif.), 65, 63–107.
- [17] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. Garland Science, pp.74-78, 758-763.
- [18] Solaini, G., Sgarbi, G., & Baracca, A. (2011). Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 534–542.
- [19] Tarasov, A. I., Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca^{2+} . *Cell Calcium*, 52(1), 28–35.
- [20] Locasale, J. W., & Cantley, L. C. (2011). Metabolic Flux and the Regulation of Mammalian Cell Growth. *Cell Metabolism*, 14(4), 443–451.
- [21] Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309 LP-314.
- [22] Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703–707.
- [23] Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.

- [24] Hanahan D, Weinberg R. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-74.
- [25] Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 269–270.
- [26] Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11, 325.
- [27] Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3), 555–566.
- [28] Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*, 23(1), 27–47.
- [29] Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*, 21(3), 297–308.
- [30] Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487), eaaw5473.
- [31] DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), e1600200.
- [32] DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7(1), 11–20.
- [33] Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2015). Essential Role for Oxidative Phosphorylation in Cancer Progression. *Cell Metabolism*, 21(1), 11–12.
- [34] Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?. *Nature reviews. Cancer*, 14(11), 709–721.
- [35] Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., ... Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *PNAS*, 107(19), 8788–8793.

- [36] Viale, A., Pettazzoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sánchez, N., Marchesini, M., ... Draetta, G. F. (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*, 514(7524), 628–632.
- [37] LeBleu, V. S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., ... Kalluri, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology*, 16, 9.
- [38] Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., ... Berridge, M. V. (2015). Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metabolism*, 21(1).
- [39] Dupuy, F., Tabariès, S., Andrzejewski, S., Dong, Z., Blagih, J., Annis, M. G., ... Siegel, P. M. (2015). PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metabolism*, 22(4), 577–589.
- [40] Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058.
- [41] Bhosale, G., Sharpe, J. A., Sundier, S. Y., & Duchen, M. R. (2015). Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1350(1), 107–116.
- [42] Roderick, H. L., & Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer*, 8, 361.
- [43] Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., & Roberts-Thomson, S. J. (2007). Calcium and cancer: Targeting Ca²⁺ transport. *Nature Reviews Cancer*, 7(7), 519–530.
- [44] Monteith, G. R., Prevarskaya, N., & Roberts-Thomson, S. J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. *Nature reviews. Cancer*, 17(6), 367–380.
- [45] Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 11.
- [46] Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., & Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12), 1035–1049.

- [47] Bagur, R., & Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Molecular Cell*, 66(6), 780–788.
- [48] Rizzuto, R., & Pozzan, T. (2006). Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews*, 86(1), 369–408.
- [49] Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T. G., ... Hajnóczky, G. (2010). Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell*, 39(1), 121–132.
- [50] Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529.
- [51] Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., & Marks, A. R. (2017). Intracellular calcium release channels: an update. *Journal of Physiology*, 595(10), 3041–3051.
- [52] Patergnani, S., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., ... Pinton, P. (2011). Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Communication and Signaling*, 9, 19.
- [53] Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., & Su, T.-P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology*, 19(2), 81–88.
- [54] Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., & Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5370), 176.
- [55] Csordas G., Renken C., Varnai P., Walter L., Weaver D., Buttle K., Balla T., Mannella C., Hajnoczky G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 174(7), 91.
- [56] Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., & Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262(5134), 744 LP-747.

- [57] De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., Pinton, P., & Rizzuto, R. (2012). VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca^{2+} signals to mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 19(2), 267–273.
- [58] Gincel, D., Zaid, H., & Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal*, 358(1), 147–155.
- [59] Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., ... Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 341.
- [60] Patron, M., Raffaello, A., Granatiero, V., Tosatto, A., Merli, G., De Stefani, D., ... Rizzuto, R. (2013). The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Physiological Roles. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10750–10758.
- [61] Mak, D. O., & Foskett, J. K. (2015). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell calcium*, 58(1), 67–78.
- [62] Foskett, J. K., White, C., Cheung, K.-H., & Mak, D.-O. D. (2007). Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels. *Physiological Reviews*, 87(2), 593–658.
- [63] Mikoshiba, K. (2007). IP3 receptors and their role in cell function. In J. Krebs & M. B. T.-N. C. B. Michalak (Eds.), *Calcium* (Vol. 41, pp. 267–285). Elsevier.
- [64] Decuypere, J.-P., Monaco, G., Bultynck, G., Missiaen, L., De Smedt, H., & Parys, J. B. (2011). The IP3 receptor–mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), 1003–1013.
- [65] Denton, R. M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(11), 1309–1316.
- [66] Tarasov, A. I., Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca^{2+} . *Cell calcium*, 52(1), 28–35.
- [67] Cárdenas, C., Miller, R. A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., ... Foskett, J. K. (2010). Essential Regulation of Cell Bioenergetics By Constitutive InsP3 Receptor Ca^{2+} Transfer to Mitochondria. *Cell*, 142(2), 270–283.

- [68] Cárdenas, C., Müller, M., McNeal, A., Lovy, A., Jaña, F., Bustos, G., ... Foskett, J. K. (2016). Selective vulnerability of cancer cells by inhibition of Ca²⁺ transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria. *Cell Reports*, 14(10), 2313–2324.
- [69] Mossmann, D., Park, S., & Hall, M. N. (2018). mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 18(12), 744-757.
- [70] Herzig, S., & Shaw, R. J. (2017). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), 121–135.
- [71] Muller, W. A. (2011). Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. *Annual Review of Pathology*, 6, 323–344.
- [72] Lansdown A. B. (2002). Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 10(5), 271–285.
- [73] Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., & Waterman, C. M. (2010). Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 315–333.
- [74] Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.-S., & Cheng, H. (2008). Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, 457, 901.
- [75] Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., ... Horwitz, A. R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*, 302(5651), 1704 LP-1709.
- [76] Wei, C., Wang, X., Zheng, M., & Cheng, H. (2012). Calcium gradients underlying cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(2), 254–261.
- [77] Tsai, F.-C., & Meyer, T. (2012). Ca²⁺ pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. *Current Biology : CB*, 22(9), 837–842.
- [78] Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature Reviews Cancer*, 11, 609.
- [79] Paupe, V., & Prudent, J. (2018). New insights into the role of mitochondrial calcium homeostasis in cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(1), 75–86.

- [80] Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Deygas, M., Rimokh, R., & Gillet, G. (2016). Mitochondrial Ca^{2+} uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration. *Scientific Reports*, 6, 36570.
- [81] Kerkhofs, M., Bittremieux, M., Morciano, G., Giorgi, C., Pinton, P., Parys, J. B., & Bultynck, G. (2018). Emerging molecular mechanisms in chemotherapy: Ca^{2+} signaling at the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *Cell Death & Disease*, 9.
- [82] White, C. (2017). The Regulation of Tumor Cell Invasion and Metastasis by Endoplasmic Reticulum-to-Mitochondrial Ca^{2+} Transfer. *Frontiers in Oncology*, 7, 171.
- [83] Arif, T., Vasilkovsky, L., Refaely, Y., Konson, A., & Shoshan-Barmatz, V. (2014). Silencing VDAC1 Expression by siRNA Inhibits Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth In Vivo. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 3(4), e159.
- [84] Huang, H., Shah, K., Bradbury, N. A., Li, C., & White, C. (2014). Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca^{2+} uptake and reactive oxygen species generation. *Cell death & disease*, 5(10), e1482.
- [85] Wu, C. H., Lin, Y. W., Wu, T. F., Ko, J. L., & Wang, P. H. (2016). Clinical implication of voltage-dependent anion channel 1 in uterine cervical cancer and its action on cervical cancer cells. *Oncotarget*, 7(4), 4210–4225.
- [86] Shibao K, Fiedler MJ, Nagata J, Minagawa N, Hirata K, Nakayama Y, et al. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium* (2010) 48:315–23.
- [87] Sakakura, C., Hagiwara, A., Fukuda, K., Shimomura, K., Takagi, T., Kin, S., ... Yamagishi, H. (2003). Possible involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3) in the peritoneal dissemination of gastric cancers. *Anticancer research*, 23.
- [88] Kang, S. S., Han, K. S., Ku, B. M., Lee, Y. K., Hong, J,... Lee, C. J (2010). Caffeine-mediated inhibition of calcium release channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival. *Cancer Research*, 70(3).
- [89] Tang, S., Wang, X., Shen, Q., Yang, X., Yu, C., Cai, C., ... Zou, F. (2015). Mitochondrial Ca^{2+} uniporter is critical for store-operated Ca^{2+} entry-dependent

breast cancer cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(1), 186–193.

- [90] Tosatto, A., Sommaggio, R., Kummerow, C., Bentham, R. B., Blacker, T. S., Berecz, T., ... Mammucari, C. (2016). The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF-1 α . *EMBO Molecular Medicine*, 8(5), 569–585.
- [91] Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., ... Hayashi, J.-I. (2008). ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science*, 320(5876), 661 LP-664.
- [92] Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, 9, 205031212111034366.
- [93] Huang, M., Lu, J.J. & Ding, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat. Prod. Bioprospect.* 11, 5–13 (2021).
- [94] Bhatnagar, I., & Kim, S.-K. (2010). Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies. *Marine Drugs*, 8(10), 2702–2720.
- [95] Calcabrini, C., Catanzaro, E., Bishayee, A., Turrini, E., & Fimognari, C. (2017). Marine Sponge Natural Products with Anticancer Potential: An Updated Review. *Marine Drugs*, 15(10), 310.
- [96] Chairman, K., Ranjit Singh, A. J. A., & Alagumuthu, G. (2012). Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(3), 234-238.
- [97] M. Nakagawa, M. Endo, N. Tanaka, L. Gen-Pei. (1984). Structures of xestospongins A, B, C, D, novel vasodilative compounds from marine sponge *Xestospongia exigua*. *Tetrahedron Lett.*, 25, 3227– 3230.
- [98] Quirion, J.-C., Sevenet, T., Husson, H.-P., Weniger, B., & Debitus, C. (1992). Two New Alkaloids from *Xestospongia* sp., a New Caledonian Sponge. *Journal of Natural Products*, 55(10), 1505–1508.

- [99] Gafni, J., Munsch, J. A., Lam, T. H., Catlin, M. C., Costa, L. G., Molinski, T. F., & Pessah, I. N. (1997). Xestospongins: Potent Membrane Permeable Blockers of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *Neuron*, 19(3), 723–733.
- [100] Wilcox, R. A., Primrose, W. U., Nahorski, S. R., & Challiss, R. A. J. (1998). New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(11), 467–475.
- [101] Miyamoto, S., Izumi, M., Hori, M., & Karaki, H. (2000). Xestospongins C, a selective and membrane-permeable inhibitor of IP₃ receptor, attenuates the positive inotropic effect of α -adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle. *Br J Pharmacol*, 130.
- [102] Oka, T., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., & Karaki, H. (2002). Xestospongins C, a novel blocker of IP₃ receptor, attenuates the increase in cytosolic calcium level and degranulation that is induced by antigen in RBL-2H3 mast cells. *Br J Pharmacol*, 135(8).
- [103] De Smet, P., Parys, J. B., Callewaert, G., Weidema, A. F., Hill, E., ... Missiaen, L. (1999). Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pumps. *Cell calcium*, 26(1-2).
- [104] Ozaki, H., Hori, M., Kim, Y.-S., Kwon, S.-C., Ahn, D.-S., Nakazawa, H., ... Karaki, H. (2002). Inhibitory mechanism of xestospongins-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 137(8), 1207–1212.
- [105] Jaimovich, E., Mattei, C., Liberona, J. L., Cardenas, C., ... Molgó, J. (2005). Xestospongins B, a competitive inhibitor of IP₃-mediated Ca²⁺ signalling in cultured rat myotubes, isolated myonuclei, and neuroblastoma (NG108-15) cells. *FEBS letters*, 579(10).
- [106] Bustos, G., Cruz, P., Lovy, A., & Cárdenas, C. (2017). Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Calcium Communication and the Regulation of Mitochondrial Metabolism in Cancer: A Novel Potential Target. *Frontiers in Oncology*, 7, 199.
- [107] Podunavac, M., Mailyan, A. K., Jackson, J. J., Lovy, A., Farias, P., Huerta, H., Molgó, J., Cardenas, C., & Zakarian, A. (2021). Scalable Total Synthesis, IP₃R Inhibitory Activity of Desmethyloxestospongins B, and Effect on Mitochondrial Function and Cancer.

- [108] Leyton, L., Torres, V., & Quest, A. (2014). Editorial (Thematic Issue: Signaling in Cell Migration and Disease). *Current Molecular Medicine*, 14(2), 197-198.
- [109] Mendoza, P., Ortiz, R., Díaz, J., Quest, A. F. G., Leyton, L., Stupack, D., & Torres, V. A. (2013). Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *Journal of Cell Science*, 126(17), 3835–3847.
- [110] Vinci, M., Box, C., & Eccles, S. A. (2015). Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (99), e52686.
- [111] Bosanac, I., Alattia, J. R., Mal, T. K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F. K., ... Ikura, M. (2002). Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature*, 420(6916), 696–700.
- [112] Ahumada-Castro, U., Silva-Pavez, E., Lovy, A., Pardo, E., Molgó, J., & Cárdenas, C. (2019). MTOR-independent autophagy induced by interrupted endoplasmic reticulum-mitochondrial Ca^{2+} communication: a dead end in cancer cells. *Autophagy*, 15(2), 358–361.